

Uloga 2D i 3D staničnog okruženja u odgovoru tumorskih stanica na stres

Petelinec, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:715630>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ana Petelinec

**Uloga 2D i 3D staničnog okruženja u
odgovoru tumorskih stanica na stres**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Ana Petelinec

**The role of 2D and 3D cell environment in the
cellular stress response**

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biofiziku stanice na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković pod voditeljstvom dr. sc. Juraja Simunića (Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković, 10000 Zagreb, Hrvatska), te suvoditeljstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Ivančić Baće (Zavod za molekularnu biologiju, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu). Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

Zahvale

Za početak, najveća zahvala mentoru dr. sc. Juraju Simuniću na pruženoj prilici, povjerenju i uloženom vremenu. Hvala za sve savjete, prijedloge i diskusije tijekom izrade diplomskog te na svom znanju koje sam stekla u proteklih godinu dana.

Neizmjereno hvala izv. prof. dr. sc. Ivani Ivančić Baće na pomoći, komentarima i sugestijama prilikom izrade rada.

Puno hvala svim članovima Tolić laba na svojoj pomoći i savjetima za staničnu i mikroskope, a posebice što ste mi uljepšali dane u labosu. Hvala Ivani što je uvijek brinula je li sve u redu. Najviše hvala mojoj lab partnerici Mateji na svojoj pomoći i druženjima.

Hvala Emi bez koje zadnjih pet godina ne bi bilo ni približno ovako zabavno i ispiti se ne bi spremali na kavama.

Hvala Tei što je satima slušala sve moje drame.

Hvala Filipu na svojoj podršci i što svakodnevno sluša o nanotubulima.

I za kraj, najveće hvala mami i tati, koji su mi omogućili bezbrižno studiranje i bez kojih ništa od ovoga ne bih postigla.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Uloga 2D i 3D staničnog okruženja u odgovoru tumorskih stanica na stres

Ana Petelinec

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Stanično okruženje i međustanična komunikacija su jedan od bitnih čimbenika u odgovoru stanica na stres. U 3D kulturama stanice su u okruženju koje je najbližije uvjetima u tkivima, dok u 2D kulturama stanice rastu na podlozi u jednom sloju i ne stvaraju se izvanstanični matriksi. Jedan od tipova međustanične komunikacije su premošćujuće strukture koje nastaju između stanica. To su tunelirajuće nanocjevčice (engl. *tunneling nanotubes*, TNT) i tumorske mikrocjevčice (engl. *tumor microtubes*, TM). U ovom radu opisane su premošćujuće strukture u stanicama U2OS. Utvrđeno je da tretman hladnoćom povećava broj premošćujućih struktura u uzorcima dok tretman inhibitorom proteina sHSP27 J2 utječe na smanjenje broja premošćujućih struktura. Također, zabilježena je lokalizacija proteina sHSP27 i membranskih struktura koja upućuje na njihov transport. Uspostavljen je protokol za izradu 3D kultura metodom magnetske levitacije stanica. Uspoređen je izgled stanica u 2D i 3D staničnom okruženju i razina oksidativnog stresa mjerena bojom za detekciju stresa CellROX™ Deep Red Reagent.

(67 stranica, 37 slika, tri tablice, 63 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: tunelirajuće nanocjevčice, tumorske mikrocjevčice, 3D kulture, stres

Voditelj: dr. sc. Juraj Simunić

Suvoditelj: izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Ocjenitelji:

Izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Izv. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek

Prof. dr. sc. Ines Radanović

Zamjena: Prof. dr. sc. Željka Soldin

Rad prihvaćen: 2. rujna 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

The role of 2D and 3D cell environment in cellular stress response

Ana Petelinec

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

The cell environment and intercellular connections have major impact in cellular stress response. Cell environment in 3D cultures is the most similar to the one in tissues, while at 2D cultures cells grow on substrate in a single layer and don't produce extracellular matrix. One type of cell to cell connections are structures that interconnect the cells. These are tunneling nanotubes (TNTs) and tumor microtubes, (TMs). In this paper, tunneling structures in U2OS cells are described. Cold shock treatment was found to increase the number of TNTs and TMs, while the treatment with sHSP27 inhibitor J2 reduced the number of structures. Also, localization of protein sHSP27 and membrane structures that refer to the transport is noted. A protocol for making 3D cultures by magnetic levitation has been established. The appearance of cells in a 2D and 3D cell environment and the level of oxidative stress measured by CellROX™ Deep Red Reagent stress detection were compared.

(67 pages, 37 figures, three tables, 63 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: tunneling nanotubes, tumor microtubes, 3D cultures, stress

Supervisor: dr. sc. Juraj Simunić

Co-supervisor: izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Reviewers:

Assoc. Prof. Ivana Ivančić Baće

Assoc. Prof. Draganja Mrvoš-Sermek

Prof. Ines Radanović

Substitute: Prof. Željka Soldin

Thesis accepted: 2 September 2021

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Međustanične interakcije.....	1
1.1.1. Premošćujuće strukture	3
1.2. Tunelirajuće nanocjevčice	3
1.2.1 Morfologija TNT-ova.....	4
1.2.2. Mikrotubuli u premošćujućim strukturama	4
1.2.3. Mehanizam nastanka TNT-a	5
1.2.4. Uloga TNT-ova i transport kroz TNT-ove	8
1.2.5. Odgovor stanica na stresne podražaje	9
1.3. Tumorske mikrocevčice (TM)	10
1.4. Usporedba TNT-ova i TM-ova.....	10
1.5. Premošćujuće strukture <i>In vivo</i>	10
1.6. Odgovor stanica na stresne podražaje	11
1.6.1. Stres stanica uzrokovan temperaturom.....	11
1.6.2. Oksidativni stres	12
1.6.3. Uloga proteina sHSP27 u odgovoru stanice na stres.....	12
1.7. Stanično okruženje	13
1.7.1. Rast stanica u kulturama s ograničenim prostorom – mikropaternalne kulture	14
1.7.2. 3D kulture.....	14
1.7.3. Metoda magnetske levitacije za uzgoj 3D staničnih kultura	15
1.8. Fluorescencijska mikroskopija	16
1.8.1. Konfokalna mikroskopija	16
1.8.2. Super-rezolucijska mikroskopija	17
2. Cilj istraživanja	19
3. Materijali i metode	20
3.1. Stanična kultura.....	20
3.2. Priprema 2D kultura	20
3.3. Izrada 3D kultura.....	21
3.4. Izrada mikropaternalnih kultura metodom fotolitografije.....	22

3.5. Tretiranje uzoraka.....	24
3.6. Fiksacija uzoraka.....	24
3.7. Bojanje uzoraka.....	25
3.7.1. Imunohistokemijska metoda bojanja stanica.....	25
3.8. Mikroskopiranje	26
3.8.1. Konfokalna mikroskopija.....	26
3.8.2. Super-rezolucijska mikroskopija.....	26
3.9. Analiza snimaka	27
3.9.1. Mjerenje premošćujućih struktura.....	27
3.9.2. Klasifikacija premošćujućih struktura.....	29
3.9.3. Mjerenje razine inducirano­g stresa.....	29
3.10. Analiza podataka	30
4. Rezultati	31
4.1. Brojnost premošćujućih struktura	31
4.1.1. Duljina i širina premošćujućih struktura	35
4.2. Morfologija premošćujućih struktura.....	36
4.2.1. Razgranate premošćujuće strukture.....	36
4.2.2. TM-ovi s proširenjima.....	38
4.2.3. Mikrotubuli u premošćujućim strukturama	39
4.3. Transport staničnih komponenti kroz premošćujuće strukture.....	43
4.3.1. Lokalizacija proteina sHSP27	43
4.3.2. Lokalizacija mitohondrija i membranskih struktura.....	44
4.4. Razlike između 2D i 3D staničnog okruženja	47
4.4.1. Mikropaternalne kulture.....	48
4.4.2. 3D kulture.....	49
4.4.3. Mjerenje razine stresa bojom za detekciju stresa CellROX	52
5. Rasprava	55
5.1. TNT-ovi i TM-ovi u stanicama U2OS	55
5.1.1. Učinak tretmana hladnoćom.....	55
5.1.2. Učinak inhibitora J2 i lokalizacija proteina sHSP27	56
5.1.3. Mikrotubuli u premošćujućim strukturama	56

5.1.4. Transport staničnih komponenti	57
5.2. Usporedba 2D i 3D staničnog okruženja.....	57
5.2.1. Intenzitet fluorescencije boje CellROX.....	58
6. Zaključak	60
7. Literatura.....	61
9. Prilozi.....	67
Životopis.....	iv

Kratice

A549 – *epitelne stanice adenokarcinoma pluća*

GFP – *green fluorescent protein*

HEK293 – *human embrionic kidney cells*

HUVEC – *human umbilical vein endothelial cells*

PBS – *phosphate-buffered saline*

PC – *pancreatic cancer cells*

PC12 – *stanice feokromocitoma štakora*

PLL-PEG – *poli-L-lizin s bočnim lancima etilen glikola*

ROS – *reactive oxygen species*

sHSP27 – *small heat shock protein 27*

SiR – *silicon rhodamine*

STED – *stimulated emission depletion*

TNT – *tunneling nanotube*

TM – *tumor microtube*

U2OS – *stanična linija koštanog osteosarkoma*

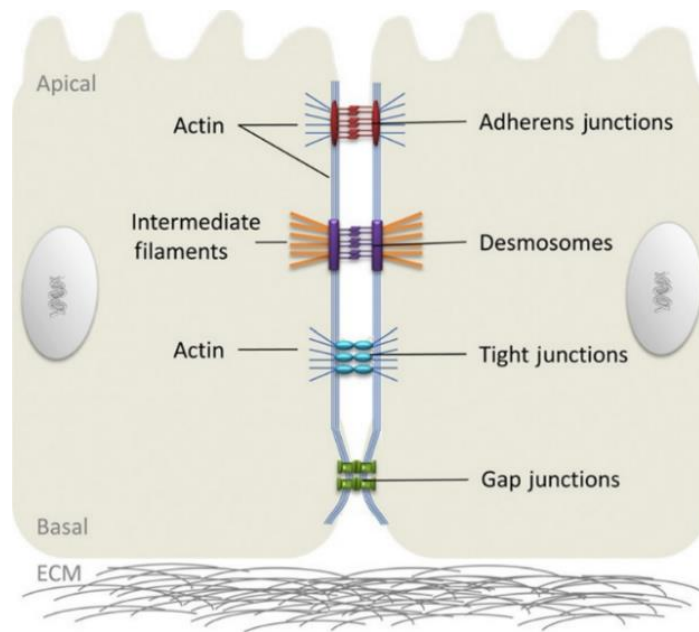
WGA – *wheat germ agglutinin*

1. Uvod

1.1. Međustanične interakcije

Međustanične interakcije omogućavaju rast i razvoj višestaničnih organizama i bitne su za postizanje homeostaze. Kod složenijih višestaničnih organizama odgovorne su za skladan rad organa i organskih sustava. Imaju bitnu ulogu u radu živčanog sustava, gdje omogućavaju prijenos akcijskog potencijala. U imunom sustavu komunikacija limfocita ključna je za stvaranje imunog odgovora (Cooper i Hausman 2004).

Međustanične interakcije u kralježnjaka mogu se podijeliti na direktne i indirektne. Direktne interakcije podijeljene su na četiri tipa ovisno o građi i ulozi; adherentne spojeve (engl. *adherens junctions*), dezmosome (engl. *desmosomes*), spojeve s pukotinom (engl. *gap junctions*) i čvrste spojeve (engl. *tight junctions*) (Slika 1) (Wei i Huang 2013). Adherentni spojevi građeni su od skupine proteina kadherina koji tvore homodimere s proteinima kadherinima susjednih stanica. Privlače aktinski citoskelet prema staničnoj membrani i služe za povezivanje susjednih stanica. Funkcija dezmosoma je stvaranje međustaničnih interakcija koje su bitne za razvoj i učvršćivanje tkiva. Dezmosomi umanjuju utjecaj mehaničkog stresa na tkivo. Na njima su usidreni intermedijarni filamentni. Spojevi s pukotinama su međustanični kanali građeni od proteina koneksina. Na kraju svake stanice formira se konekson (engl. *connexon*), polukanal (engl. *hemichannel*) koji je građen od šest proteina koneksina. Spajanjem dva koneksona susjednih stanica nastaje spoj s pukotinom (Cooper i Hausman 2004). Čvrsti spojevi građeni su od proteina okludina i tvore selektivno propusnu barijeru između susjednih stanica te reguliraju polarnost stanica. Kao i adherentni spojevi, privlače aktinski citoskelet na staničnu membranu (Wei i Huang 2013).



Slika 1. Shematski prikaz međustaničnih interakcija. Interakcije na lateralnoj staničnoj membrani; adherentni spojevi, dezmosomi, čvrsti spojevi, spojevi s pukotinom. Adherentni spojevi i čvrsti spojevi privlače aktin na staničnu membranu, a dezmosomi privlače intermedijarne filamente. Bazalna membrana u kontaktu je s izvanstaničnim matriksom, ECM (engl. *extracellular matrix*), a apikalna membrana je u kontaktu s okolinom. (Preuzeto: Wei i Huang 2013).

Stanice koje nisu u direktnom kontaktu komuniciraju hormonima i neurotransmiterima. Hormoni se mogu izlučivati lokalno, odnosno parakrino, tako da stanica izlučuje signalne molekule prema ciljanoj susjednoj stanici ili endokrino, na veće udaljenosti gdje se hormoni prenose putem krvožilnog sustava (Cooper i Hausman 2004).

Stanice u tkivima uronjene su u izvanstanični matriks. Tvore ga sekretirani proteini, polisaharidi i faktori rasta (Cooper i Hausman 2004). Najzastupljeniji proteini su iz obitelji proteina kolagena. Kolageni tvore trostruke uzvojnice od tri polipeptidna lanca koje nazivamo kolagena vlakanca. U izvanstaničnom matriksu nalaze se i elastična vlakna, najčešće građena od elastina. Vlaknasti proteini uronjeni su u polisaharide glukozaminoglikane. Zajedno tvore proteoglikane. Uz vlaknaste proteine u izvanstaničnom matriksu nalaze se adhezijski proteini, od kojih je najpoznatiji fibronektin. Oni tvore fibrilarne adhezije kojima povezuju komponente matriksa i matriks sa stanicama (Cukierman i sur. 2001). Ulogu povezivanja matriksa sa stanicama imaju i proteini integrini. To su transmembranski proteini koji služe kao sidro za citoskelet. Fokalnim adhezijama spajaju aktin s komponentama izvanstaničnog matriksa (Cooper i Hausman 2004).

Izvanstanični matriks utječe na mnoge stanične procese, kao što su migracija stanica i adhezija, diferencijacija, proliferacija i ulazak u apoptozu. U tumorima komponente matriksa mogu utjecati i na distribuciju lijekova i stvaranje otpornosti na lijekove u vanjskom sloju stanica (Langhans 2014).

1.1.1. Premošćujuće strukture

Direktna komunikacija donedavno je bila opisana samo između susjednih stanica koje su u kontaktu, sve dok nisu opisane premošćujuće strukture, tunelirajuće nanocjevčice (engl. *tunneling nanotubes*, u daljnjem nastavku teksta: TNT), koje su otkrivene početkom stoljeća (Wei i Huang 2013). Uspoređuju ih sa plazmodezmijima u biljnim stanicama zato što omogućavaju povezivanje citoplazmi između dvije stanice (Bloemendal i Kück 2012, Gerdes i sur. 2007). To su membranske strukture bogate F-aktinom koje mogu povezivati stanice na udaljenostima do 500 μm . Uz tunelirajuće nanocjevčice u premošćujuće strukture spadaju i tumorske mikrocjevčice (engl. *tumor microtubes*, u daljnjem nastavku teksta TM) (Osswald i sur. 2015).

1.2. Tunelirajuće nanocjevčice

Tunelirajuće nanocjevčice su heterogene strukture čija je uloga međustanična komunikacija. Prvi su ih opisali Rustom i sur. (2004) u stanicama feokromocitoma štakora PC12. Definirali su ih kao membranske strukture koje sadrže F-aktin, ali ne i mikrotubule te omogućavaju transport između stanica. Široki su od 50 nm do 200 nm, a mogu biti duljine kao i nekoliko promjera stanica. Nastaju *de novo* u nekoliko minuta na najmanjoj udaljenosti između dvije stanice i ne dodiruju podlogu. Životni vijek im je od nekoliko minuta do nekoliko sati. TNT-ovi su osjetljivi na mehaničku silu, izloženost laserima i kemijsku fiksaciju, što smanjuje njihov životni vijek i otežava istraživanja.

TNT-ovi su opisani u brojnim staničnim linijama u *in vitro* istraživanjima te u tkivima. Uočeno je da se razlikuju u građi, veličini i tvarima koje prenose, a imaju i razne uloge. Do sada nije pronađen biokemijski marker specifičan za sve tipove TNT-ova (Abounit i sur. 2015). Heterogenost ovih struktura, kao i osjetljivost na razne mehaničke i kemijske podražaje predstavlja izazov u istraživanjima, posebice u vizualizaciji TNT-ova u modelnim životinjskim organizmima (Rustom i sur. 2004).

1.2.1 Morfologija TNT-ova

Duljina i širina TNT-ova razlikuje se u staničnim linijama (Tablica 1). Promjer TNT-ova snimanih na elektronskom mikroskopu u stanicama PC12 iznosi od 50 do 200 nm (Rustom i sur. 2004), a u T-stanicama iznosi od 180 do 380 nm (Sowinski i sur. 2008). Ukoliko se TNT-ovi snimaju svjetlosnim mikroskopom bitno je uzeti u obzir rezolucijski limit zbog granice difrakcije svjetlosti. Istraživanjem TNT-ova u raznim staničnim linijama opisane su strukture promjera većeg od 700 nm u stanicama makrofaga (Önfelt i sur. 2006), a u epitelnim stanicama adenokarcinoma pluća A549 opisane su strukture promjera do 1500 nm (Wang Z. G. i sur. 2012).

TNT-ovi najčešće povezuju dvije stanice. Mogu biti razgranati i povezivati više stanica pa čine komunikacijsku mrežu između stanica (Önfelt i sur, 2004). Na stvaranje razgranatih struktura može se utjecati primjenom sile, odnosno povlačenjem TNT-ova. Pontes i sur. (2008) na TNT-ove između stanica ljudskog glioblastoma U-87 MG stavili su polistirenske perlice koje su povlačili konstantnom brzinom. Dobivene strukture opisali su kao V-Y bifurkacije i I-D bifurkacije. V-Y bifurkacije nastaju tako da se ravni TNT savije u obliku slova V s polistirenskom perlicom na vrhu. Iz vrha nastaje nova grana (engl. *branch*) i TNT poprima oblik slova Y. I-D bifurkacija nastaje kada se iz ravnog TNT-a izdvoji zakrivljeni luk i struktura poprima oblik slova D. Razgranate strukture u literaturi nisu detaljno opisane pa se ne zna zašto nastaju razgranati TNT-ovi i u kojim sve staničnim linijama.

1.2.2. Mikrotubuli u premošćujućim strukturama

TNT-ovi su prvotno opisani kao strukture koje ne sadrže mikrotubule, ali Önfelt i sur, 2006. godine opisali su TNT-ove između stanica makrofaga koji sadrže mikrotubule. Došli su do rezultata da se mikrotubuli pojavljuju samo u debljim TNT-ovima čiji je promjer veći od otprilike 700 nm. U radu nije naglašeno koji je maksimalni promjer debljih TNT-ova pa je potrebno uzeti u obzir da bi neke od opisanih struktura mogle spadati u TM-ove koji tada još nisu bili opisani. Neovisno o klasifikaciji struktura, opisali su kako protein EB1 na bazi pojedinih TNT-ova naglo nestaje, dok u neke strukture ulazi i zabilježili su njegovo kretanje u oba smjera strukture. Protein EB1 lokaliziran je na plus-kraju mikrotubula i sudjeluje u procesu nastanka i elongacije mikrotubula u citoplazmi (Tirnauer i Bierer 2000).

Wang i Gerdes (2015) opisali su da se mikrotubuli nalaze u 76,7 % TNT-ova između apoptotskih i zdravih stanica PC12 u kokulturi kojima se prenose mitohondriji, dok su mikrotubuli pronađeni u samo 6,7 % TNT-ova između zdravih stanica. Također, pokazali su da tretman nokodazolom (engl. *nocodazole*), koji inhibira polimerizaciju mikrotubula, ne utječe na formaciju TNT-ova.

Tablica 1. Duljina i širina TNT-ova. Prikaz duljine i širine TNT-ova u određenim staničnim linijama te komponenti citoskeleta od kojih su TNT-ovi građeni. ND označava „nije dokumentirano“

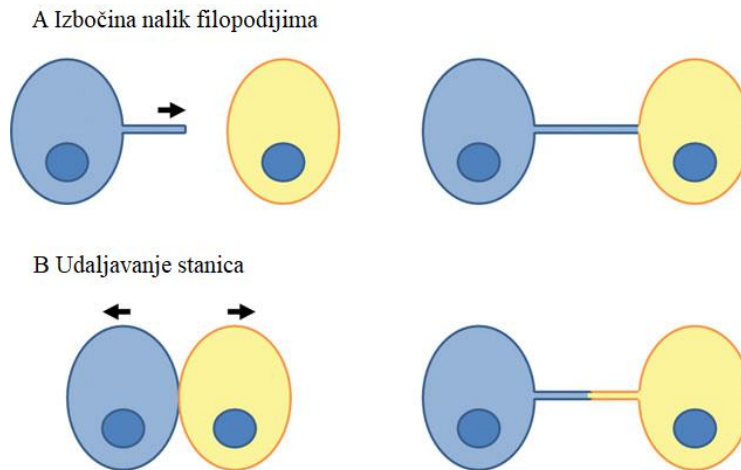
Stanična linija	Duljina TNT-ova	Širina TNT-ova	Citoskelet	Referenca
A549	Maks. 105 μm	400-1500 nm	F-aktin mikrotubuli	Wang Z. G. i sur. 2012
HEK293	ND	< 500 nm	F-aktin	Abounit i Zurzolo 2012
HeLa	17.7 μm	ND	F-aktin	Hase i sur. 2009
PC12	6 μm	50-200 nm	F-aktin miozin VA mikrotubuli	Rustom i sur. 2004 Wang i Gerdes 2015
T-stanice	22 μm	180-380 nm	F-aktin	Sowinski i sur. 2008
Makrofazi	ND	≥ 700 nm	F-aktin mikrotubuli	Önfelt i sur. 2006

1.2.3. Mehanizam nastanka TNT-a

Poznata su dva mehanizma nastanka TNT-a. Prema prvom mehanizmu, stanica stvara membransku izbočinu nalik filopodijima bogatu F-aktinom koja se pruža prema drugoj stanici, dok se membrane obje stanice ne spoje (Slika 2). Ovaj mehanizam ovisan je o reorganizaciji aktinskog citoskeleta u stanici. Prvi su ga opisali Rustom i sur. (2004) na stanicama PC12, što su Bukoreshtliev i sur. (2009) potvrdili. 93 % TNT-ova između stanica PC12 nastalo je opisanim mehanizmom. Tretiranjem stanica s citohalazinom B, inhibitorom koji sprječava polimerizaciju aktina, inhibirali su nastanak izbočina nalik filopodijima i broj novonastalih TNT-ova se smanjio za 80 % (Bukoresthliev i sur. 2009). Hase i sur. (2009) predlažu protein M-Sec kao marker za dokazivanje TNT-ova. U stanicama HeLa pokazali su da protein M-Sec utječe na stvaranje izbočina nalik filopodijima iz kojih nastaju TNT-ovi. Nadalje, Wang i sur. (2011) otkrili su da je protein p53 ključan za stvaranje TNT-ova u neuronskim stanicama i astrocitima te da u stanicama s inaktivnim proteinom p53 TNT-ovi ne nastaju.

U drugom mehanizmu opisano je da TNT-ovi nastaju od membranskih mostova kada se dvije spojene stanice počnu udaljavati jedna od druge (Önfelt i sur. 2004) (Slika 2). Nastanak TNT-ova iz membranskih mostova opažen je tijekom odvajanja citotoksičnih T limfocita od ciljnih stanica (engl. *target cells*) pri čemu stanice ostaju povezane kontinuiranom membranskom strukturom promjera između 50 nm i 95 nm (Stinchcombe i sur. 2001).

U stanicama makrofaga TNT-ovi nastaju udaljavanjem dvije prvotno spojene stanice. Može doći do njihovog pucanja. Novi, tanji TNT-ovi nastaju tako da se preostali dio strukture iz jedne stanice pruža prema drugoj (Önfelt i sur. 2006).



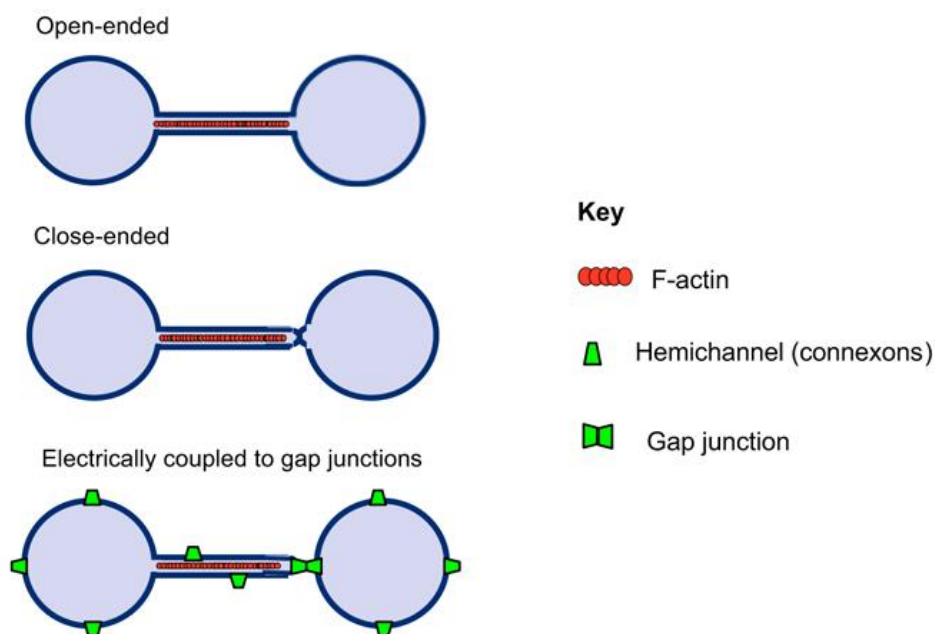
Slika 2. Shematski prikaz mehanizma nastanka TNT-ova. **A** TNT nastaje pružanjem membranske izbočine nalik filopodijima bogate F-aktinom iz jedne stanice prema drugoj. **B** TNT nastaje udaljavanjem dvije spojene stanice. (Preuzeto i prilagođeno prema Abounit i sur. 2015)

Otkriveno je da se TNT-ovi razlikuju prema načinu na koji se kraj TNT-a spaja s membranom stanice. TNT može biti otvoren na oba kraja (engl. *open-ended*), zatvoren na jednom kraju (engl. *close-ended*) ili povezan putem spojeva s pukotinom (engl. *electrically coupled to gap junctions*) kao što je prikazano na slici 3 (Abounit i Zurzolo 2012). Prvotno se smatralo da postoje samo TNT-ovi otvoreni na oba kraja, kod kojih je membrana TNT-a i stanice spojena, što omogućava protok citoplazme spojenih stanica kroz TNT.

Sowinski i sur. (2008) pronašli su TNT-ove zatvorene na jednom kraju između T-stanica, što znači da stanična membrana stanice i TNT-a nisu kontinuirane i transport se odvija prijenosom putem membranskih receptora. Spoj između dvije stanice nalazio se na različitim dijelovima TNT-a i micao se duž strukture. Uočili su da se kroz TNT-ove između T-stanica kalcijevi ioni ne prenose difuzijom. Također, zabilježili su prijenos čestica HIV-1 ovisan o receptorima putem TNT-ova između zaraženih i nezaraženih T-stanica. Ovakav način transporta kroz TNT-ove ukazuje na drugačiju građu od TNT-ova otvorenih na oba kraja. TNT-ovi zatvoreni na jednom kraju morfološki su slični citonemama, tankim membranskim strukturama bogatim F-aktinom kojima se stvari prenose između stanica putem interakcije signalnih molekula koje se luče na krajevima citonema i receptora stanica (Abounit i Zurzolo 2012). Za formaciju citonema potreban

je virusni protein Env, koji omogućava vezanje virusnih čestica na staničnu membranu. U strukturama između T-stanica taj protein nije pronađen na temelju čega su zaključili da se radi o TNT-ovima, a ne o citonemama.

TNT-ovi povezani putem spojeva s pukotinama prenose električne signale (Wang i Gerdes 2012). Spojevi s pukotinama građeni su od proteina koneksina. Otkriveno je da TNT-ovi koji prenose električne signale imaju protein koneksin-43, dok TNT-ovi s otvorenim ili zatvorenim krajevima nemaju, što ih razlikuje. Većina TNT-ova imala je spojeve s pukotinama samo na jednom kraju, no u nekim slučajevima imali su na oba (Wang i Gerdes 2012). Ovaj tip TNT-ova nastaje udaljavanjem stanica i smatra se da spoj proteina koneksina i N-kadherina sprečava pucanje TNT-a prilikom udaljavanja stanica (Abounit i Zurzolo 2012).



Slika 3. Shematski prikaz tipova TNT-ova ovisno o tome kako je kraj strukture spojen sa stanicom. TNT-ovi mogu biti otvoreni na oba kraja (engl. *open-ended*) – membrana TNT-a i stanice su spojene i omogućavaju protok citoplazme, zatvoreni na oba kraja (engl. *close-ended*) – membrana TNT-a i stanice nije spojena ili mogu biti povezani putem spojeva s pukotinom (engl. *electrically coupled to gap junctions*) kroz koje se prenosi električni naboj. Svi tipovi TNT-ova građeni su od F-aktina. Spojevi s pukotinama nastaju spajanjem dva koneksona (engl. *connexons*) (Preuzeto i prilagođeno prema Abounit i Zurzolo 2012.)

1.2.4. Uloga TNT-ova i transport kroz TNT-ove

Prijenos tvari između stanica i komunikacija udaljenih stanica opisani su kao glavna uloga TNT-ova (Abounit i Zurzolo 2012). Do sada je u TNT-ovima zabilježen transport organela kao što su mitohondriji (Yasuda i sur. 2010), lizosomi (Yasuda i sur. 2010), endosomi (Önfelt i sur. 2006), Golgijevo tijelo i endoplazmatski retikulum (Wang i sur. 2011), različitih vezikula (Önfelt i sur. 2006) i makromolekula kao što je mRNA (Haimovich i sur. 2017).

Otkriveno je da se putem TNT-ova patogeni mogu prenositi sa inficiranih stanica na zdrave. Zabilježen je transport čestica HIV-a između T-stanica i Jurkatovih stanica (Sowinski i sur. 2008), kao i između makrofaga (Eugenin i sur. 2009) te transport virusa gripe A između stanica A549 (Kumar i sur. 2017). Bakterije *Mycobacterium bovis* mogu se samostalno ili u nakupinama kretati po površini TNT-ova i tako se širiti na zdrave stanice (Önfelt i sur. 2006).

U embrionalnim epitelnim stanicama bubrega HEK293 (engl. *human embryonic kidney cells*) TNT-ovi povezani putem spojeva s pukotinom prenose kalcijeve ione (Wang i Gerdes 2012). Isto je opisano i u mijeloidnim stanicama među kojima su se prenosili ioni kao odgovor na mehanički podražaj (Watkins i Salter 2015). Kalcijevi ioni između stanica prenose se kroz spojeve s pukotinama. Prijenos kalcijevih iona putem TNT-ova omogućava prijenos signala na veće udaljenosti, što može utjecati na brži prijenos signala, odgovor stanica na podražaje i na migraciju stanica (Wang i Gerdes 2012).

Transport je opisan u brojnim staničnim linijama i kokulturama (Tablica 2). Koliko je poznato, do sada nije objašnjeno zašto se u nekoj staničnoj liniji prenose određeni organeli i tvari. Transport se može odvijati u jednom smjeru ili u oba smjera između dvije stanice (Marzo i sur. 2012). TNT-ovi kod kojih je transport jednosmjernan građeni su od F-aktina i mikrotubula, dok su TNT-ovi s dvosmjernim transportom građeni samo od F-aktina (Marzo i sur. 2012).

Arkwright i sur (2010) opisali su TNT-ove kao mehanizam za preživljavanje tumorskih stanica. Istraživanje su radili na T-stanicama i Jurkatovim stanicama, koje su nastale od akutne leukemije T-stanica. Pokazali su da je za formaciju TNT-ova u T-stanicama potreban Fas signalni put, koji sudjeluje u apoptozi. FasL, Fas ligand koji vezanjem na receptor Fas potiče apoptozu i kaspaze-3 (engl. *caspase-3*), koje sudjeluju u degradaciji staničnih komponenti, prenose se u stanice u kojima nije aktivan Fas signalni put, odnosno nisu ušle u apoptozu. Gen FasL je pojačano eksprimiran u tumorskim stanicama, što znači da se TNT-ovima prenose signali koji uzrokuju apoptozu zdravih T-stanica, dok prijenos između tumorskih stanica potiče njihovo preživljavanje, tako što im omogućava komunikaciju i izmjenu tvari.

1.2.5. Odgovor stanica na stresne podražaje

Znanstvenici su pokazali da TNT-ovi između nekih staničnih linija nastaju kao odgovor stanica na stresne podražaje. Smatra se da je to mehanizam kojim zdrave stanice spašavaju apoptotske stanice i stresirane stanice (Wang i sur. 2011). Izrađene su kokulture (engl. *cocultures*) zdravih stanica i stanica izloženih stresu. Pokusi su rađeni na astrocitima i neuronskim stanicama koje su tretirane vodikovim peroksidom ili su bile u mediju s nedostatkom seruma. Uočeno je da stresirane stanice stvaraju TNT-ove prema zdravim stanicama. U stanicama PC12 zabilježen je prijenos mitohondrija kroz TNT-ove između zdravih stanica i stanica u ranom stadiju apoptoze u kokulturi (Wang i Gerdes 2015). TNT-ove su stvarale stanice tretirane UV zračenjem i prijenos mitohondrija spasio ih je od apoptoze. Yasuda i sur. (2010, 2011) također su zabilježili prijenos mitohondrija kroz TNT-ove u kokulturi tretiranih i zdravih stanica. Endotelne progenitorske stanice EPC (engl. *endothelial progenitor cells*) tretirali su s Adriamycinom, poznatijim kao doksorubicin (engl. *doxorubicin*) koji je kemoterapijski lijek i napravili kokulturu sa netretiranim humanim endotelnim stanicama pupčane vrpce HUVEC (engl. *human umbilical vein endothelial cells*) stanicama. U ovom slučaju tretirane stanice šalju signale koji potiču formaciju TNT-ova iz zdravih stanica. Zabilježili su i prijenos lizosoma koji je dvosmjernan između zdravih stanica i postaje jednosmjernan između zdravih i tretiranih stanica u kokulturi.

Tablica 2. Transport kroz TNT-ove. Prikaz organela, molekula i tvari koje se transportiraju kroz TNT-ove u pojedinoj staničnoj liniji.

Stanična linija	Transport	Referenca
A549	Virus gripe A	Kumar i sur. 2017
EPC	Mitohondriji, lizosomi	Yasuda i sur. 2010, 2011
HEK293	Ca ²⁺	Wang i Gerdes 2012
HUVEC	Mitohondriji, lizosomi	Yasuda i sur. 2010, 2011
Jurkatove stanice	FasL, kaspaze-3	Arkwright i sur. 2010
Makrofazi	<i>Mycobacterium bovis</i>	Önfelt i sur. 2006
Mijeloidne stanice	Ca ²⁺	Watkins i Salter 2005
PC	Mitohondriji, lizosomi, protein sHSP27	Kretschmer i sur. 2019
PC12	Mitohondriji	Wang i Gerdes 2015
T-stanice	Čestice HIV-1, FasL, kaspaze-3	Abounit i Zurzolo 2012, Sowinski i sur. 2008, Arkwright i sur. 2010

1.3. Tumorske mikrojevčice (TM)

Tumorske mikrojevčice su strukture nalik TNT-ovima, prvi puta su opisane u gliomu astrocitomu (Osswald i sur. 2015). TM-ovi su dulji, širi i životni vijek im je dulji nego TNT-ovima. Zbog tih razlika Osswald i sur. (2015) TM-ove su odvojili kao zasebne strukture. TM-ovi između stanica astrocitoma nastaju od mitotskog mosta nakon stanične diobe ili razdvajanjem dvije stanice koje su bile u kontaktu. U TM-ovima pronašli su mitohondrije, što ukazuje na lokalnu opskrbu TM-ova s ATP-om i mikrovezikule. Nadalje, pronašli su dvosmjernan promet kalcijevih iona, koji prolaze kroz TM-ove kroz spojeve s pukotinom koje gradi protein koneksin 43. Također, pronašli su protein koneksin 43 na mjestima gdje su se dva TM-a križala.

U matičnim stanicama glioblastoma GBMSC (engl. *glioblastoma multiforme stem cells*) otkriveno je da stanice stvaraju veći broj TM-ova kao odgovor na izloženost laserskim zrakama te da je veća stopa preživljavanja terapije zračenjem među stanicama koje su spojene TM-ovima (Osswald i sur. 2015). Stanice GBMSC umrežene TM-ovima pokazale su i veću otpornost na kemoterapiju (Weil i sur. 2017).

1.4. Usporedba TNT-ova i TM-ova

Glavna razlika između TNT-ova i TM-ova je u dimenzijama struktura. TNT-ovi su promjera manjeg od 1 μm , a TM-ovi imaju promjer veći od 1 μm . Oba tipa struktura građena su od F-aktina. TM-ovi imaju mikrotubule, dok se kod TNT-ova nalaze samo u nekima. Životni vijek TNT-ova je od nekoliko minuta do nekoliko sati (Rustom i sur. 2004), a životni vijek TM-ova može doseći i 100 dana (Osswald i sur 2015). Zabilježen je transport organela i staničnih komponenti, kao i kalcijevih iona što znači da im je jedna od uloga komunikacija između stanica (Roehlecke i Schmidt 2020). Također, imaju ulogu u odgovoru stanica na stres i u rezistenciji tumora na liječenje.

S obzirom na to da između TNT-ova i TM-ova ima brojnih sličnosti ove strukture se teško razlikuje. Latario i sur. (2020) u staničnoj liniji raka gušterače DHPC-018 (engl. *Dartmouth-Hitchcock Pancreatic Cancer*) pronašli su strukture čiji promjer varira od 0,39 μm do 5,85 μm . Stukture su imale karakteristike TNT-ova i TM-ova pa su ih definirali kao TMT.

1.5. Premošćujuće strukture *In vivo*

Jedan od najvećih izazova u području premošćujućih struktura je njihovo promatranje u tkivima i živim organizmima. Većina istraživanja TNT-ova napravljena je *in vitro*. Snimanje TNT-ova otežava njihova osjetljivost na lasersko zračenje, a uz to životni vijek im je od nekoliko minuta do nekoliko sati (Rustom i

sur. 2004). TM-ovi su otporniji i s obzirom na to da su veće strukture od TNT-ova na nekim mikroskopima ih je lakše snimati. Osswald i sur. (2015) snimali su TM-ove u modelu miša tijekom godinu dana pomoću multifotonskog pretražnog mikroskopa.

Drugi izazov u istraživanjima premošćujućih struktura je da do sada nije otkriven biokemijski marker specifičan za TNT-ove ili TM-ove. Osim toga, premošćujuće strukture su heterogene, morfološki se razlikuju i mogu biti građene od različitih staničnih komponenti te su opisane različite funkcije premošćujućih struktura (Matejka i Reindl 2019, Roehlecke i Schmidt 2020).

1.6. Odgovor stanica na stresne podražaje

Na stanice u tkivima ili staničnoj kulturi različiti čimbenici i uvjeti mikrookoliša mogu negativno utjecati. Stres mogu stvarati mehanički podražaji, izloženost zračenju i kemijskim supstancama. U tumorskim stanicama to su često antitumorski lijekovi i kemoterapija. Stres uzrokuju i razni oksidansi koji uzrokuju pojavu slobodnih kisikovih radikala ili ROS-ova (engl. *reactive oxygen species*) (Pizzino i sur. 2017). Njihovo nakupljanje uzrokuje oksidativni stres. Neki od uvjeta mikrookoliša koji mogu uzrokovati stres su temperatura, metabolički plinovi, dostupnost hranjivih tvari i pH vrijednost medija.

Postoje različiti načini odgovora na stresne podražaje koji ovise o tipu stresnog podražaja. Na stres utječe stanično okruženje. Ovisno jesu li stanice u 2D ili 3D okruženju mogu različito reagirati na stresne podražaje i stanice u 2D kulturama manje gustoće lošije reagiraju na stresne podražaje (Fujita i sur. 2001). Međustanične interakcije imaju važnu ulogu u odgovoru na stres (Wei i Huang 2013). Stanice putem TNT-ova i TM-ova prenose organele, kalcijeve ione i stanične komponente i pomažu oštećenim stanicama, kao što je već opisano. Stanice učinak oksidativnog stresa umanjuju proteinima šaperonima i različitim enzimima (Santra i sur. 2018).

1.6.1. Stres stanica uzrokovan temperaturom

Previsoka ili preniska temperatura dovode stanice u stanje stresa. Optimalna temperatura za uzgoj ljudskih stanica u staničnoj kulturi iznosi 37 °C. Tretman hladnoćom (engl. *cold shock*) uzrokuje ekspresiju CSP proteina (engl. *cold shock proteins*) za koje je karakteristična evolucijski očuvana domena koja se veže na nukleinske kiseline (Al-Fageeh i Smales 2006). Tijekom izloženosti niskim temperaturama povećava se rigidnost stanične membrane i smanjuje stopa difuzije. Usporava se sinteza proteina i nastaju granule stresa, koje su nakupine proteina i molekula RNA, što potiču CSP proteini. Zabilježeno je da tretman hladnoćom

u stanicama CAD uzrokuje povećanje broja TNT-ova, kao odgovor stanica na stresni podražaj (Abounit i sur 2015).

1.6.2. Oksidativni stres

Oksidativni stres nastaje prekomjernim nakupljanjem ROS-ova u stanicama (Pizzino i sur. 2017). ROS-ovi nastaju u stanicama tijekom metaboličkih procesa i postoje različiti antioksidansi koji ih transformiraju u manje reaktivne kemijske vrste. Ukoliko se radikali ne uklone postaju štetni za stanicu. Na povećanje količine ROS-ova u stanicama mogu utjecati UV zračenje, ionizirajuće zračenje i razne kemikalije. Najzastupljeniji radikali su superoksidni radikal $O_2^{\bullet-}$, vodikov peroksid H_2O_2 , hidroksilni radikal $\bullet OH$ i singletni kisik 1O_2 (Shankar i Mehendale 2014). Slobodni radikali mogu izazvati oštećenja molekula DNA, koja mogu uzrokovati nekontrolirane stanične diobe i nastanak kancerogenih stanica. Također, djeluju i na proteine koji nisu smotani (engl. *unfolded*) i uzrokuju nastanak agregacija proteina koji su povezani sa neurodegenerativnim bolestima (Pizzino i sur. 2017).

Postoje brojne metode detekcije razine oksidativnog stresa. U mikroskopiji je moguća detekcija oksidativnog stresa korištenjem fluorescentnih boja, kao što je CellROX™ Deep Red Reagent koje fluoresciraju u reakciji sa ROS-ovima (Celeghini 2019).

1.6.3. Uloga proteina sHSP27 u odgovoru stanice na stres

Protein sHSP27 (engl. *small heat shock protein 27*) spada u skupinu malih šaperona, veličine 27 kDa. To je citoprotektivni protein, koji ima više različitih uloga kojima štiti stanice i omogućava njihovo preživljavanje (Kretschmer i sur 2019). Zajedno sa šaperonom HSP70 sudjeluje u sprečavanju nastanka nespecifičnih agregacija proteina djelovanjem ROS-ova i vraća proteine u nativnu konformaciju (Concannon i sur. 2003). Sudjeluje u procesu apoptoze tako da inhibira aktivaciju kaspaza.

Protein sHSP27 ima ulogu u rezistenciji na tretmane i lijekove u neoplazijama, raku dojke i debelog crijeva (Rocchi i sur. 2004). Tijekom liječenja raka prostate, ekspresija proteina sHSP27 se pojačava i blokira apoptotske signale (Rocchi i sur. 2004). Jedan od načina liječenja raka prostate je blokiranje androgenih receptora. U stanicama PC (engl. *pancreatic cancer cells*) primijećeno je da stanice mogu razviti otpornost na tretman stvaranjem proteina šaperona i TNT-ova. Protein sHSP27 je jedan od šaperona pronađen u TNT-ovima stanica PC (Kretschmer i sur 2019). Utišavanje proteina sHSP27 u stanicama PC nije spriječilo formaciju TNT-ova, kao što je utišavanje šaperona CLU (engl. *clusterin*) i šaperona YB-1 (engl. *Y-box binding protein 1*) koji nastaju kao odgovor stanica na stres. CLU i YB-1 povezani su sa signalnim putem PI3K/ATK koji je pokazan da sudjeluje u formaciji TNT-ova u nekim staničnim linijama (Pinto i sur. 2020).

Doshi i sur. (2009) pokazali su povezanost proteina sHSP27 i F-aktina u stanicama karcinoma debelog crijeva SW480. Istražili su kako protein sHSP27 utječe na migraciju stanica, tako da su u staničnoj kulturi *in vitro* mehanički uklonili sloj stanica i promatrali kolonizaciju novonastalog slobodnog prostora. Pokazali su da u stanicama s utišanim proteinom sHSP27 sposobnost stanica da koloniziraju slobodni prostor je znatno manja, odnosno manja je sposobnost kretanja stanica koja je regulirana polimerizacijom F-aktina. Imunoprecipitacijskom metodom pokazali su da se protein sHSP27 nalazi u kompleksu sa F-aktinom. Pokazano je da se protein sHSP27 nalazi na krajevima mikrofilamenata F-aktina te ima ulogu u regulaciji njegove polimerizacije.

S obzirom na to da protein sHSP27 ima ulogu u polimerizaciji mikrofilamenata F-aktina, a njegovo utišavanje nije utjecalo na formaciju TNT-ova, ulogu proteina sHSP27 u formaciji TNT-ova treba dodatno istražiti (Kretschmer i sur 2019).

1.7. Stanično okruženje

Uzgoj adherentnih staničnih linija u 2D kulturama je široko rasprostranjena metoda korištena u medicini, staničnoj i molekularnoj biologiji. Prva stanična kultura uzgojena 1950-ih *in vitro* je linija stanica raka vrata grlića maternice, poznatijih kao stanice HeLa, nazvane po pacijentici Henrietti Lacks od koje su dobivene (Cooper i Hausman 2004). Od tada se brojne stanične linije uzgajaju *in vitro*. Istraživanja na staničnim kulturama jednostavnija su i etički prihvatljivija od istraživanja na životinjskim modelnim organizmima.

Iako je manipulacija 2D kulturama jednostavnija, postoje razlike između *in vitro* i *in vivo* istraživanja, koja utječu na relevantnost *in vitro* istraživanja i njihovu kliničku primjenu (Zhang 2004). U tkivima stanice su okružene drugim stanicama i komponentama izvanstaničnog matriksa i nalaze se u 3D strukturi. Susjedne stanice utječu na oblik stanica, zato što im je prostor ograničen, kao i na polarnost. Također, u tkivima stanice imaju konstantan protok metaboličkih plinova, hranjivih i otpadnih tvari. U 2D kulturama stanice rastu horizontalno i prostor im je relativno neograničen, ovisno o gustoći stanica u kulturi (Zhang 2004). Može doći do nakupljanja otpadnih tvari i manjka hranjivih tvari, kao i do hipoksije.

2D stanično okruženje utječe na međustanične interakcije. U 2D kulturama stanice luče fibronektin i integrine kojima se pričvršćuju za podlogu, no to je samo dio komponenti koje čine izvanstanični matriks u tkivima i 3D kulturama (Cooper i Hausman 2004). Cukierman i sur. (2001) pokazali su da se fokalna i fibrilarna adhezija razlikuju u 2D i 3D kulturama. Stanice fibroblasta nasadili su na pojedine komponente izvanstaničnog matriksa, kolagen, laminin i fibronektin i na izvanstanični matriks stvoren u tkivima iz kojeg su uklonjene stanice. Primijetili su da se stanice u matriksu dobivenom iz tkiva brže prihvaćaju za podlogu i imaju veću stopu migracije.

Međustanične interakcije utječu na odgovor stanica na stresne podražaje i stopu preživljavanja. Kortikalni neuroni izolirani iz štakora i nasađeni u medij bez seruma imali su nižu stopu preživljavanja u kulturama s manjom gustoćom stanica te su proizvodili manje ATP-a (Fujita i sur. 2001).

TNT-ovi su opisani *in vitro* i u početnim istraživanjima postavljalo se pitanje postoje li u tkivima i koja je njihova uloga (Gurke i sur. 2008). Od tada, TNT-ovi su pronađeni *in vivo* u stanicama pacijenata s karcinomom pločastih stanica, mezoteliomom i različitim leukemijama, što ukazuje na potrebu razvoja 3D modela za proučavanje ovih struktura (Pinto i sur. 2020). S druge strane, TM-ovi su prvotno opisani *in vivo* između stanica ljudskog glioblastoma u modelu miša (Osswald i sur. 2015).

1.7.1. Rast stanica u kulturama s ograničenim prostorom – mikropaternirane kulture

Mikropaternirane kulture su jedna od metoda za istraživanje utjecaja staničnog okruženja na fenotip stanice. Okruženost susjednim stanicama utječe na preživljavanje stanica i poboljšava odgovor stanica na stresne podražaje, a uz to utječe i na kretanje i polarnost stanica (Zhang 2004). Ova metoda omogućava istraživanje stanica koje rastu samostalno ili u manjim skupinama na ograničenom području i u definiranom mikrookolišu. Pretežno se koristi za istraživanja utjecaja ograničene površine na pokretljivost i polarnost stanica (Segerer i sur 2016). You i sur. (2008) otkrili su da su stanice osteoblasta u mikropaterniranim kulturama osjetljivije na mehanički stres, što znači da se ova metoda može koristiti za istraživanje stresa i važnosti međustaničnih interakcija.

Jedan od načina izrade mikropaterniranih kultura je metoda fotolitografije (Segerer i sur. 2016). Na podlogu za rast stanica stavi se polimer koji odbija stanice. Korištenjem UV zračenja i fotomaske dijelovi polimera se unište i dobije se podloga s „otočićima“ definirane veličine na kojoj stanice mogu rasti.

1.7.2. 3D kulture

Potreba za 3D staničnim kulturama nastala je zbog istraživanja učinkovitosti novih lijekova. Rezultati dobiveni u klasičnim 2D kulturama nisu se poklapali sa rezultatima dobivenima *in vivo*. Kao jedna od najvažnijih nedostataka u 2D kulturama pokazao se nedostatak izvanstaničnog matriksa, kao što je već objašnjeno. Jedna od karakteristika tumora je to što je okružene zdravim stanicama, s kojima također komunicira. U tumorima postoje razlike u rezistenciji na lijekove i dostupnosti hranjivih tvari i kisika. U 2D kulturama ove se značajke zanemaruju u istraživanjima (Langhans 2018).

Postoje različite metode izrade 3D kultura, a mogu se podijeliti na metode u kojima se koristi okvir ili nosač (engl. *scaffold*) i metode bez okvira (Langhans 2018). Kao okvir se mogu koristiti komponente kao kolagen, matrigel ili sintetski dobiveni polimeri kao PLL-PEG polimer (poli-L-lizin s bočnim lancima polietilen glikola). U metodama bez okvira cilj je potaknuti stanice da se samostalno organiziraju u sferoidnu strukturu i počnu lučiti komponente izvanstaničnog matriksa, što se najčešće postiže ograničavanjem volumena posude za uzgoj i podlogama koje sprečavaju adheziju stanica (Langhans 2018). S razvojem medicine i operativnih postupaka, razvile su se nove metode izrade 3D kultura koje se temelje na 3D bioprintanju koje omogućuje izradu tkiva i organa pomoću 3D printera.

1.7.3. Metoda magnetske levitacije za uzgoj 3D staničnih kultura

Metoda magnetske levitacije je metoda izrade 3D kultura bez uporabe kalupa (Souza i sur. 2010). U klasičnu 2D kulturu dodaju se nanočestice koje ulaze u stanice. Nanočestice se sastoje od željezova(III) oksida, nanočestica zlata i hidrogela sastavljenog od filamentoznih niti bakteriofaga ili poli-L-lizina. Za postizanje levitacije stanica bitno je da se nanočestice sastoje od svih navedenih komponenti, kako bi se formirala povezana smjesa (Souza i sur. 2010). Izlaganjem magnetu stanice počinju levitirati u stupcu medija i formiraju sferoidnu strukturu. Prednost ove metode je što izlučene komponente izvanstaničnog matriksa nisu fiksnog, predodređenog sastava, kao što je slučaj kod 3D kultura s okvirom, koji se s vremenom može degradirati.

Souza i sur. (2010). proučavali su efikasnost metode usporedbom lokalizacije proteina N-kadherina u stanicama glioblastoma u 2D kulturama, 3D kulturama i u ksenograftu ljudskih tumora implantiranih u miševu. N-kadherin je u stanicama 2D kultura bio lokaliziran u citoplazmi i jezgri, a u 3D kulturama i ksenograftima tumora u citoplazmi, na staničnoj membrani i na mjestima adherentnih spojeva. N-kadherin sudjeluje u formaciji adherentnih spojeva pri čemu je ključna njegova interakcija s proteinima izvanstaničnog matriksa, fibronektinom, integrinima i tenzinom (Lefort i sur. 2010), što ukazuje na prisutnost komponenti izvanstaničnog matriksa u 3D kulturama.

Haisler i sur. (2013) potvrdili su lokalizaciju N-kadherina na staničnoj membrani u 3D kulturama stanica A549. Uz to su pokazali i prisutnost E-kadherina, mucina-5AC i citokeratina-19 kojima su dokazali da su stanice zadržale funkciju i fenotip karakterističan tim stanicama.

1.8. Fluorescencijska mikroskopija

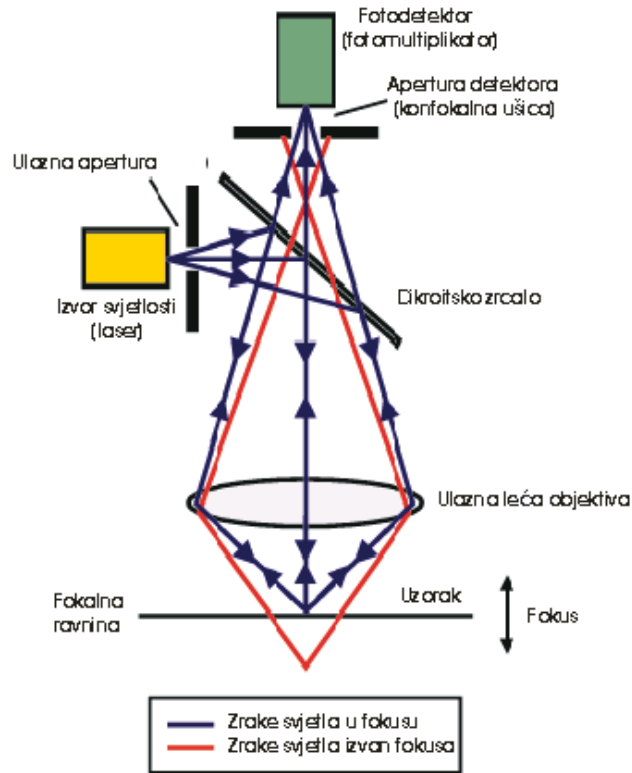
Fluorescencijska mikroskopija je metoda sa širokom primjenom u staničnoj i molekularnoj biologiji. Koristi se u istraživanjima mikroskopskih jednostaničnih i višestaničnih organizama, tkiva, stanica i proteina. Omogućava proučavanje kretanja i interakcija između stanica, kao i dinamiku staničnih komponenti. Moguća su dugotrajna snimanja i praćenje staničnih procesa kao što je mitoz.

Fluorescencija je emisija svjetlosti do koje dolazi nekoliko nanosekundi nakon apsorpcije. Zbog gubitka dijela energije emitirano zračenje je veće valne duljine od apsorbiranog, što se naziva Stokesov pomak. Emitirana svjetlost ima pomak prema crvenom dijelu spektra zračenja, koje ima veće valne duljine i manju energiju (Sanderson i sur. 2014).

Za mikroskopiranje potrebni su fluorescentno označeni uzorci. Danas su komercijalno dostupne različite fluorescentne boje koje se specifično vežu za pojedine stanične komponente. To su često organske molekule koje u svojoj strukturi imaju aromatske prstene s delokaliziranim elektronima, koji se pobuđuju apsorpcijom energije. Te funkcionalne skupine nazivaju se fluorofori (Lichtman i Conchello 2005). Fluorescentne boje su brza i jednostavna metoda, no treba uzeti u obzir da mogu imati toksičan učinak na stanice. Često su otopljene u aprotičnom otapalu dimetil sulfoksidu, DMSO, čiju su toksičnost u ganglijskim stanicama mrežnice RGC-5 (engl. *retinal ganglion cells*) pokazali Galvao i sur. (2014). Metodom rekombinantne DNA moguće je vezanje fluorescentnih proteina kao što su GFP (engl. *green fluorescent protein*), YFP (engl. *yellow fluorescent protein*), mCherry, RFP (engl. *red fluorescent protein*) i slični na željeni protein, čime se dobiju stanične linije sa stabilnom ekspresijom fluorescentnih proteina.

1.8.1. Konfokalna mikroskopija

Jedna od metoda fluorescencijske mikroskopije je konfokalna laserska pretražna mikroskopija CLSM (engl. *confocal laser scanning microscopy*) (Sanderson i sur. 2014). Omogućuje detekciju svjetlosti iz tankog sloja u uzorku. Karakteristika konfokalne mikroskopije je da osvjetljava dio po dio uzorka. Emitirana svjetlost pobuđenih fluorofora bilježi se detektorom i cjelovita slika uzorka prikazuje se na računalo. Ispred detektora nalazi se konfokalna apertura, koja omogućava da u detektor dođe samo svjetlost sa promatranog sloja uzorka, dok se svjetlost iz ostalih slojeva uzorka blokira, čime se dobiva oštija slika (Slika 4). Konfokalna apertura nalazi se u optičkoj ravnini konjugiranoj fokalnoj ravnini objektiva, po čemu je ova metoda fluorescencijske mikroskopije dobila naziv.



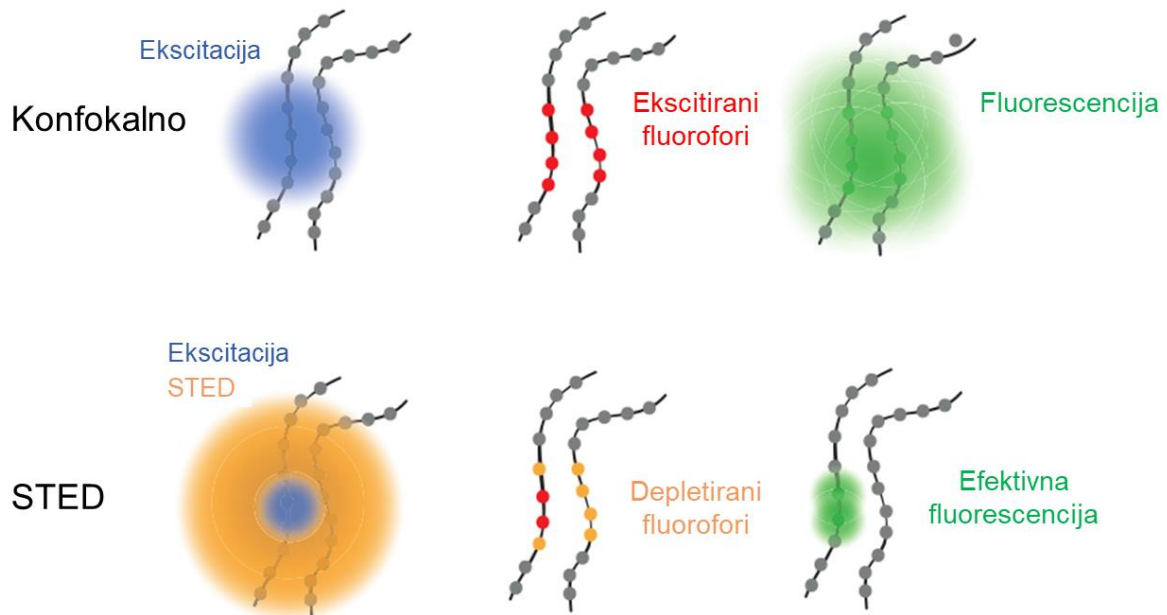
Slika 4. Shematski prikaz dijelova konfokalnog mikroskopa i prolaska zraka svjetlosti kroz uređaj. Zraka svjetlosti iz izvora, lasera, prolazi kroz ulaznu aperturu. Zrake se odbijaju od dikroitskog zrcala i dolaze do uzorka. Fluorofori apsorbiraju svjetlosti i emitiraju zračenje veće valne duljine koje prolazi kroz aperturu detektora, konfokalnu aperturu i dolazi do fotodetektora, gdje se zrake pretvaraju u električne impulse koji omogućavaju stvaranje slike na računalu. (Preuzeto: <https://www2.irb.hr/korisnici/iweber/fluovis/konfokalna.htm>).

1.8.2. Super-rezolucijska mikroskopija

Super-rezolucijska STED (engl. *stimulated emission depletion*) mikroskopija bazira se na principima rada konfokalne laserske pretražne mikroskopije (Sanderson i sur. 2014). Ekscitacijska zraka svjetlosti preklapa se sa zrakom STED lasera, koja je u poprečnom presjeku prstenasta (engl. *doughnut-shaped*). Takav oblik STED zrake postiže se pomoću fazne ploče koja urokuje interferenciju svjetlosti. U zoni preklapanja ekscitacijske i STED zrake, STED laser prigušuje fluorescenciju, tako što depletira fluorofore, a fluorofori koji se nalaze u regiji u kojoj se ne preklapaju zrake fluoresciraju (Slika 5). Na taj način se smanjuje mjesto ekscitacije u uzorku.

Prednost ove metode je što omogućuje dobivanje veće rezolucije (Jacquemet i sur. 2020). U konfokalnoj mikroskopiji, kao i klasičnoj optičkoj mikroskopiji, rezolucija je ograničena Abbeovom granicom difrakcije

svjetlosti, koja iznosi 250 nm, što znači da se objekti koji se nalaze na manjoj udaljenosti ne mogu razlučiti. Metodom prigušivanja fluorescencije može se dobiti rezolucija od 20 nm.



Slika 5. Shematski prikaz fluorescencije uzoraka u STED mikroskopiji. STED laser na mjestu preklapanja s ekscitacijskim laserom prigušuje fluorescenciju. (Preuzeto i prilagođeno prema: <https://svi.nl/STED-Microscopy>)

2. Cilj istraživanja

Cilj ovog diplomskog rada je opisati TNT-ove i TM-ove u stanicama U2OS. Kvantificirat će se brojnost TNT-ova i TM-ova i istražiti kako stresni podražaji utječu na brojnost tih struktura uz pretpostavku da će stanice pod stresom stvarati više TNT-ova i TM-ova. Mjerit će se duljina i širina TNT-ova i TM-ova i opisat će se razlike u morfologiji. Istražit će se koliko TNT-ova i TM-ova sadrži mikrotubule i je li moguć transport mitohondrija kroz njih.

Nadalje, cilj ovog rada je pogledati kako stanice reagiraju na stresne podražaje ovisno o 2D i 3D tipu staničnog okruženja i vidjeti imaju li TNT-ove i TM-ove ili neke druge promjene izazvane stresnim podražajima. U tu svrhu stanične kulture tretirat će se s inhibitorom proteina sHSP27 koji ima funkciju u staničnom odgovoru na stres i tretmanom hladnoćom. Količina stresa mjerit će se kao intenzitet fluorescencije boje za detekciju oksidativnog stresa CellROX™ Deep Red Reagent. Uspostavit će se protokol za izradu 3D kultura pomoću magnetske levitacije stanica i za provođenje osnovnih postupaka poput fiksacije, bojanja stanica i mikroskopiranja.

3. Materijali i metode

3.1. Stanična kultura

Za provedbu pokusa koristila sam adherentnu tumorsku staničnu liniju koštanog osteosarkoma U2OS, s ekspresijom kinetohornog proteina CENP-A, označenog GFP proteinom i tubulina označenog crvenim fluorescentnim proteinom mCherry. Kulture stanica uzgajala sam u inkubatoru Galaxy 170S (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) pri stalnim uvjetima od 37 °C i 5 % ugljikovog dioksida. Stanice sam uzgajala u sterilnoj posudi za uzgajanje, površine 75 cm² (Corning, New York, SAD) u mediju DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Lonza, Bazel, Švicarska). U medij DMEM dodala sam 10 % otopine FBS (engl. *fetal bovine serum*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), 100 µg / mL penicilina (Biochrom AG, Berlin, Njemačka), 100 µg / mL streptomocina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) i 50 µg / mL geneticina (Life Technologies, Waltham, MA, SAD). Medij sam profiltrirala prije korištenja kroz filter sa PES (poli(eter-sulfon)) membranom i porama promjera 0,22 µm (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švicarska).

Stanice sam presađivala svakih 72 do 96 sati kada bi dosegnule 100 %-tnu konfluentnost. Uklonila sam stari medij iz posude za uzgoj stanica. Isprala sam posudu sa 10 mL 1 %-tne sterilne otopine ROTI[®]Cell PBS CELLPURE[®] (engl. *phosphate-buffered saline*, u daljnjem tekstu: PBS) (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka). Stanice sam odlijepila od podloge dodatkom 1 mL 1 %-tne otopine tripsin/EDTA (Biochrom AG, Berlin, Njemačka) i inkubirala 5 minuta na 37 °C i 5 % ugljikovog dioksida. U posudu za uzgoj dodala sam 2 mL medija zagrijanog na 37 °C i pomiješala sa stanicama kako bi inaktivirao djelovanje tripsina. 500 µL suspenzije stanica stavila sam u novu posudu za uzgoj i dodala 10 mL zagrijanog medija. Pojedinu staničnu kulturu koristila sam do dvadesete pasaže.

3.2. Priprema 2D kultura

Napomena: Prilikom rada sa uzorcima 2D i 3D kultura, posudice za mikroskopiranje nije preporučljivo protresati ili miješati zato što se primjenom mehaničke sile oštećuju premošćujuće strukture (Koyanagi i sur. 2005).

Za promatranje premošćujućih struktura prvenstveno sam trebala odrediti optimalnu konfluentnost stanica u posudi za mikroskopiranje. U posudice sam stavila $5 \cdot 10^5$, $2,5 \cdot 10^5$, $2 \cdot 10^5$ i $1,5 \cdot 10^5$ stanica na 1 mL medija. Odredila sam da je optimalna koncentracija za promatranje premošćujućih struktura $2,5 \cdot 10^5$ stanica na 1 mL. Pri toj koncentraciji stanice su 60 do 70 % konfluentne. Odabrala sam tu koncentraciju, zato što su

stanice u kontaktu, ali između njih ima prostora u kojem je moguća formacija premošćujućih struktura, koji se lako vizualiziraju tijekom snimanja.

Stanice iz posude za uzgajanje nasadila sam u posudicu za mikroskopiranje. Koristila sam plastične posudice promjera 35 mm, sa središnjim staklenim dijelom promjera 14 mm i površine 9 cm² (MatTek Corporation, Ashland, SAD). Za nasađivanje stanica prvo sam uklonila stari medij iz posude za uzgajanje, isprala sa 10 mL 1 %-tne otopine PBS-a i dodala 1 mL otopine tripsin/EDTA. Inkubirala sam stanice 5 minuta u inkubatoru na 37 °C i 5 % ugljikovog dioksida. Dodala sam 2 mL medija zagrijanog na 37 °C i pomoću serološke pipete pomiješala stanice koje su se odvojile od podloge s medijem. 1 do 2 mL suspenzije stanica, ovisno o konfluentnosti stanica u posudi za uzgajanje, stavila sam u konikalnu tubicu za centrifugu od 15 mL (Corning, New York, SAD) i dodala medij da ukupni volumen u tubici bude 3 mL. Suspenziju stanica dobro bih pomiješala i 20 µL stavila na hemocitometar Neubauer improved (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) za brojanje stanice. U posudu za mikroskopiranje stavila sam 250000 stanica na 1 mL medija. Stanice sam inkubirala u posudicama 24 sata prije mikroskopiranja, zato što su Koyanagi i sur. (2005) pokazali da je broj TNT-a u 2D kulturi najveći nakon 24 sata.

Za provođenje eksperimenata za promatranje razine induciranog stresa stanice sam nasađivala u posudice za mikroskopiranje samo na središnji stakleni dio posude kako bih smanjila količinu boje koju je potrebno dodati. Ukupni volumen u središnjem staklenom dijelu posude je 400 µL. Stanice sam nasađivala da postignu konfluentnost 70 %.

3.3. Izrada 3D kultura

Za izradu 3D kultura koristila sam 6 Well Bio-Assembler™ Kit (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austrija) koji se sastoji od otopine NanoShuttle™-PL, magneta za levitaciju, magneta za privlačenje 3D struktura, ploče sa 6 jažica sa dnom koje sprečava adheziju stanica i središnje ploče koja sprečava direktan kontakt magneta sa sadržajem u jažicama. Otopina NanoShuttle™-PL sadrži nanočestice potrebne za magnetsku levitaciju. Sastoji se od željezova(III) oksida, nanočestica zlata stabiliziranih s citratnim ionima promjera manjeg od 100 nm i poli-L-lizina.

Već 30 minuta nakon izlaganja magnetu, stanice se okupljaju na površini medija ispod magneta, a nakon 24 sata formiraju se kohezivne nakupine stanica (Souza i sur. 2010). Kako bih dobila čvršću i kompaktniju strukturu 3D kulture inkubirala sam minimalno pet dana prije mikroskopiranja.

Prije izrade 3D kultura odredila sam optimalnu koncentraciju otopine NanoShuttle™-PL koju je potrebno dodati u stanice. Haisler i sur. (2013) u svome protokolu opisali su izradu 3D kultura u posudi za uzgoj

stanica, površine 75 cm^2 i preporučili da se stavi $8 \mu\text{L} / \text{cm}^2$ otopine NanoShuttle™-PL. Souza i sur. (2010) u uzorke za izradu 3D kultura stavili su $1 \mu\text{L} / \text{cm}^2$ hidrogela s česticama zlata i željezovim magnetitom koji su sami pripravili. Umjesto u posudi za uzgoj, stanice za izradu 3D kultura uzgajala sam u posudi za mikroskopiranje površine 9 cm^2 . Isprobala sam izradu 3D kultura sa $6,67 \mu\text{L} / \text{cm}^2$, $3,33 \mu\text{L} / \text{cm}^2$, $1,67 \mu\text{L} / \text{cm}^2$ i $1 \mu\text{L} / \text{cm}^2$ otopine NanoShuttle™-PL. 3D strukture formirale su se jednako, neovisno o količini otopine. Iz toga razloga odlučila sam da ću 3D kulture raditi s najmanjom koncentracijom otopine NanoShuttle™-PL.

Prvi dan u posudu za mikroskopiranje stavila sam $2,5 \cdot 10^5$ stanica na 1 mL medija kako bih dobila 70 % konfluentne stanice, na način kao što sam opisala u protokolu za izradu 2D kultura. Drugi dan u posudu za mikroskopiranje dodala sam $9 \mu\text{L}$ otopine NanoShuttle™-PL. Stanice sam inkubirala preko noći. Treći dan stanice sam nasađivala na ploču sa 6 jažica. Posudu za mikroskopiranje isprala sam sa 1 mL 1 %-tne otopine PBS-a. Dodala sam 0,5 mL otopine tripsin/EDTA i inkubirala 5 minuta. U posudu sam dodala 2 mL zagrijanog medija i pipetom pomiješala stanice s medijem. Suspenziju stanica stavila sam u konikalnu tubicu za centrifugu od 15 mL. U posudu sam dodala još dva puta po 1 mL zagrijanog medija kako bih isprala posudu i sve odlijepljene stanice prebacila u konikalnu tubicu. Suspenziju stanica centrifugirala sam 5 minuta na $15 \text{ }^\circ\text{C}$ i 800 rpm, kako bih uklonila ostatke otopine tripsin/EDTA. Bacila sam supernatant i stanice resuspendirala u 2 mL zagrijanog medija. Suspenziju stanica stavila sam u jažicu. Na ploču sa jažicama stavila sam središnju ploču za zaštitu i poklopila s magnetom za levitaciju. 3D kulture inkubirala sam u inkubatoru na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ i 5 % ugljikovog dioksida najmanje pet dana.

Za mikroskopiranje i provođenje tretmana na 3D kulturama, strukture sam laganim pipetiranjem prebacila na stakleni dio posudice za mikroskopiranje u $400 \mu\text{L}$ zagrijanog medija i ispod posudica stavila magnet za privlačenje kako bi držao strukture na podlozi tijekom mijenjanja otopina u posudici.

3.4. Izrada mikropatneriranih kultura metodom fotolitografije

Za izradu mikropatneriranih kultura koristila sam sljedeće kemikalije:

- $10 \text{ mmol} / \text{dm}^{-3}$ otopinu HEPES-a, (zwitterion sulfonske kiseline) (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka), pH = 7,4
- $0,1 \text{ mg} / \text{mL}$ otopinu PLL-PEG polimera (poli-L-lizin s bočnim lancima polietilen glikola) (SuSoS AG, Dübendorf, Švicarska) u $10 \text{ mmol} / \text{dm}^{-3}$ otopini HEPES-a, pH = 7,4
- $100 \text{ mmol} / \text{dm}^{-3}$ otopina NaHCO_3 (Merck, Darmstadt, Njemačka), pH = 8,4

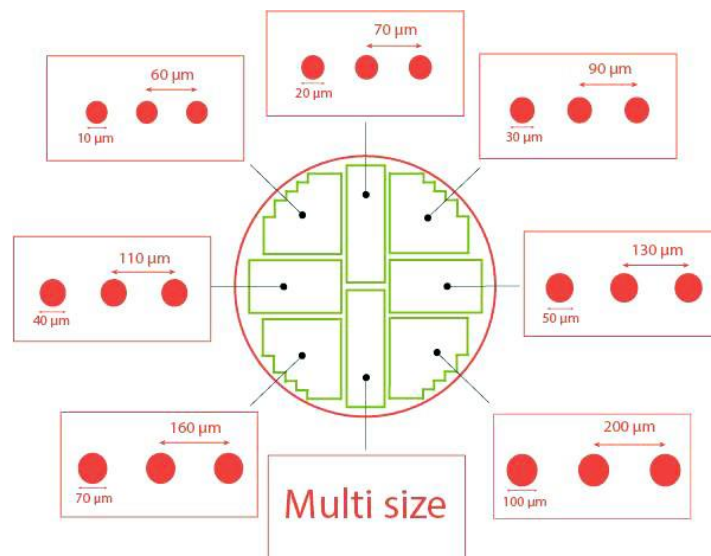
- 10 μg / mL otopinu fibronektina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) u 100 mmol / dm^{-3} otopini NaHCO_3 , pH = 8,4

Mikropatnerirane kulture radila sam na okruglim pokrovnim stakalcima promjera 25 mm. Stakalca sam prvo oprala u 100 %-tnom acetonu, da ih očistim od organskih nečistoća, a potom u 100 %-tnom izopropanolu, da ih očistim od anorganskih nečistoća. Stakalca sam do korištenja držala u izopropanolu.

Suha stakalca stavila sam u UV ozonski čistač (Ossila Ltd, Sheffield, Velika Britanija). Uređaj ima kvarcnu UV lampu koja emitira UVC zračenje s emisijskim maksimumom pri valnoj duljini 185 nm i 254 nm. Zračenje valne duljine 185 nm apsorbira kisik iz zraka i nastaje ozon koji reagira s površinskim molekulama na stakalcu, a zračenje valne duljine 254 nm apsorbiraju organske molekule na stakalcu pri čemu dolazi do njihovog isparavanja. Stakalca sam izlagala UV zračenju pet minuta. Gornja strana stakalca, okrenuta prema UV lampi, se oksidira i ta strana je aktivirana.

Na aktiviranu stranu stavila sam 100 μL PLL-PEG polimera tako da sam otopinu stavila na parafilm i prekrila stakalcem. PLL-PEG polimer inkubirala sam 30 minuta na sobnoj temperaturi. Stakalca sam odlijepila s 1 mL otopine HEPES-a, tako da sam ju pipetom dodala između stakalca i parafilma. Nakon što se stakalca osuše stavila sam ih u fotomasku (4Dcell, Montreuil, Francuska). Fotomaska ima kromnu i kvarcnu stranu te iscertan uzorak kao što je vidljivo na slici 6 kroz koji UV zrake prolaze i na tim mjestima stvaraju „otočiće“ u PLL-PEG polimeru. Prije korištenja fotomasku sam očistila običnim deterdžentom, isprala sam je s redestiliranom vodom da se ne stvori kamenac i osušila mlazom komprimiranog zraka. Aktiviranu stranu stakalca sam zalijepila na kromnu stranu fotomaske s 5 μL redestilirane vode. Fotomasku sa stakalcima sam izložila UV zračenju 15 minuta na način da je kvarcna strana okrenuta prema UV lampi. Stakalca sam odlijepila pomoću 1 mL redestilirane vode. Aktiviranu stranu inkubirala sam 30 minuta na 100 μL fibronektina na parafilmu. Stakalca sam odvojila s 1 mL otopine NaHCO_3 . Do korištenja sam ih čuvala na 4 °C.

Mikropatnerirana stakalca stavila sam u posudu za mikroskopiranje i nasadila stanice na isti način kao i za pripremu 2D kultura. Za mikroskopiranje živih uzoraka koristila sam Chamlide komoru za okrugla stakalca, a fiksirani uzorci stavila sam na predmetno stakalce.



Slika 6. Shematski prikaz uzorka koji nastaje na stakalcu nakon izlaganja PLL-PEG polimera prekrivenog fotomaskom UV zračenju (Preuzeto: <https://www.4dcell.com/>)

3.5. Tretiranje uzoraka

Za inhibiciju proteina sHSP27 stanice sam tretirala tri sata s inhibitorom J2 (MedChem Express, Monmouth Junction, SAD) koncentracije $50 \text{ nmol} / \text{dm}^{-3}$. Pri koncentraciji $100 \text{ nmol} / \text{dm}^{-3}$ stanice u 2D kulturama su umirale pa sam izabrala manju koncentraciju. Stanice sam izlagala hladnoći tako da sam u uzorke stavila hladan medij i 15 minuta ih držala na $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Uzorke sam vratila u inkubator gdje su se tri sata oporavljali. U pokusu gdje sam stanice tretirala inhibitorom J2 i izlagala hladnoći prvo sam dodala inhibitor J2, inkubirala sam stanice 15 minuta, stavila ih 15 minuta na $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ i nakon toga vratila u inkubator 3 sata.

3.6. Fiksacija uzoraka

Stanice sam fiksirala s 4 %-tnom otopinom formaldehida (BioGnost Ltd, Zagreb, Hrvatska). Uzorke za promatranje premošćujućih struktura fiksirala sam tako da sam iz posude za mikroskopiranje pipetom uklonila medij. Dodala sam 1 mL formaldehida i inkubirala 20 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga pipetom sam uklonila otopinu formaldehida i dodala 1 mL otopine 1 %-tnog PBS-a kako bih isprala ostatke formaldehida s uzorka. Inkubirala sam pet minuta na sobnoj temperaturi. Postupak ispiranja ponovila sam tri puta.

Uzorke za mjerenje razine inducirano g stresa fiksirala sam na način da bih nakon bojanja s CellROX™ Deep Red Reagent (u daljnjem tekstu: CellROX) (Invitrogen, Waltham, MA, SAD) dodala $400 \text{ } \mu\text{L}$ 4 %-tne

otopine formaldehida, inkubirala 10 minuta i jednom isprala sa 400 μL 1 %-tnog PBS-a. U 2D kulture stavila sam 50 μL medija Abberior Mount LIQUID (Abberior Instruments GmbH, Göttingen, Njemačka), a u 3D kulture stavila sam 5 μL medija i pokrila ih pokrovnim stakalcem promjera 9 mm kako bih ih fiksirala, jer kulture nisu vezane za podlogu.

3.7. Bojanje uzoraka

Za klasifikaciju i analizu premošćujućih struktura trebala sam fluorescentno označiti staničnu membranu te uz nju F-aktin, α -tubulin, protein sHSP27 ili mitohondrije. α -tubulin i protein sHSP27 sam označila imunohistokemijskom metodom bojanja. Razinu stresa mjerila sam pomoću boje koja reagira sa reaktivnim kisikovim radikalima, ROS-ovima u stanicama pri čemu fluorescira.

Staničnu membranu u živim i fiksiranim stanicama označila sam bojom Wheat Germ Agglutinin, Alexa Fluor™ 594 Conjugate (u daljnjem tekstu: WGA) (Invitrogen, Waltham, MA, SAD), koncentracije 5 μg / mL. F-aktin u fiksiranim stanicama označila sam bojom SiR-Actin (engl. *silicon rhodamine*) (Spirochrome AG, Stein am Rhein, Švicarska) koncentracije 100 nmol / dm^{-3} . Mitohondrije u živim stanicama obojala sam sa MitoTracker™ Green FM (Invitrogen, Waltham, MA, SAD) koncentracije 100 nmol / dm^{-3} . CellROX™ Deep Red Reagent (Invitrogen, Waltham, MA, SAD) za mjerenje razine induciranog stresa koncentracije 2,5 μmol / dm^{-3} koristila sam prije fiksacije uzoraka. Svi uzorci inkubirani su 30 minuta nakon dodatka boja.

3.7.1. Imunohistokemijska metoda bojanja stanica

Imunohistokemijsku metodu bojanja stanica koristila sam za bojanje α -tubulina i proteina sHSP27 u stanicama u 2D kulturi. Fiksirala sam stanice 4 %-tnom otopinom formaldehida i isprala tri puta s 1 %-tnom otopinom PBS-a, kao što sam već opisala. Dodala sam 1 mL blokirajućeg pufera i inkubirala 30 minuta na sobnoj temperaturi. Blokirajući pufer sadrži nespecifične proteine koji se vežu na razna mjesta u uzorku i na taj način smanjuju vjerojatnost da će se antitijela vezati na nespecifična mjesta. Time se smanjuje pozadinska fluorescencija. Blokirajući pufer sastoji se od 1 %-tne otopine PBS-a, 0,4 % Tritona X-100 i 1 % NGS-a (engl. *normal goat serum*) (Termo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Dodala sam otopinu primarnog antitijela i blokirajućeg pufera. Uzorke sam inkubirala 24 sata u mraku na 4 °C. Isprala sam primarno antitijelo sa 1 mL 1 %-tne otopine PBS-a. Postupak sam ponovila tri puta. Dodala sam otopinu sekundarnog antitijela i blokirajućeg pufera i inkubirala uzorke sat vremena u mraku na sobnoj temperaturi. Isprala sam uzorke tri puta sa 1 mL 1 %-tne otopine PBS-a. Uzorke sam čuvala u mraku na 4 °C do upotrebe.

Za označavanje α -tubulina koristila sam primarno antitijelo Conjugated rabbit anti- α -tubulin ab18251 (Abcam, Cambridge, Velika Britanija) i sekundarno antitijelo Alexa Fluor 488 conjugated donkey anti-rabbit ab150061 (Abcam, Cambridge, Velika Britanija), a za snimanje na super-rezolucijskom mikroskopu STED koristila sam sekundarno antitijelo STAR RED anti-rabbit (Abberior Instruments GmbH, Göttingen, Njemačka). Za označavanje proteina sHSP27 koristila sam primarno antitijelo Recombinant mouse anti-sHSP27 ab2790 (Abcam, Cambridge, Velika Britanija) i sekundarno antitijelo Donkey anti-mouse Alexa Fluor 488 ab150109 (Abcam, Cambridge, Velika Britanija).

3.8. Mikroskopiranje

3.8.1. Konfokalna mikroskopija

Premošćujuće strukture snimala sam laserskim pretražnim konfokalnim mikroskopom Bruker Opterra Multipoint Scanning (Bruker, Nano Surfaces, Middleton, WI, SAD). Sustav je postavljen na Nikonov preokretni mikroskop Ti-E s uljnim objektivom Nikon CFI Plan Apo VC $\times 100 / 1,4$ (Nikon, Tokio, Japan). Stanice sam snimala pri stalnim uvjetima od 37 °C i 5 % ugljikovog dioksida u inkubatoru Okolab Cage (Okolab, Pozzuoli, NA, Italija). Slike sam snimila kamerom Evolve 512 Delta EMCCD (Photometrics, Tucson, AZ, SAD). Postavke mikroskopa i rad sustava namjestila sam pomoću programa Prairie View Imaging Software (Bruker, Nano Surfaces, Middleton, WI, SAD). Za laserski pretražni konfokalni mikroskop karakteristična je točkasta izlazna apertura (engl. *pinhole*), koja se može podešavati, a ovaj sustav nudi i odabir proreza (engl. *slits*) koji se također mogu podešavati. U mjerenjima sam izabrala prorez od 22 μm . Mitohondrije, mikrotubule i protein sHSP27 snimala sam s laserom pobudne valne duljine 488 nm, staničnu membranu s pobudnom valnom duljinom 561 nm i aktin s pobudnom valnom duljinom 640 nm. Premošćujuće strukture snimala sam u 2D kulturama, tako da snimam 2,5 μm iznad središta strukture i ispod s 0,5 μm razmaka između Z-ravnina. Za svaku strukturu snimila sam 11 ravnina. Za snimanje cijele premošćujuće strukture najčešće su dovoljne 3 do 4 ravnine, ali snimala sam više ravnina da vidim jesu li strukture vezane za podlogu.

3.8.2. Super-rezolucijska mikroskopija

3D kulture i uzorke za mjerenje razine induciranog stresa snimala sam na super-rezolucijskom mikroskopu STED, Expert Line easy3D STED (Abberior Instruments GmbH, Göttingen, Njemačka). Karakteristika super-rezolucijskog mikroskopa STED je stimulirana deplecija emisije, što znači da se tijekom snimanja pojedini fluorofori selektivno deaktiviraju pri čemu se smanjuje iluminacija i moguće je dobiti snimke bolje

rezolucije. Sustav je opremljen s Olympus IX83 inverznim mikroskopom, Widefield LED osvjetljenjem na 405nm, 470nm, 590nm i 635nm i Widefield monokromatskom kamerom 1/2" CCD, 1280x960 piksela. Sustav ima Z-Piezo P-736 skener sa piezo motorima i Olympus Z-drift kompenzaciju za konfokalni i STED način. Mikroskop ima vodeni objektiv Olympus 60× / NA 1,2 i uljni objektiv 100× / NA 1,4. Mikroskop ima cw laser pobudne valne duljine 405 nm, impulsne lasere pobudne valne duljine 485 nm, 561 nm i 640 nm i impulsni STED laser valne duljine 775 nm. Uzorke sam stavljala na pomičnu inkubacijsku komoru s temperaturom od 37 °C i dovodom ugljikovog dioksida što omogućuje snimanje živih stanica. Postavke mikroskopa kontrolirala sam pomoću softwarea Inspector Software Package for Data Acquisition and Analysis i pomoću U-MCZ Olympus kontrolera.

Za mjerenje razine induciranog stresa u svim uzorcima snimala sam četiri Z-ravnine sa razmakom 0,5 μm između ravnina s impulsnim pobudnim laserom valne duljine 640 nm u konfokalnom načinu.

Na super-rezolucijskom STED snimila sam i premošćujuće strukture, da ih usporedim sa snimkama dobivenim konfokalnom mikroskopijom. Mitohondrije sam snimala s impulsnim pobudnim laserom valne duljine 485 nm u konfokalnom načinu, staničnu membranu s impulsnim pobudnim laserom valne duljine 561 nm u konfokalnom i STED načinu i mikrotubule s impulsnim pobudnim laserom valne duljine 640 nm u konfokalnom i STED načinu.

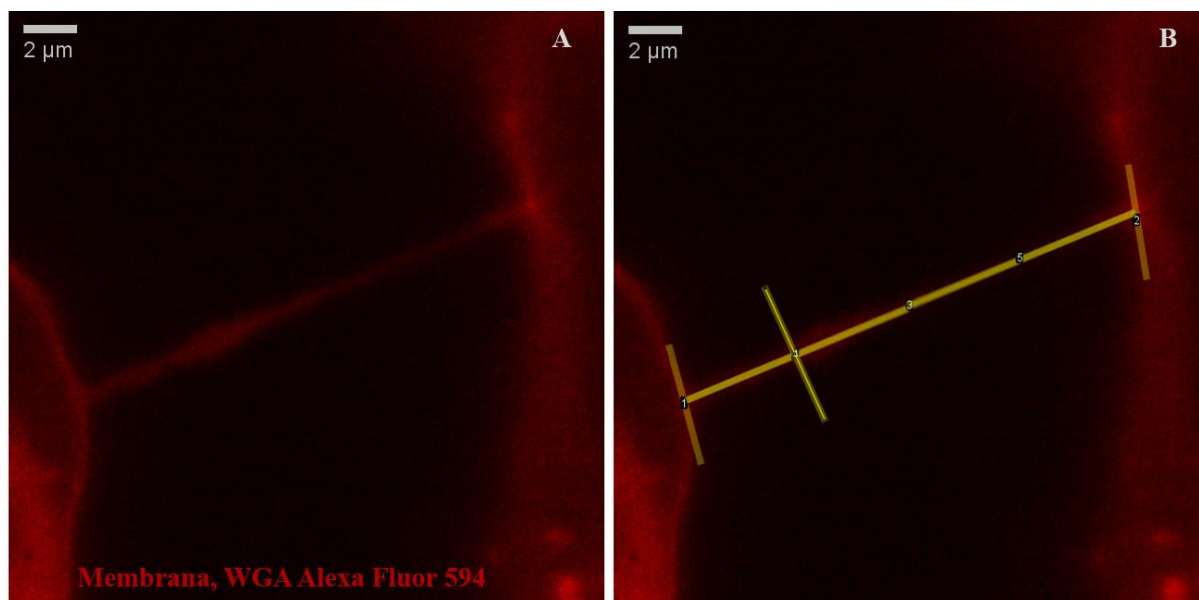
3.9. Analiza snimaka

Mikroskopske snimke analizirala sam pomoću programa ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, SAD). ImageJ je javno dostupan program za obradu snimaka temeljen na programskom jeziku Java (Oracle Corporation, Redwood, SAD). Program ima traku izbornika, alatnu traku i traku pozicije. Alatna traka sadrži alate za označavanje i odabir dijelova slike pomoću kojih se može mjeriti razne strukture.

3.9.1. Mjerenje premošćujućih struktura

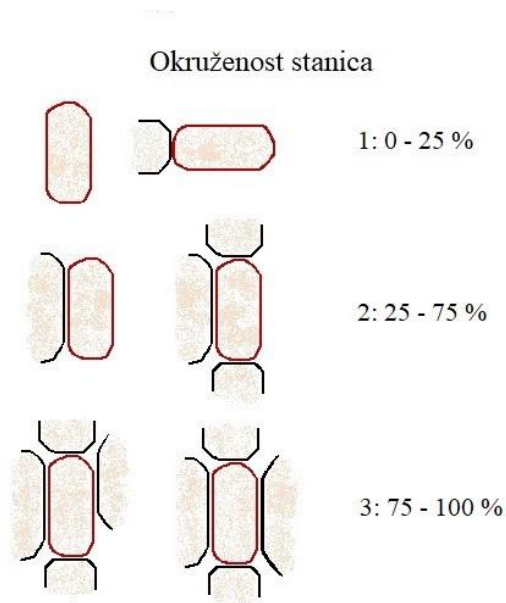
Premošćujućim strukturama mjerila sam duljinu i širinu te sam određivala broj premošćujućih struktura u uzorcima. Izabrala sam sve Z-ravnine u kojima se vidi struktura i spojila ih u jednu sliku (Image – Stacks – Z Project... – Sum Slices). Na taj način dobila sam prikaz cijele strukture što omogućava preciznija mjerenja od onih na samo jednoj Z-ravnini. Označila sam krajeve strukture i pomoću segmentirane linije (engl. *segmented line*) izmjerila duljinu strukture (Analyze – Measure). Širinu struktura mjerila sam tako da na polovini i četvrtinama strukture ravnom linijom (engl. *straight line*) povučem okomicu na strukturu kao što je prikazano na slici 7. ImageJ omogućava prikaz intenziteta fluorescence linije pa se na mjestu gdje linija

prolazi kroz strukturu vidi porast intenziteta fluorescencije. Iz dvodimenzionalnog grafičkog prikaza koji prikazuje duljinu u mikrometrima na x-osi i intenzitet fluorescencije na y-osi, oduzela sam intenzitet fluorescencije pozadine na y-osi i izmjerila udaljenost između nultočki koja odgovara širini strukture (Straight line – Analyze – Plot Profile – Set Range – Analyze – Measure). Mjerila sam na tri mjesta zato što širina struktura nije jednaka na svim dijelovima. Za širinu strukture uzela sam srednju vrijednost dobivenih vrijednosti.



Slika 7. Prikaz mjerenja duljine i širine premošćujućih struktura. Na slici A prikazana je neoznačena struktura, a na slici B označene su četvrtine i polovina strukture na kojima se mjeri širina.

Broj premošćujućih struktura u 2D kulturama odredila sam brojanjem stanica. Za kontrolni uzorak i tretirane uzorke izbrojala sam 100 stanica po uzorku, na način da brojim deset stanica po redu. Svaki pokus ponovila sam tri puta. Zabilježila sam broj i vrstu premošćujućih struktura koje pojedina stanica ima i okruženost drugim stanicama na relativnoj skali od 1 do 3 kao što je prikazano na slici 8. Za obilježavanje okruženosti stanica uzela sam relativnu skalu, zato što stanice U2OS koje rastu u 2D kulturi poprimaju razne oblike i sa susjednim stanicama mogu biti povezane tako da im se stanične membrane dodiruju, a mogu biti i udaljene nekoliko mikrometara i/ili povezane samo na manjim površinama. Kada sam naišla na stanicu sa premošćujućom strukturom, drugu stanicu koja je bila povezana istom tom strukturom nisam brojala.



Slika 8. Shematski prikaz okruženosti stanice susjednim stanicama na relativnoj skali od 1 do 3.

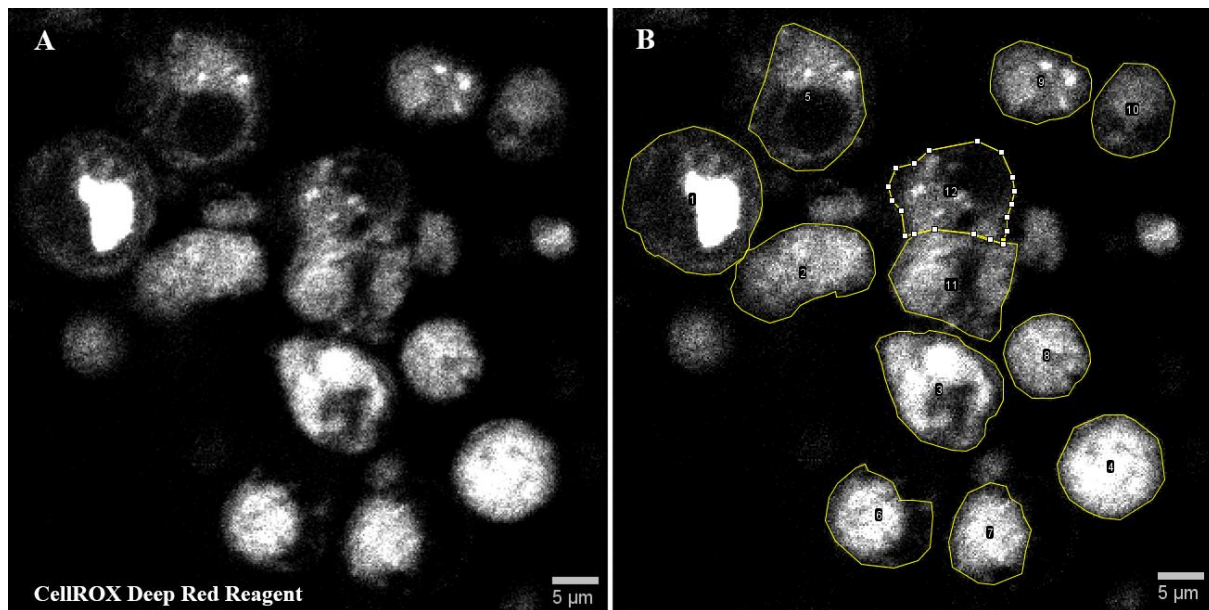
3.9.2. Klasifikacija premošćujućih struktura

Premošćujuće strukture razvrstala sam na TNT-ove i TM-ove ovisno o širini. Ako je prosječna širina strukture između $0,2 \mu\text{m}$ i $1 \mu\text{m}$ struktura je TNT. Iako se širina TNT-a kreće od 50 nm (Austefjord i sur. 2013), na korištenom mikroskopu ne može se dobiti razlučivost manja od $0,2 \mu\text{m}$ pa sam analizirala samo strukture šire od $0,2 \mu\text{m}$, a ostale strukture u stanicama U2OS u sklopu ovog rada nisam opisala. Ako je struktura širine između $1 \mu\text{m}$ i $3 \mu\text{m}$ svrstala sam je u TM-ove. Strukture širine veće od $3 \mu\text{m}$ nisam zabilježila, zato što nisam sa sigurnošću mogla odrediti jesu li te strukture TM-ovi ili je stanica razgranatog oblika. U klasifikaciji struktura, osim duljine i širine, zabilježila sam jesu li strukture razgranate ili nerazgranate i imaju li proširenja. U fiksiranim uzorcima gdje sam imunohistokemijskom metodom bojanja označila α -tubulin zabilježila sam ima li u premošćujućim strukturama mikrotubula ili nema. U uzorcima gdje sam snimala žive stanice zabilježila sam imaju li strukture mitohondrije.

3.9.3. Mjerenje razine induciranog stresa

Razinu induciranog stresa mjerila sam tako da sam uspoređivala intenzitet fluorescencije boje CellROX u uzorcima. Za 2D i 3D kulture snimala sam kontrolne uzorke i uzorke tretirane hladnoćom i inhibitorom J2. Za svaki uzorak snimala sam 20 snimki različitih vidnih polja u uzorku. Svaki pokus ponovila sam tri puta.

Souza i sur. (2010) primjetili su da u većim sferoidnim strukturama u središtu dolazi do nekroze, a u manjim sferoidnim strukturama jednaka je vijabilnost stanica u svim dijelovima strukture. U 3D kulturama snimala sam 10 snimki na rubnim dijelovima kulture i 10 snimki u središtu kulture, da provjerim postoje li razlike u intenzitetu fluorescencije boje CellROX, koje bi ukazivale na različitu razinu stresa. Za svaku snimku spojila sam Z-ravnine u jednu sliku. Pomoću alata poligonalni odabir (engl. *Polygon selections*) označila sam sve stanice u vidnom polju, kao što je prikazano na slici 9 i svakoj izmjerila intenzitet fluorescencije, od kojeg sam oduzela intenzitet fluorescencije pozadine.



Slika 9. Mjerenje razine stresa. Na slici **A** prikazane su neoznačene stanice obojane bojom za mjerenje razine stresa CellROX, a na slici **B** prikazane su stanice označene alatom poligonalni odabir u programu ImageJ.

3.10. Analiza podataka

Podaci su statistički analizirani u programu RStudio (R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). To je javno dostupan program za obradu podataka te omogućuje izradu grafičkih prikaza. Podaci su analizirani statističkim testom ANOVA, Tukey's testom i Welchovim t-testom.

4. Rezultati

U sklopu ovog rada istražene su brojnost i morfologija premošćujućih struktura (TNT-ova i TM-ova) te promjena u njihovoj brojnosti kao odgovor stanica na stresne podražaje. Premošćujuće strukture analizirane su u 2D kulturama ljudskih tumorskih stanica U2OS. U 2D kulturama opisani su oblici premošćujućih struktura koji se razlikuju s obzirom na njihovu duljinu širinu i razgranatost. Također je istraženo prisustvo mikrotubula i membranskih staničnih komponenti u njima koje upućuje na njihovu ulogu u međustaničnom transportu. Uspostavljen je protokol za izradu mikropaternirane 2D stanične kulture i 3D stanične kulture pomoću magnetske levitacije. Premošćujuće strukture pronađene su i u mikropaterniranim i u 3D kulturama. U 2D i 3D kulturama izmjerena je razina inducirano g stresa pomoću boje CellROX koja reagira sa slobodnim radikalima.

4.1. Brojnost premošćujućih struktura

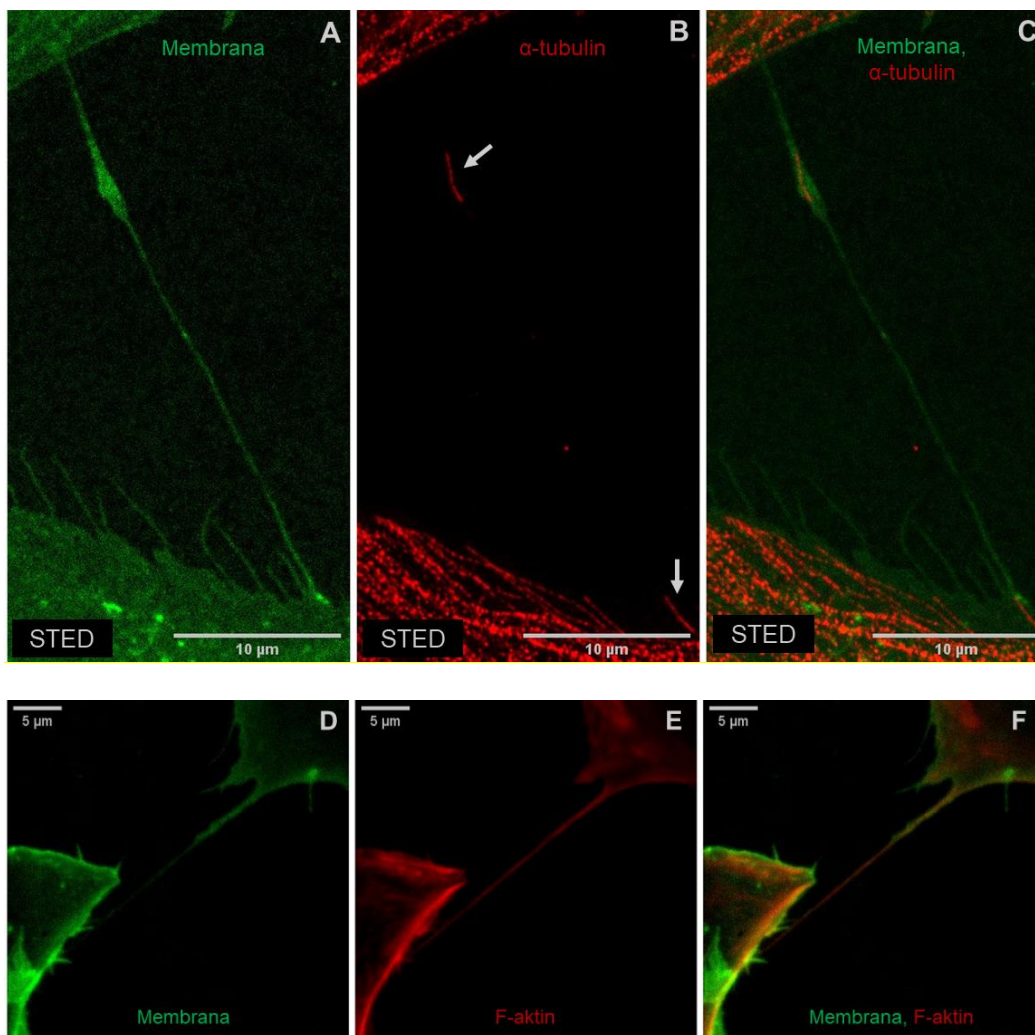
Kako bismo odredili utjecaj stresa na brojnost premošćujućih struktura, perturbirali smo inhibitorom J2 aktivnost proteina sHSP27 koji ima ulogu u odgovoru stanica na oksidativni stres. Također smo inducirali stres u stanicama tretmanom hladnoćom. Tretirani uzorci su uspoređeni s kontrolnim uzorkom u kojem stanice nisu bilo podvrgnute nijednom od tretmana. Napravljen je i pokus gdje su uzorci istovremeno tretirani inhibitorom J2 i hladnoćom. U 2D kulturama stanica U2OS opisane su premošćujuće strukture; TNT-ovi i TM-ovi (Slika 10). Definirane su kao membranske strukture koje povezuju dvije ili više stanica. Ne dodiruju podlogu. Dulje su od 3 μm . Širina TNT-ova je u rasponu od 0,2 μm do 1 μm , a širina TM-ova je između 1 μm i 3 μm . U uzorcima su pronađene premošćujuće strukture koje su puknule na sredini ili na jednom kraju (Prilozi, slika 33). Pronađeni su i filopodiji, strukture nalik TNT-ovima koji se pružaju samo iz jedne stanice (Prilozi, slika 34) koji nisu uključeni u analizu podataka.

Brojnost premošćujućih struktura određena je tako da je za 273 stanice zabilježeno koliko imaju TNT-ova, odnosno TM-ova. Slika 11 A prikazuje udio stanica s određenim brojem TNT-ova u pojedinoj skupini. U kontrolnoj skupini 19,4 % stanica ima jedan ili više TNT-ova. U uzorcima tretiranim inhibitorom J2 udio stanica s TNT-ovima je manji, 10,3 %. Nakon tretmana hladnoćom zabilježen je veći udio stanica s TNT-ovima, 34,8 %. U uzorcima tretiranim inhibitorom J2 i tretmanom hladnoćom istovremeno 20,9 % stanica ima TNT-ove. Najučestalije su stanice s jednim TNT-om, a stanice s većim brojem TNT-ova (Prilozi, slika 35) manje su zastupljene. Zabilježene su dvije stanice sa šest TNT-ova, jedna stanica sa osam TNT-ova i jedna sa devet TNT-ova.

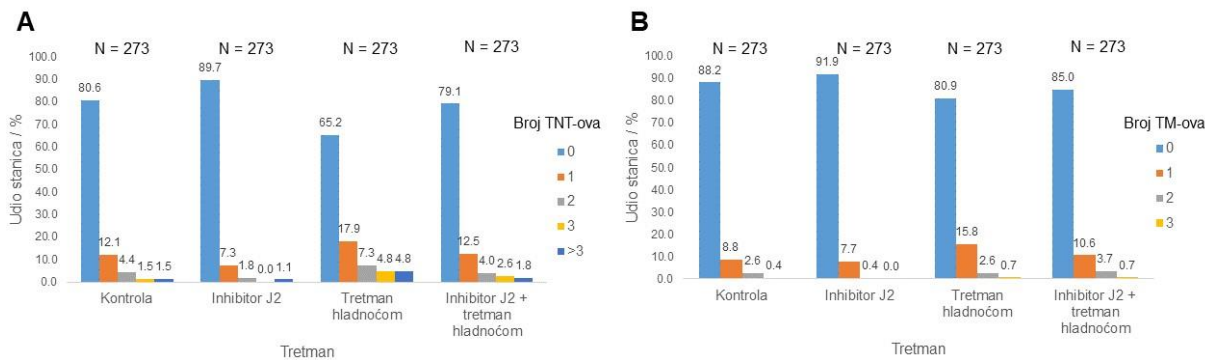
Broj stanica s određenim brojem TM-ova prikazan je na slici 11 B. 11,8 % stanica ima TM-ove u kontrolnoj skupini, 8,1 % u skupini tretiranoj inhibitorom J2, 19,1 % u skupini tretiranoj hladnoćom i 15 % u skupini

istovremeno tretiranoj inhibitorom J2 i sa tretmanom hladnoćom. Najučestalije su stanice s jednim TM-om. U uzorcima tretiranim inhibitorom J2 pronađena je jedna stanica sa dva TM-a, ostale stanice su imali jedan TM. U ostalim skupinama pronađene su stanice sa maksimalno tri TM-a.

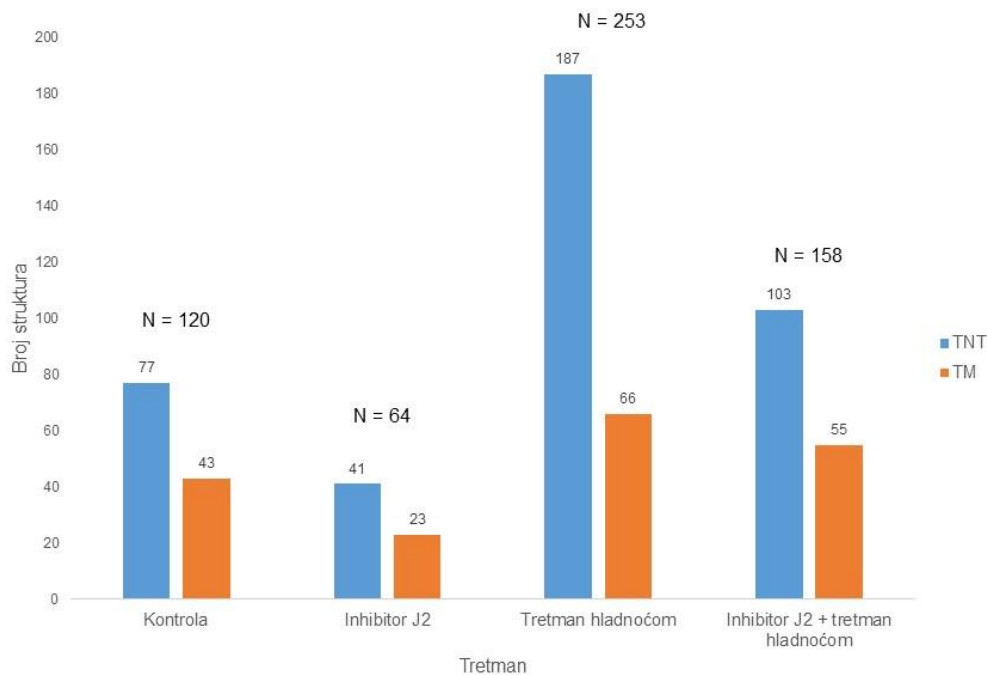
U kontrolnim uzorcima izmjereno je 120 premošćujućih struktura u 273 stanice, od čega 77 TNT-a i 43 TM-a. U uzorcima tretiranim inhibitorom J2 izmjereno je 64 premošćujuće strukture u 273 stanice, od čega 41 TNT i 23 TM-a. U uzorcima tretiranim hladnoćom izmjereno je 253 premošćujućih struktura u 273 stanice, od kojih je 187 TNT-a i 66 TM-a, a u uzorcima istovremeno tretiranim inhibitorom J2 i s hladnoćom izmjereno je 158 struktura u 273 stanice, od kojih je 103 TNT-a i 55 TM-a (Slika 12). U uzorcima ima otprilike 64 % TNT-ova i 36 % TM-ova, osim u uzorcima tretiranim hladnoćom gdje ima 74 % TNT-ova i 26 % TM-ova.



Slika 10. Prikaz premošćujuće strukture u stanicama U2OS. **A-C.** TNT u fiksiranim stanicama U2OS. Stanična membrana je označena bojom WGA i mikrotubuli su označeni antitijelom STAR RED anti-rabbit. Snimljeno u STED rezoluciji. Strelice pokazuju mikrotubule na početku TNT-a i u proširenju. Oznaka veličine je 10 μm. **D-F.** TM u fiksiranim stanicama U2OS. Stanična membrana je označena bojom WGA i F-aktin je označen bojom SiR-actin. Oznaka veličine je 5 μm.



Slika 11. Udio stanica s određenim brojem premošujućih struktura. Premošujuće strukture analizirane su u fiksiranim stanicama U2OS. Udio stanica bez premošujućih struktura, s 1, 2, 3 ili više premošujućih struktura u kontrolnom uzorku i tretiranim uzorcima s inhibitorom J2, tretmanom hladnoćom i inhibitorom J2 i tretmanom hladnoćom. U svakoj skupini zabilježen je broj premošujućih struktura u 273 stanica. **A.** Udio stanica s određenim brojem TNT-ova. **B.** Udio stanica s određenim brojem TM-ova.

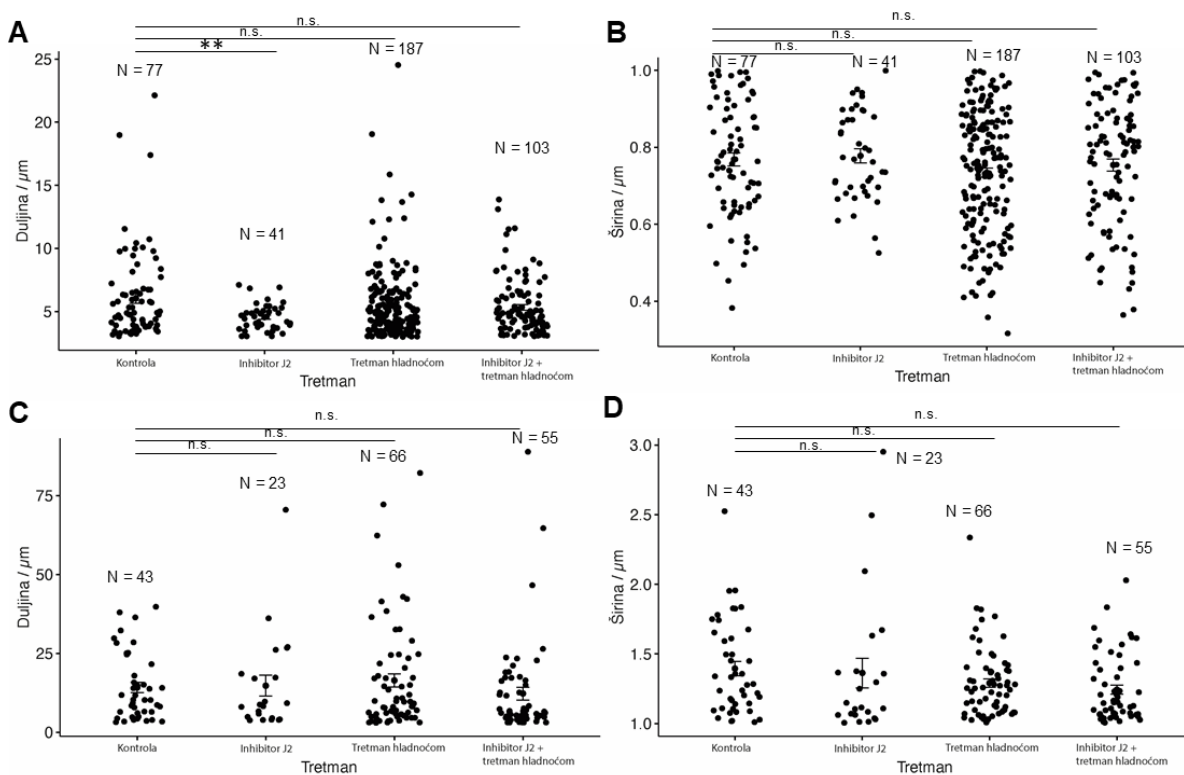


Slika 12. Analiza broja premošujućih struktura. Premošujuće strukture analizirane su u fiksiranim stanicama U2OS. Broj TNT-ova i TM-ova u kontrolnoj skupini i skupinama tretiranim s inhibitorom J2, tretmanom hladnoćom i inhibitorom J2 i tretmanom hladnoćom. N označava ukupan broj premošujućih struktura zabilježenih u pojedinoj skupini.

4.1.1. Duljina i širina premošujućih struktura

Uspoređene su duljina i širina premošujućih struktura u pojedinoj skupini (Slika 13 i Prilozi, tablica 3). Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost (engl. *mean*) uz standardnu pogrešku, s.e.m. (engl. *standard error of the mean*). Duljina TNT-ova u uzorcima tretiranim inhibitorom J2, $4,559 \pm 0,162 \mu\text{m}$, manja je od duljine TNT-ova u kontrolnoj skupini, $6,059 \pm 0,404 \mu\text{m}$. Duljina TNT-ova u uzorcima tretiranim s hladnoćom statistički se ne razlikuje od duljine TNT-ova u kontrolnim stanicama. Najdulji TNT izmjeren je u skupini tretiranoj hladnoćom, a duljina mu iznosi $24,539 \mu\text{m}$. Širina TNT-ova ne razlikuje se između kontrolnih i tretiranih stanica.

Nema značajnih razlika u duljini i širini TM-ova u različitim skupinama. Najveća duljina TM-a, $88,890 \mu\text{m}$ izmjerena je u uzorcima istovremeno tretiranim inhibitorom J2 i sa tretmanom hladnoćom.



Slika 13. Analiza duljine i širine premošujućih struktura. Premošujuće strukture analizirane su u fiksiranim stanicama U2OS. **A, B.** Duljina i širina TNT-ova u kontrolnoj skupini i tretiranim skupinama. **C, D.** Duljina i širina TM-ova u kontrolnoj skupini i tretiranim skupinama. N označava broj premošujućih struktura izmjerenih u pojedinoj skupini. Traka pogreške je s.e.m.. Podatci su uspoređeni ANOVA testom i Tukey's testom i dobivene su *p*-vrijednosti: ** $p < 0,01$ i n.s., nije značajno (engl. *not significant*).

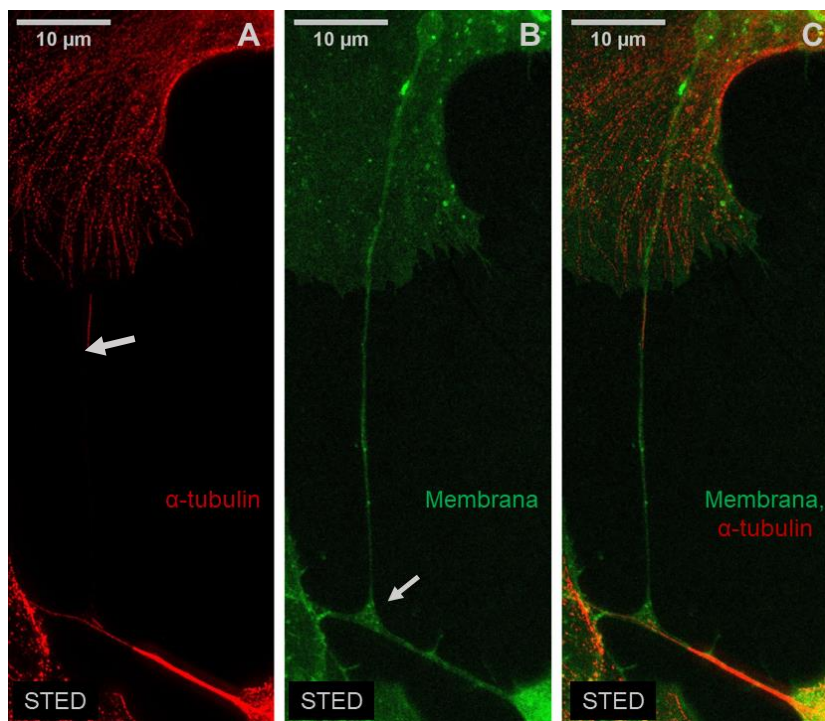
4.2. Morfologija premošćujućih struktura

U stanicama U2OS osim ravnih, nerazgranatih premošćujućih struktura pronađene su i razgranate strukture i strukture s proširenjima. Takve strukture pronađene su i među TNT-ovima i TM-ovima, no u TNT-ovima je pronađen manji broj takvih struktura.

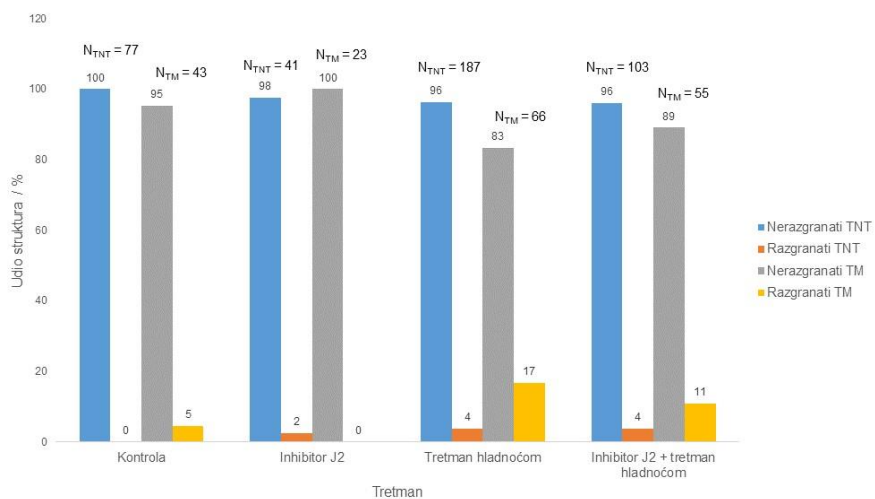
4.2.1. Razgranate premošćujuće strukture

Razgranate premošćujuće strukture mogu se granati na jednom ili više mjesta i povezuju dvije ili više stanica. Na mjestu grananja može se nalaziti i proširenje strukture (Slika 14). Razgranate strukture su nepravilne i mogu činiti mrežu premošćujućih struktura. Zabilježene su i strukture gdje TNT-ovi povezuju TM-ove sa stanicama (Prilozi, slika 36).

U kontrolnoj skupini nisu pronađeni razgranati TNT-ovi, a od 43 TM-a, dva su bila razgranata. U skupini tretiranoj inhibitorom J2 pronađen je jedan razgranati TNT. U uzorcima tretiranima hladnoćom zabilježeno je 17 % razgranatih TM-ova, a u uzorcima istovremeno tretiranima inhibitorom J2 i sa tretmanom hladnoćom pronađeno je 11 % razgranatih TM-ova. U obje skupine bilo je 4 % razgranatih TNT-ova (Slika 15).



Slika 14. Prikaz razgranatog TM-a. Razgranati TM u fiksiranim stanicama U2OS. Stanična membrana je označena bojom WGA i mikrotubuli su označeni antitijelom STAR RED anti-rabbit. Snimljeno u STED rezoluciji. **A.** Strelica pokazuje mikrotubule. **B.** Strelica pokazuje mjesto grananja TM-a na proširenju. Oznaka veličine je 10 μm .



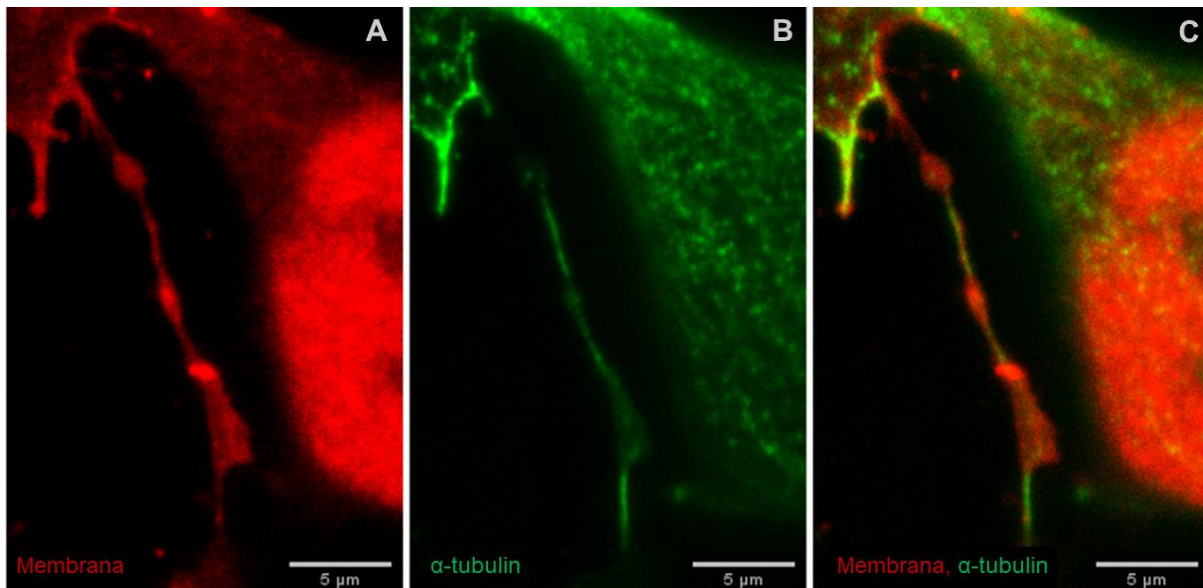
Slika 15. Analiza razgranatih i nerazgranatih premošujućih struktura. Udio razgranatih i nerazgranatih premošujućih struktura u pojedinoj skupini. N_{TNT} označava broj zabilježenih TNT-ova u pojedinoj skupini. N_{TM} označava broj zabilježenih TM-ova u pojedinoj skupini.

4.2.2. TM-ovi s proširenjima

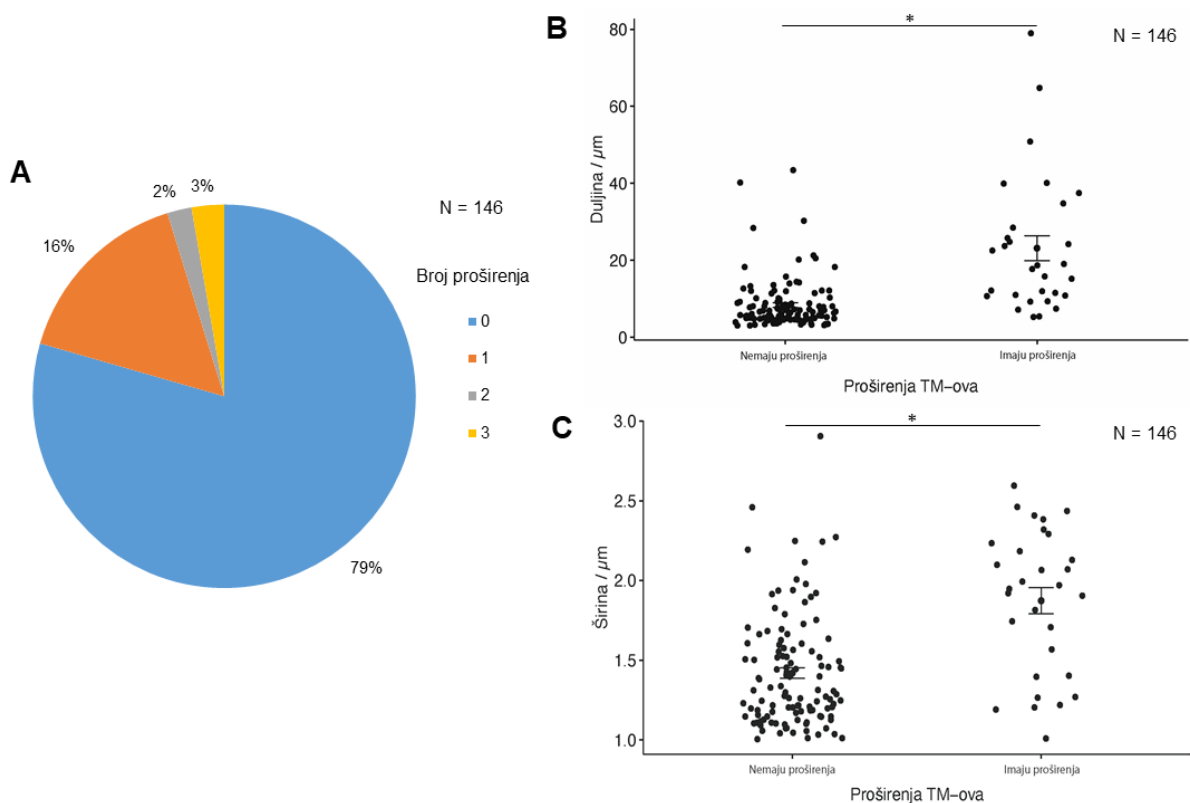
Proširenja u strukturama pronađena su u TNT-ovima (Slika 10) i TM-ovima. Zbog malog broja pronađenih TNT-ova s proširenjima (jedan TNT na 100 stanica) prikazani su podatci samo za TM-ove. Proširenja u TM-ovima u stanicama U2OS mogu biti različitog oblika i nalaziti se na različitim mjestima u strukturi. Proširenja mogu biti okrugla ili nepravilnog oblika (Slika 16) i mogu se nalaziti na mjestu grananja TM-a (Slika 14).

Izmjereno je 146 TM-ova, od kojih su proširenja pronađena u 21 % TM-ova. 16 % TM-ova imalo je jedno proširenje, a 5 % TM-ova imalo je dva ili tri proširenja (Slika 17 A).

Uspoređene su duljina i širina TM-ova s proširenjima i bez proširenja (Slika 17). Duljina TM-ova s proširenjima, $23,157 \pm 3,236 \mu\text{m}$, veća je od duljine TM-ova bez proširenja, $8,388 \pm 0,610 \mu\text{m}$. Širina TM-ova s proširenjima je $1,873 \pm 0,083 \mu\text{m}$ i širi su od TM-ova bez proširenja, $1,420 \pm 0,033 \mu\text{m}$.



Slika 16. Prikaz TM-a s proširenjima. TM u fiksiranim stanicama U2OS s tri proširenja. Stanična membrana je označena bojom WGA i mikrotubuli su označeni antitijelom Alexa Fluor 488 conjugated donkey anti-rabbit. Označena veličina je $5 \mu\text{m}$.



Slika 17. Analiza proširenja TM-ova. TM-ovi s proširenjima analizirani su u fiksiranim stanicama U2OS. **A.** Udio TM-ova ovisno o broju proširenja koja imaju. **B, C.** Duljina i širina TM-ova koji imaju proširenja i koji nemaju. N označava broj analiziranih TM-ova. Traka pogreške je s.e.m. Podatci su uspoređeni Welchovim t-testom i dobivene su p -vrijednosti: * $p < 0,05$.

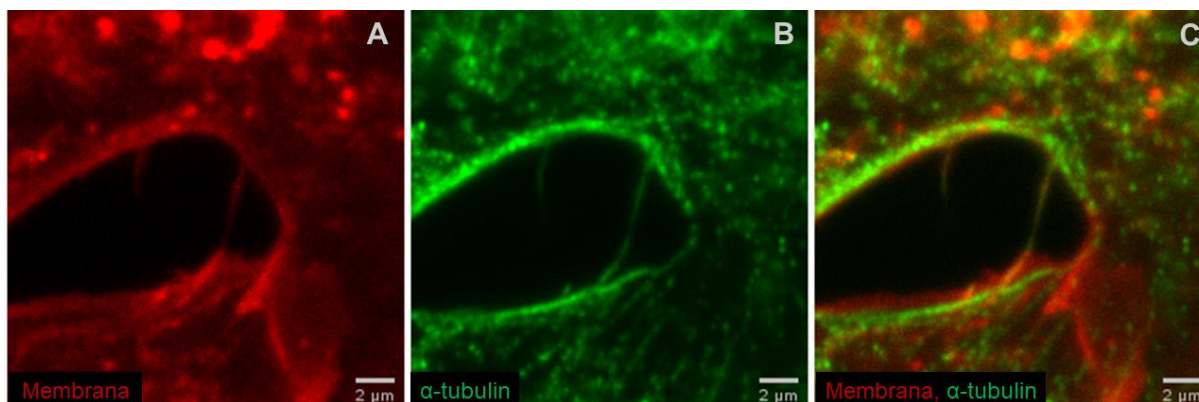
4.2.3. Mikrotubuli u premošujućim strukturama

U ovom radu istraženo je sadrže li premošujuće strukture u stanicama U2OS mikrotubule. Pronađeni su mikrotubuli u TNT-ovima (Slika 18) i u TM-ovima (Slika 19). Mikrotubuli se mogu pružati cijelom duljinom strukture ili samo jednim njenim dijelom. Ako se mikrotubuli samo djelomično nalaze u strukturi, mogu biti na početku strukture ili u proširenju (Slika 10 A-C), a kod razgranatih struktura grane mogu biti bez mikrotubula ili ih imati samo u dijelu grane (Slika 14). U mjerenjima je zabilježeno imaju li strukture mikrotubule ili ne, neovisno jesu li mikrotubuli u cijeloj strukturi ili samo u dijelu strukture.

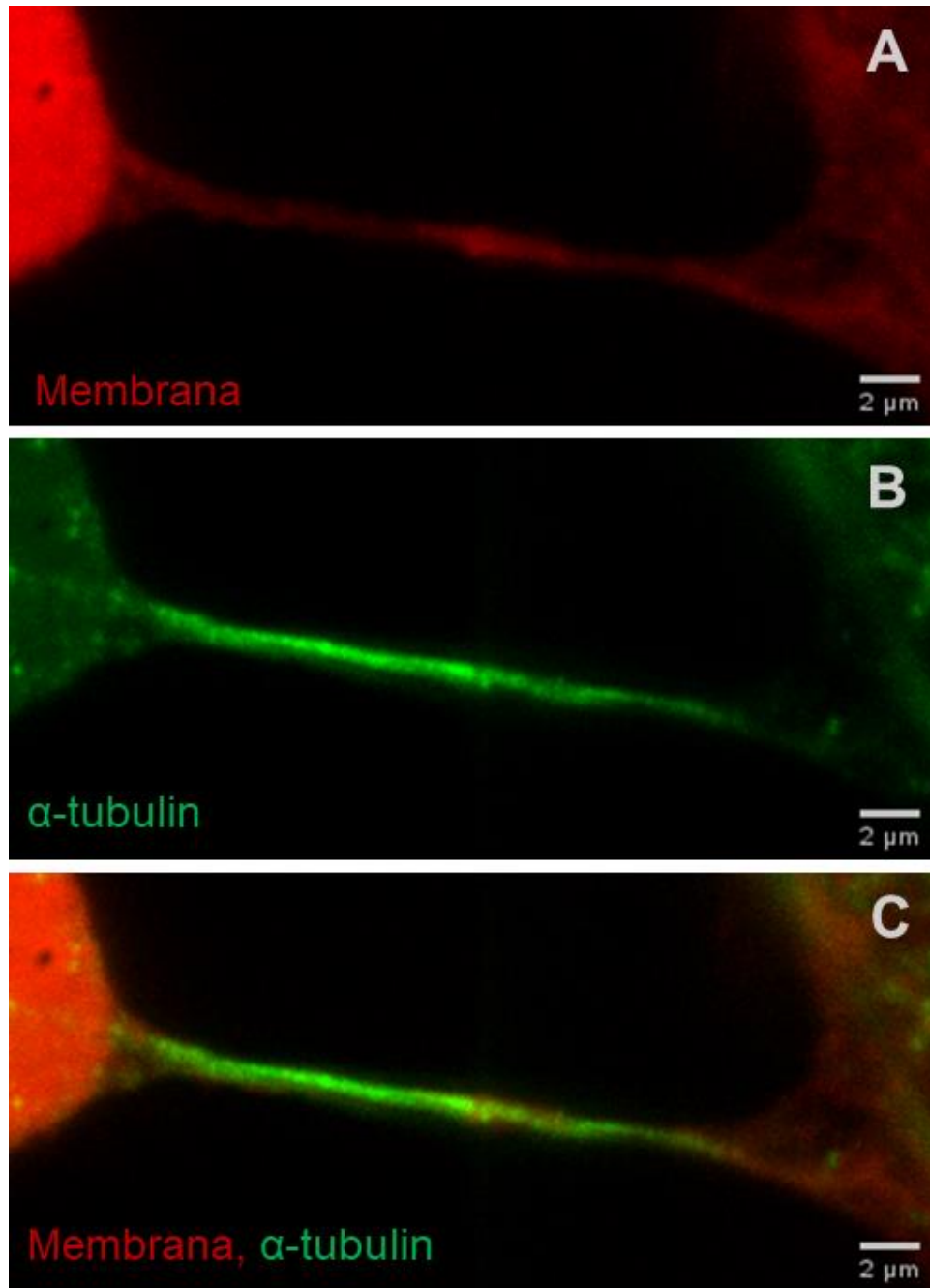
Izmjereno je 67 TNT-ova, od kojih 22,4 % ima mikrotubule, a 77,6 % nema. Od 107 izmjerenih TM-ova 61,7 % ima mikrotubule, a 38,3 % TM-ova nema mikrotubule (Slika 20 A).

Uspoređene su duljina i širina premošujućih struktura (Slika 20). Duljina TNT-ova s mikrotubulima, $5,795 \pm 0,811 \mu\text{m}$ ne razlikuje se od duljine TNT-ova bez mikrotubula, $5,257 \pm 0,275 \mu\text{m}$. Širina TNT-ova s

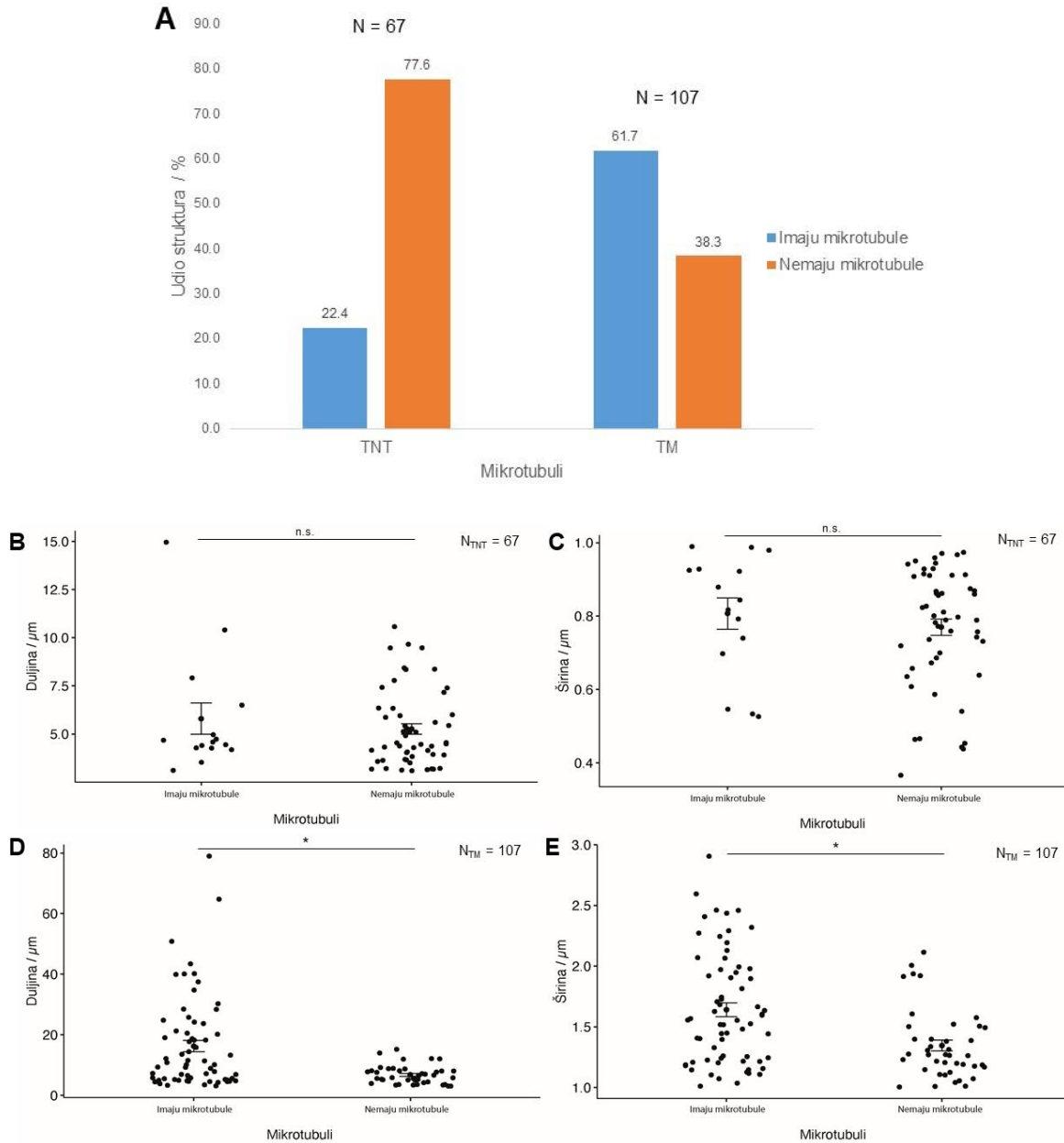
mikrotubulima $0,807 \pm 0,427 \mu\text{m}$ također se ne razlikuje od širine TNT-ova bez mikrotubula, $0,770 \pm 0,022 \mu\text{m}$. Duljina i širina TM-ova sa i bez mikrotubula se razlikuju. TM-ovi s mikrotubulima prosječno su dugi $16,254 \pm 1,899 \mu\text{m}$, a TM-ovi bez mikrotubula $6,771 \pm 0,471 \mu\text{m}$. Širina TM-ova s mikrotubulima je $1,641 \pm 0,056 \mu\text{m}$, a širina TM-ova bez mikrotubula $1,346 \pm 0,045 \mu\text{m}$.



Slika 18. Prikaz mikrotubula u TNT-u. TNT građen od mikrotubula snimljen u fiksiranim stanicama U2OS. Stanična membrana je označena bojom WGA i mikrotubuli su označeni antitijelom Alexa Fluor 488 conjugated donkey anti-rabbit. Označena veličina je $2 \mu\text{m}$.



Slika 19. Prikaz mikrotubula u TM-u. TM građen od mikrotubula snimljen u fiksiranim stanicama U2OS. Stanična membrana je označena bojom WGA i mikrotubuli su označeni antitijelom Alexa Fluor 488 conjugated donkey anti-rabbit. Označena veličina je 2 μm.



Slika 20. Analiza mikrotubula u premošujućim strukturama. Premošujuće strukture su analizirane u fiksiranim stanicama U2OS. **A.** Udio premošujućih struktura koje imaju mikrotubule i koje nemaju mikrotubule. N označava broj izmjerenih struktura u pojedinoj skupini. **B, C.** Duljina i širina TNT-ova koji imaju mikrotubule i koji nemaju. **D, E.** Duljina i širina TM-ova koji imaju mikrotubule i koji nemaju. N_{TNT} označava broj zabilježenih TNT-ova, a N_{TM} označava broj zabilježenih TM-ova. Traka pogreške je s.e.m. Podatci su uspoređeni Welchovim t-testom i dobivene su p -vrijednosti: * $p < 0,05$ i n.s., nije značajno.

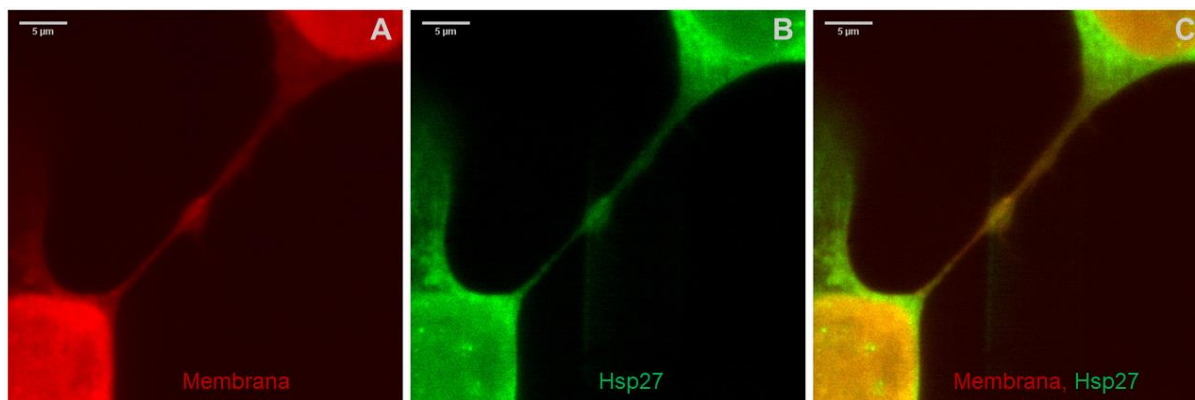
4.3. Transport staničnih komponenti kroz premošćujuće strukture

U premošćujućim strukturama je zabilježeno prisustvo određenih proteina i membranskih struktura koje upućuju na njihovu ulogu u međustaničnom transportu. U ovom radu analizirana je lokalizacija proteina sHSP27 te mitohondrija u premošćujućim strukturama stanica U2OS. Također je primjećeno da u živim stanicama boja za membranu WGA osim stanične membrane boji i druge stanične membranske komponente lokalizirane u premošćujućim strukturama. S obzirom na to da boja WGA nije selektivna za te komponente definirane su samo kao membranske strukture.

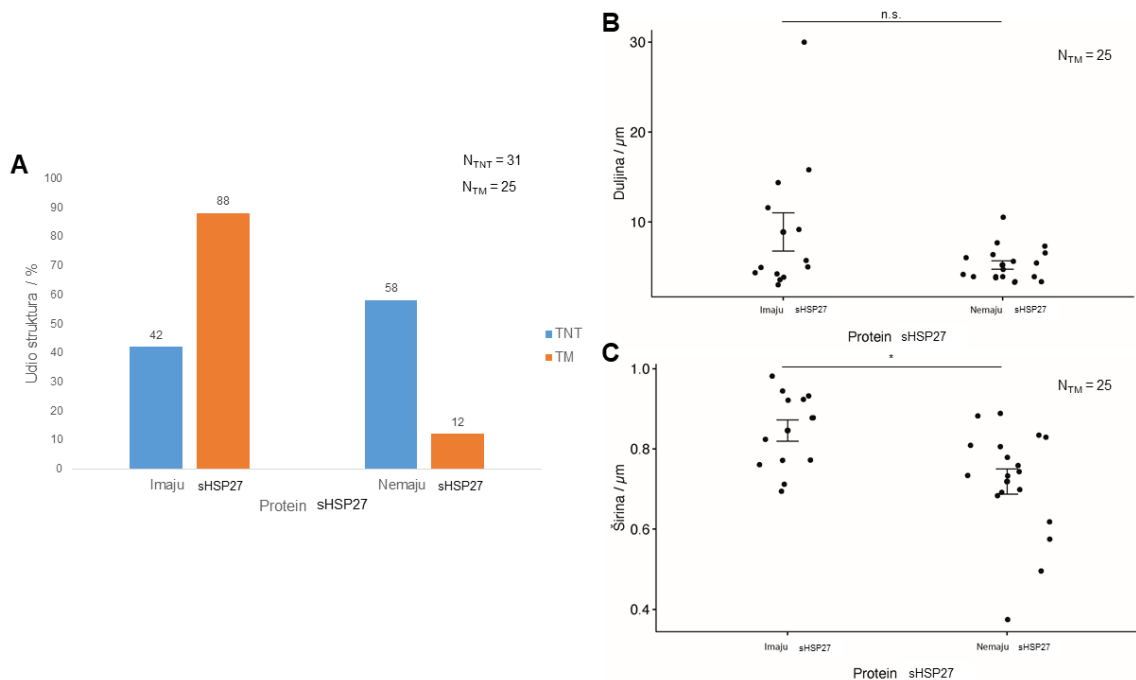
4.3.1. Lokalizacija proteina sHSP27

U TNT-ovima i TM-ovima zabilježena je lokalizacija proteina sHSP27 (Slika 21). Izmjeren je 31 TNT i 25 TM-ova. Protein sHSP27 pronađen je u 42 % TNT-ova i 88 % TM-ova (Slika 22 A). Uspoređene su duljina i širina TNT-ova ovisno imaju li protein sHSP27. S obzirom na to da od 25 TM-ova samo tri nisu imala protein HSP27, njihove duljine i širine nisu uspoređivane zbog premalog broja podataka.

Duljina TNT-a s lokalizacijom proteina sHSP27 je $8,897 \pm 2,121 \mu\text{m}$, a TNT-ovi bez proteina sHSP27 prosječno su dugi $5,218 \pm 0,455 \mu\text{m}$. Između ove dvije skupine nema značajne razlike (Slika 22 B). Širina TNT-ova s prijenosom proteina sHSP27, $0,846 \pm 0,026 \mu\text{m}$ veća je od širine TNT-ova koji ne prenose protein sHSP27, $0,719 \pm 0,032 \mu\text{m}$ (Slika 22 C).



Slika 21. Prikaz lokalizacije proteina sHSP27 u TM-u. TM sa prijenosom proteina sHSP27 u fiksiranim stanicama U2OS izloženima tretmanu hladnoće tri sata prije fiksacije. Stanična membrana je označena bojom WGA i protein sHSP27 je označen antitijelom Donkey anti-mouse Alexa Fluor 488. Oznaka veličine je 5 µm.



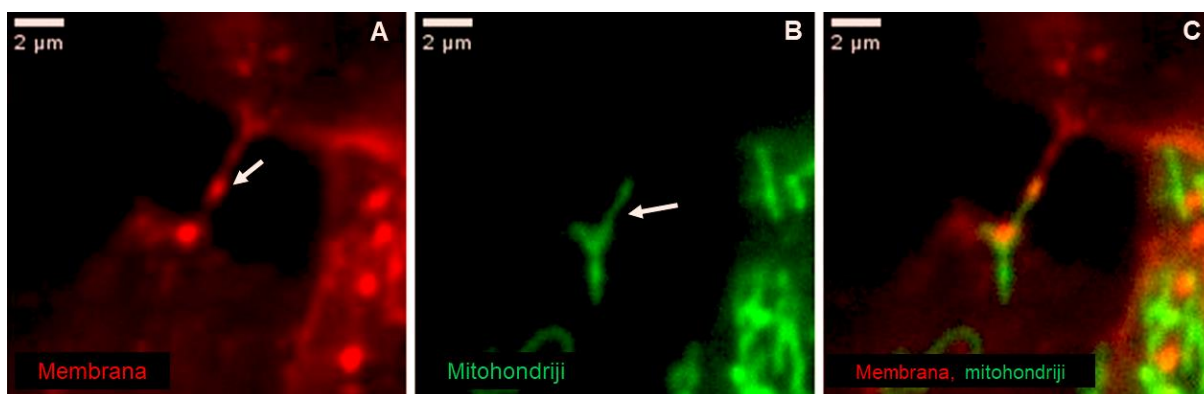
Slika 22. Analiza proteina sHSP27 u premošćujućim strukturama. Premošćujuće strukture analizirane su u fiksiranim stanicama UZOS izloženima tretmanu hladnoće tri sata prije fiksacije. N_{TNT} označava broj zabilježenih TNT-ova, a N_{TM} označava broj zabilježenih TM-ova. **A.** Udio premošćujućih struktura u kojima je zabilježen prijenos proteina sHSP27. **B, C.** Duljina i širina TNT-ova u kojima se prenosi protein sHSP27 i u kojima se ne prenosi. Traka pogreške je s.e.m. Podatci su uspoređeni Welchovim t-testom i dobivene su p -vrijednosti: * $p < 0,05$ i n.s., nije značajno.

4.3.2. Lokalizacija mitohondrija i membranskih struktura

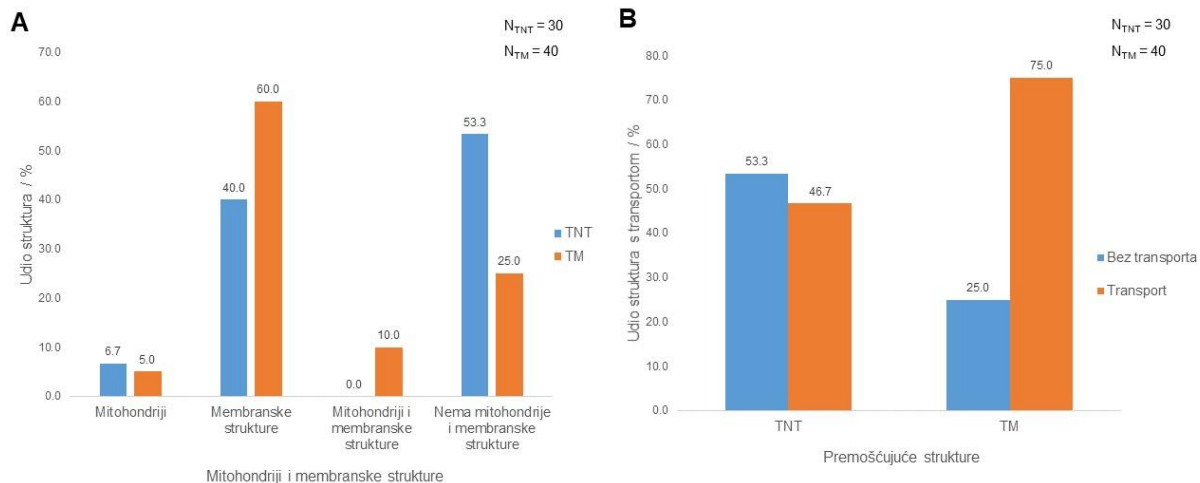
U uzorcima su snimljene premošćujuće strukture s mitohondrijima i membranskim strukturama. Premošćujuće strukture mogu imati samo mitohondrije ili membranske strukture ili oboje (Slika 23). U većini struktura s mitohondrijima pronađen je jedan mitohondrij, a u nekim TM-ovima su pronađena dva mitohondrija. U većini TNT-ova pronađena je samo jedna membranska struktura, dok su zabilježeni TM-ovi sa maksimalno četiri membranske strukture.

Izmjereno je 30 TNT-ova i 40 TM-ova. 6,7 % TNT-ova i 5 % TM-ova ima mitohondrije. Membranske strukture pronađene su u 40 % TNT-ova i 60 % TM-ova. 10 % TM-ova imalo je i mitohondrije i membranske strukture. TNT-ovi sa mitohondrijima i membranskim strukturama nisu pronađeni (Slika 24.A). Sveukupno, u 46,7 % TNT-ova i 75 % TM-ova zabilježena je lokalizacija staničnih komponentni (Slika 24.B).

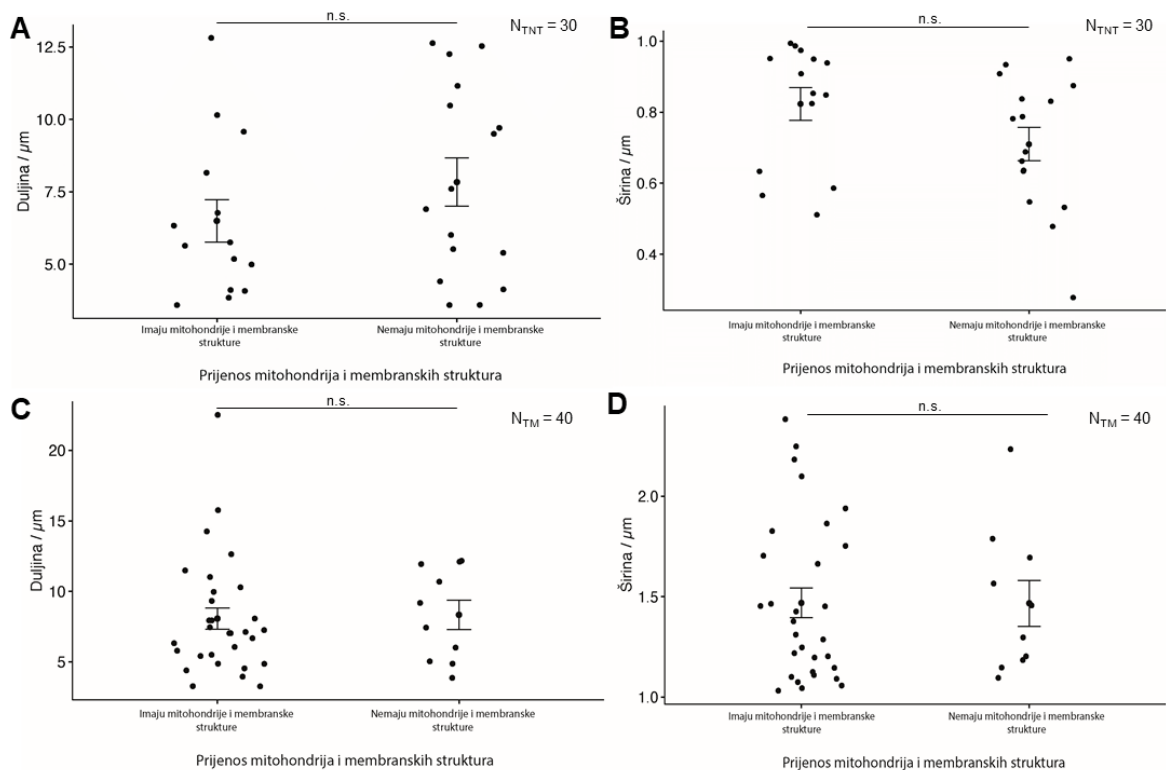
Usporedbom duljine i širine TNT-ova i TM-ova s lokalizacijom staničnih komponenti i bez nisu uočene značajne razlike (Slika 25). Prosječna duljina TNT-ova s lokalizacijom je $6,499 \pm 0,733 \mu\text{m}$ i bez lokalizacije $7,837 \pm 0,831 \mu\text{m}$. TNT-ovi u kojima su lokalizirane stanične komponente široki su $0,823 \pm 0,046 \mu\text{m}$, a TNT-ovi bez staničnih komponenti široki su $0,710 \pm 0,047 \mu\text{m}$. TM-ovi u kojima je zabilježena lokalizacija mitohondrija i membranskih struktura prosječno su dugi $8,065 \pm 0,756 \mu\text{m}$, a TM-ovi u kojima nije zabilježena lokalizacija $8,329 \pm 1,039 \mu\text{m}$. TM-ovi s lokalizacijom prosječno su široki $1,469 \pm 0,073 \mu\text{m}$, a TM-ovi bez $1,467 \pm 0,114 \mu\text{m}$.



Slika 23. Prikaz mitohondrija i membranskih struktura u TM-ovima. Mitohondriji i membranske strukture analizirani su u premošćućim strukturama u živim stanicama U2OS. Stanična membrana je označena bojom WGA, a mitohondriji su označeni bojom MitoTrackerTM Green FM. **A.** Strelica pokazuje membransku strukturu koja prolazi kroz TM. **B.** Strelica pokazuje mitohondrij u TM-u. Označena veličina je $2 \mu\text{m}$.



Slika 24. Analiza mitohondrija i membranskih struktura u TNT-ovima i TM-ovima. Prisutnost mitohondrija i membranskih struktura zabilježena je u premošujućim strukturama u živim stanicama U2OS. **A.** Udio premošujućih struktura s mitohondrijima, membranskim strukturama, mitohondrijima i membranskim strukturama i u kojima nije zabilježena lokalizacija. **B.** Udio premošujućih struktura s lokalizacijom mitohondrija i/ili membranskih struktura i bez. N_{TNT} označava broj zabilježenih TNT-ova, a N_{TM} označava broj zabilježenih TM-ova.



Slika 25. Duljina i širina premošujućih struktura ovisno o lokalizaciji mitohondrija i membranskih struktura. Lokalizacija mitohondrija i membranskih struktura zabilježena je u premošujućim strukturama u živim stanicama U2OS. **A, B.** Duljina i širina TNT-ova u kojima je zabilježena lokalizacija i u kojima nije zabilježena. **C, D.** Duljina i širina TM-ova u kojima je zabilježena lokalizacija i u kojima nema lokalizacije. N_{TNT} označava broj zabilježenih TNT-ova, a N_{TM} označava broj zabilježenih TM-ova. Traka pogreške je s.e.m. Podatci su uspoređeni Welchovim t-testom i dobivene su p -vrijednosti: n.s., nije značajno.

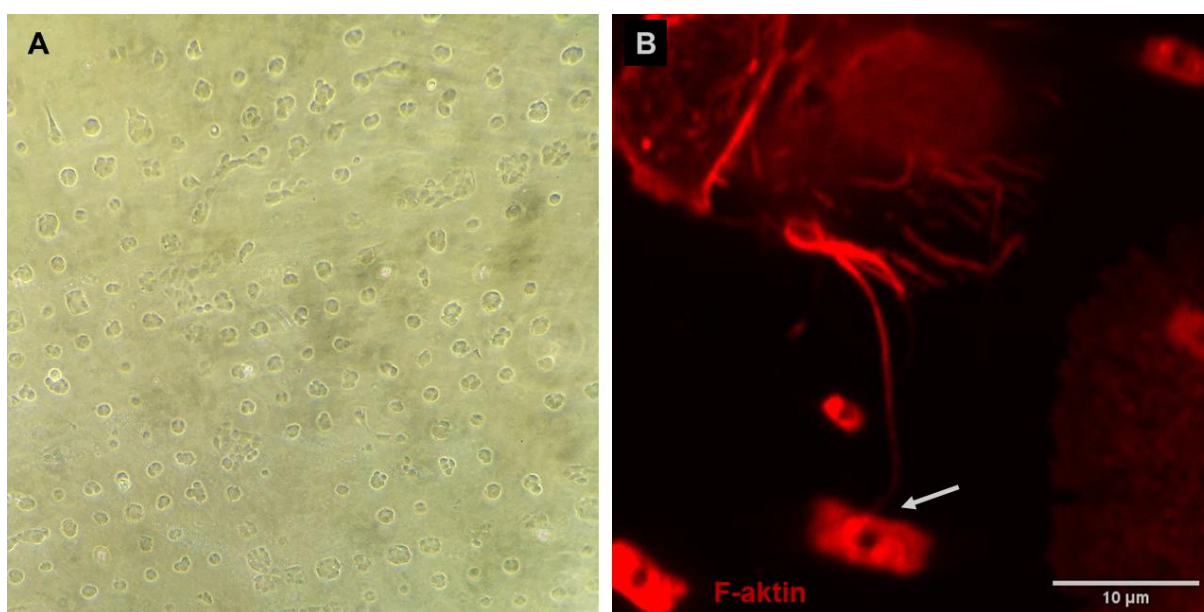
4.4. Razlike između 2D i 3D staničnog okruženja

Stanice U2OS promatrane su u klasičnim 2D kulturama, mikropatniranim 2D kulturama i 3D kulturama. Uspoređen je izgled stanica u mikropatniranim kulturama i 3D kulturama sa stanicama u 2D kulturama. U mikropatniranim kulturama i 3D kulturama pronađeni su TNT-ovi i TM-ovi. Izmjeren je intenzitet fluorescencije boje za detekciju stresa CellROX u 2D i 3D kulturama.

4.4.1. Mikropaternirane kulture

Napravljene su mikropaternirane kulture stanica U2OS. Stanice su rasle u „otočićima“ na fibronektinu okružene PLL-PEG gelom, koji im ograničava kretanje pa su stanice okruglog oblika (Slika 26 A), za razliku od stanica u 2D kulturama kojima prostor nije ograničen (Prilozi, Slika 37).

U mikropaterniranim kulturama stanica U2OS tretiranim inhibitorom J2 primijećen je velik broj stanica u apoptozi i apoptotskih tjelešca. Pronađen je TM koji povezuje stanicu u apoptozi s apoptotskim tjelešcem (Slika 26 B).

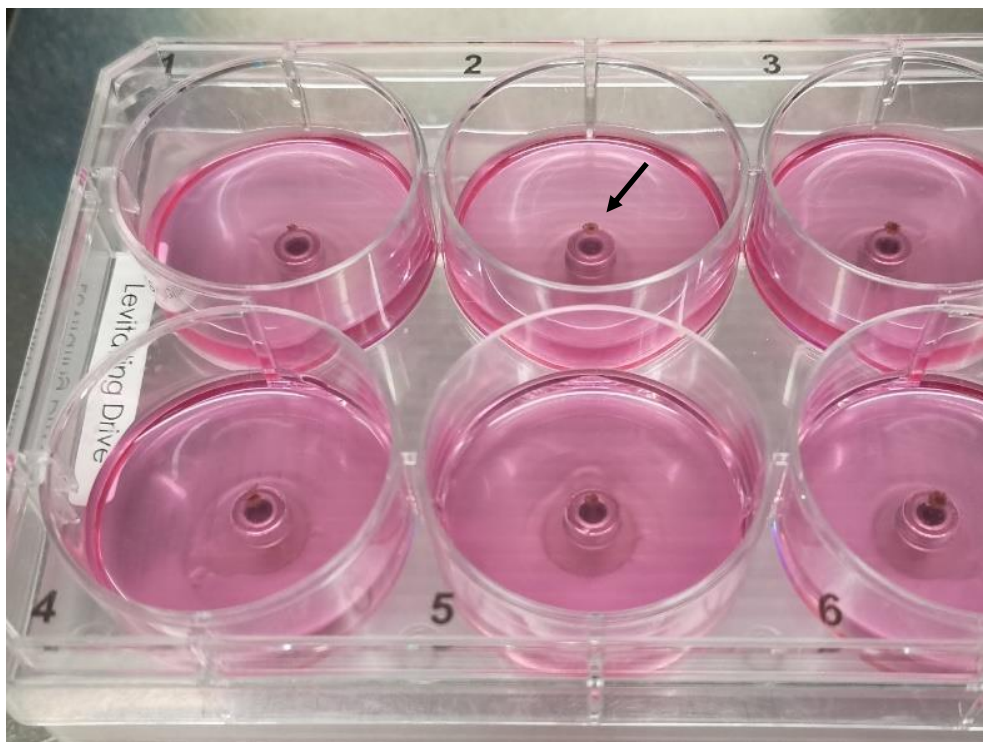


Slika 26. Prikaz mikropaternirane kulture. **A.** Mikropaternirana kultura stanica U2OS 24 sata nakon nasađivanja. Povećanje okulara je 10× i povećanje objektiva 10×, snimljeno na ukupnom povećanju 100×. **B.** TM snimljen u živim stanicama U2OS koji povezuje stanicu u apoptozi s apoptotskim tjelešcem (označeno strelicom). Stanice su tretirane inhibitorom J2. Stanična membrana je označena bojom WGA. Označena veličina je 10 μm.

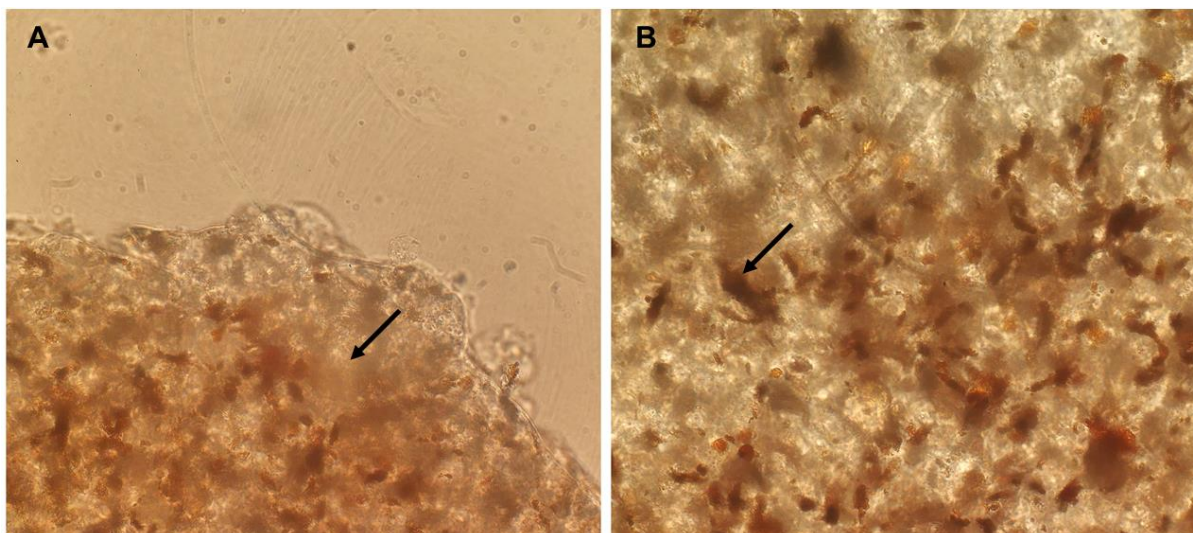
4.4.2. 3D kulture

Prema uspostavljenom protokolu, 3D kulture potrebno je inkubirati najmanje pet dana kako bi se dobila kompaktna struktura koju se može premjestiti iz posude s jažicama, bojati i fiksirati, a da struktura ostane cjelovita. Snimani su fiksirani uzorci koji su stavljeni u posudu za mikroskopiranje i poklopljeni pokrovnim stakalcem koje ih fiksira za podlogu kako bi se mogla dobiti fokusirana slika na mikroskopu. Na slici 27 prikazane su 3D kulture u ploči sa jažicama inkubirane 14 dana. Primijećeno je da što su kulture duže inkubirane to su gušće i cijela struktura je kompaktnija. Slika 28 prikazuje 3D kulturu snimljenu na rubnom i središnjem dijelu. Vidljivi su mutni dijelovi koji predstavljaju slojeve stanica koji se nalaze iznad ili ispod fokusa slike, a na samom rubu mogu se naći dijelovi kulture od jednog sloja stanica. Na slici 28 B označeni su smeđi dijelovi koji pokazuju nakupine nanočestica u stanicama.

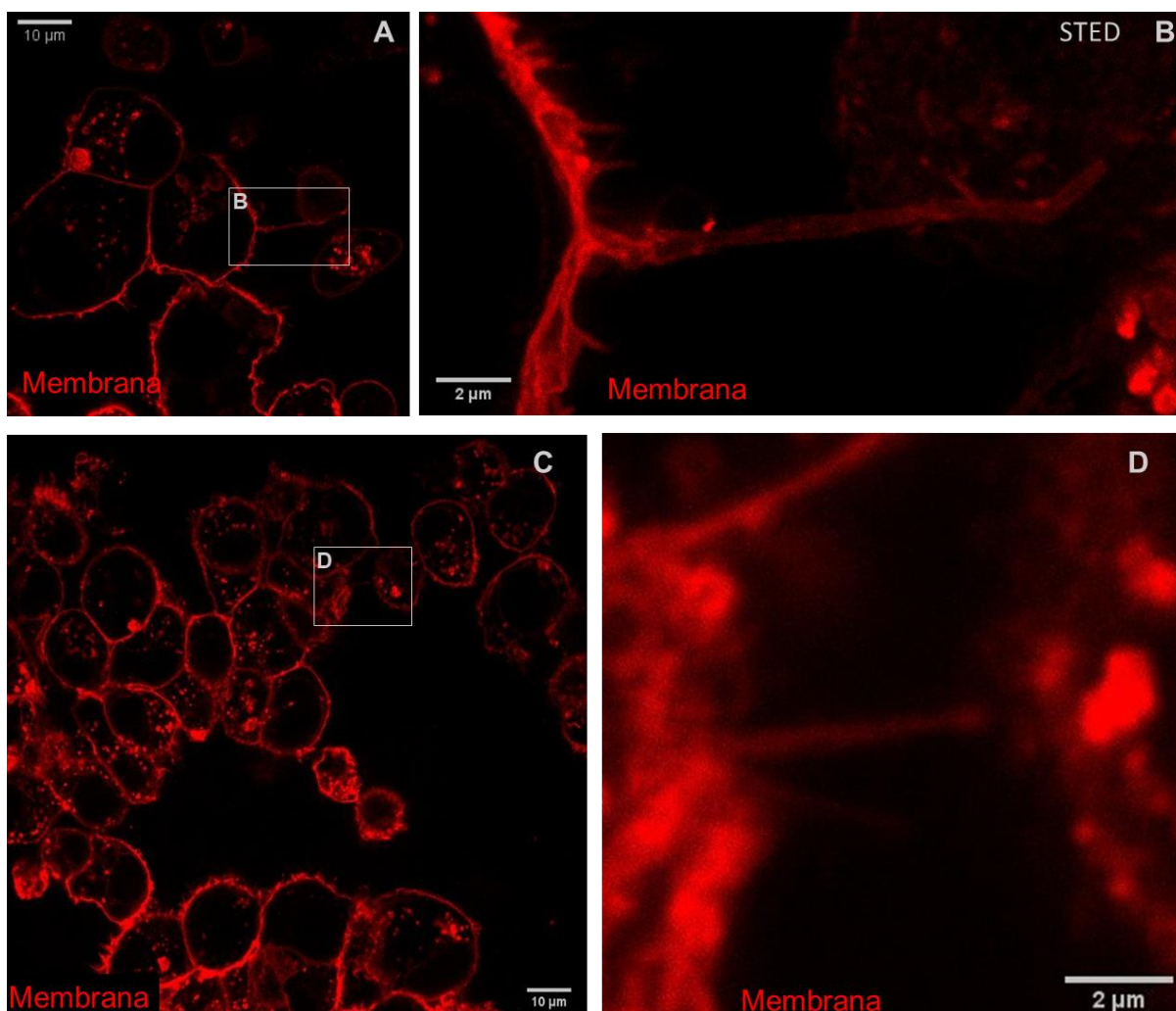
Na slici 29 A i C vidljivo je da stanice u 3D kulturama nisu adherentne i okruglog su oblika, za razliku od stanica u 2D kulturi (Prilozi, slika 37) te između njih nisu vidljivi prostori. Na rubnim dijelovima 3D kulture gdje su stanice u jednom sloju, pronađeni su TNT-ovi (Slika 29 B i D). U središnjim dijelovima 3D kultura teško je razlikovati premošćujuće strukture od stanične membrane stanica koje se nalaze u sloju iznad ili ispod.



Slika 27. Prikaz 3D kulture. Ploča sa jažicama za uzgoj 3D kultura ispod koje se nalazi magnet. 3D kulture stanica U2OS 14 dana nakon nasadivanja. Strelica prikazuje 3D kulturu.



Slika 28. Fiksirane 3D kulture stanica U2OS. **A.** Rubni dio 3D kulture. Strelica pokazuje nefokusirani dio uzorka koji predstavlja sloj stanica koji se nalazi iznad. **B.** Središnji dio 3D kulture. Strelica predstavlja smeđu nakupinu nanočestica koje se nalaze u stanicama. Povećanje okulara je $10\times$ i povećanje objektiva $60\times$, snimljeno na ukupnom povećanju $600\times$.



Slika 29. Prikaz TNT-ova u 3D kulturama. TNT-ovi na rubnim dijelovima fiksirane 3D kulture stanica U2OS. Stanična membrana je označena bojom WGA. Označena veličina je 10 µm (**A, C**) i 2 µm (**B, D**).

4.4.3. Mjerenje razine stresa bojom za detekciju stresa CellROX

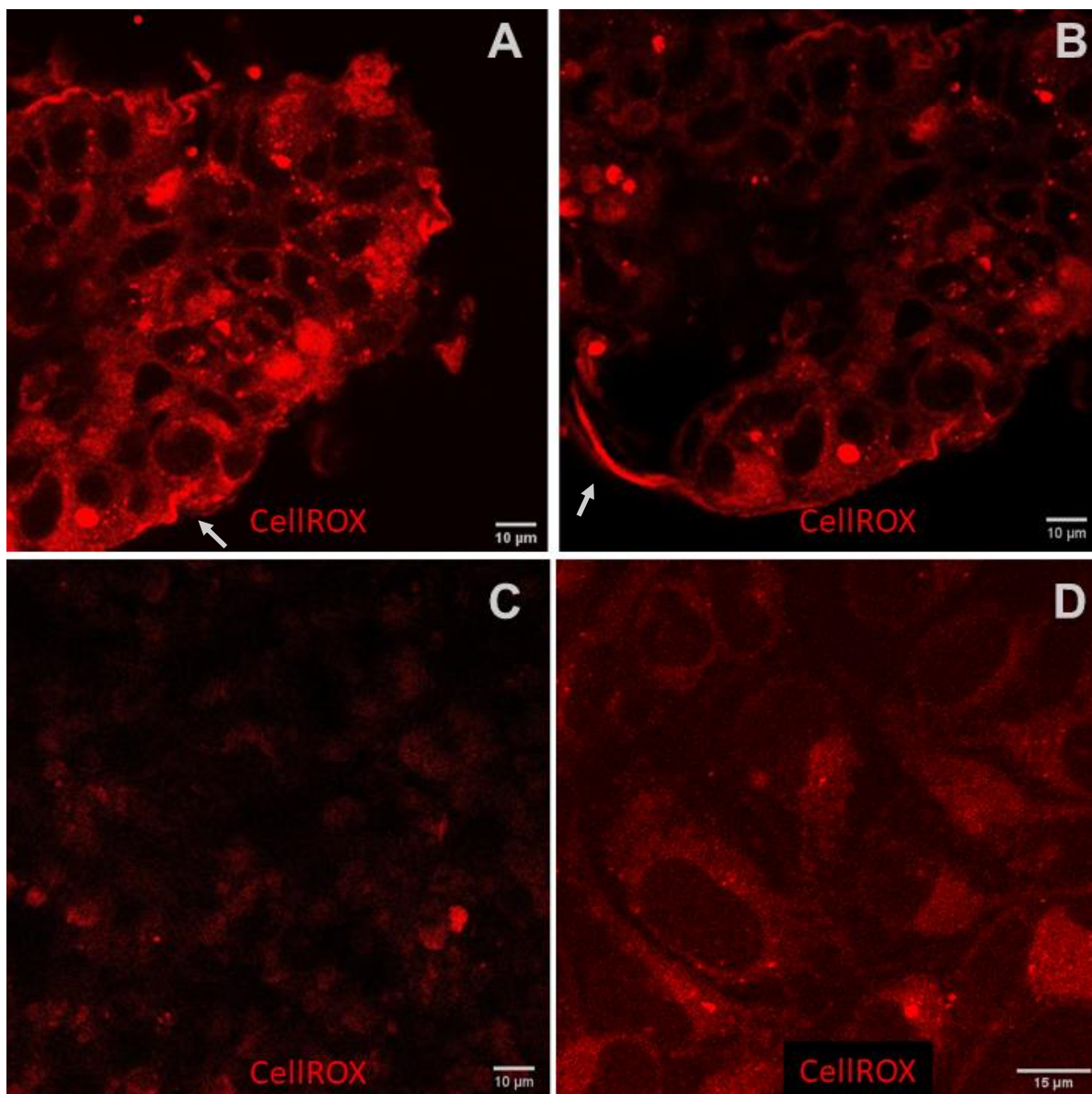
Stanice U2OS u 2D i 3D kulturama tretirane su s inhibitorom J2 i tretmanom hladnoćom te obojane bojom za detekciju stresa CellROX (Slika 30). Intenzitet fluorescencije boje CellROX uspoređen je s kontrolnim 2D i 3D uzorcima. Uzorci mikropatiranih kultura nisu se obojali te se stanice nije moglo snimiti.

U 2D kulturama izmjeren je intenzitet fluorescencije 399 stanica u kontrolnim uzorcima, 514 stanica u uzorcima tretiranima inhibitorom J2 i 453 stanica u uzorcima tretiranima hladnoćom. Intenzitet fluorescencije u stanicama tretiranim inhibitorom J2 iznosi $2,428 \pm 0,210$ i veći je od intenziteta fluorescencije u kontrolnim uzorcima koji iznosi $1,193 \pm 0,043$, dok se intenzitet fluorescencije stanica tretiranih sa hladnoćom, $1,168 \pm 0,034$, ne razlikuje značajno od kontrolnog uzorka (Slika 31).

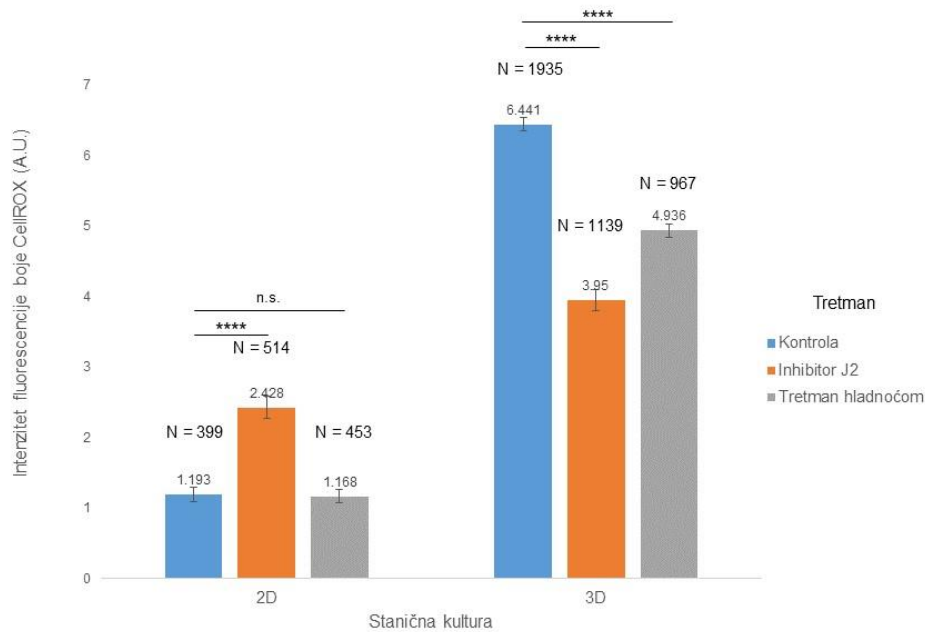
U 3D kulturama u kontrolnim uzorcima izmjereno je 1935 stanica, u uzorcima tretiranima inhibitorom J2 izmjereno je 1139 stanica i u uzorcima tretiranima sa hladnoćom izmjereno je 967 stanica. Intenzitet fluorescencije boje CellROX značajno se razlikuje među svim skupinama u 3D kulturama. U kontrolnim uzorcima dobiven je najveći intenzitet fluorescencije, $6,441 \pm 0,155$. U uzorcima tretiranima sa hladnoćom intenzitet fluorescencije je $4,936 \pm 0,151$. U uzorcima tretiranima s inhibitorom J2 dobiven je najmanji intenzitet fluorescencije, $3,950 \pm 0,096$.

Na slici 30 vidljivo je da rubni dijelovi 3D kultura imaju veći intenzitet fluorescencije boje CellROX od središnjih. Također, na samim rubovima 3D kultura vidljivi su dijelovi kulture koji imaju jači intenzitet fluorescencije, a ne nalikuju dijelovima stanica. Na nekim mjestima pojedine stanice, odnosno granice između dvije stanice se teško razlikuju.

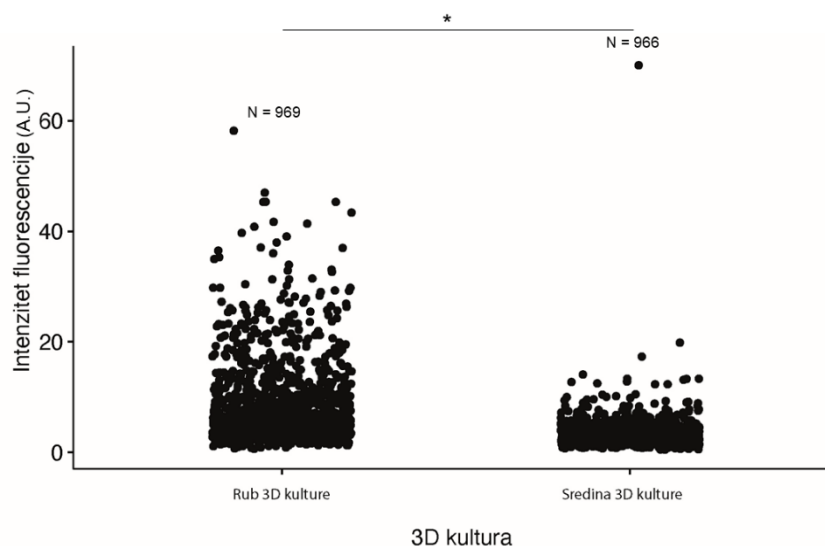
U kontrolnim uzorcima 3D kultura izmjeren je intenzitet fluorescencije 969 stanica na rubovima kultura koji iznosi $9,412 \pm 0,262$ i 966 stanica u središtu kultura čiji intenzitet fluorescencije iznosi $3,461 \pm 0,097$ i dobivene vrijednosti se značajno razlikuju (Slika 32).



Slika 30. Mjerenje razine stresa bojom CellROX. **A, B.** Rubni dio fiksirane 3D kulture stanica U2OS izložen tretmanu hladnoćom tri sata prije fiksacije. Stanice su označene bojom za mjerenje razine stresa CellROX. Strelice pokazuju jače obojane dijelove rubu kulture. **C.** Središnji dio 3D kulture. Označena veličina je 10 μm. **D.** Fiksirana 2D kultura stanica U2OS označenih bojom za mjerenje razine stresa. Označena veličina je 15 μm.



Slika 31. Intenzitet fluorescencije boje CellROX u 2D i 3D kulturama. Srednja vrijednost intenziteta fluorescencije boje CellROX izmjerena je u fiksiranim 2D i 3D kulturama stanica U2OS. Kulture su tretirane inhibitorom J2 i tretmanom hladnoćom tri sata prije fiksacije. N označava broj izmjerenih stanica u pojedinoj skupini. Traka pogreške je s.e.m. Podatci su uspoređeni Welchovim t-testom i dobivena je *p*-vrijednost: **** $p < 0,0001$, * $p < 0,05$, n.s., nije značajno.



Slika 32. Intenzitet fluorescencije boje CellROX na rubnim i središnjim dijelovima 3D kulture. Intenzitet fluorescencije izmjeren je na fiksiranim 3D kulturama stanica U2OS. N označava broj izmjerenih stanica u pojedinoj skupini. Podatci su uspoređeni Welchovim t-testom i dobivena je *p*-vrijednost: * $p < 0,05$.

5. Rasprava

5.1. TNT-ovi i TM-ovi u stanicama U2OS

Cilj ovog rada bio je odrediti brojnost TNT-ova i TM-ova u stanicama U2OS i opisati razlike u njihovoj morfologiji. TNT-ovi i TM-ovi u stanicama U2OS su heterogene strukture koje se morfološki razlikuju. Pokazano je da mogu biti razgranati, imati proširenja, a razlikuju se i ovisno o tome imaju li mikrotubule.

U svim pokusima, neovisno jesu li stanice bile podvrgnute nekom tretmanu, zabilježen je veći broj TNT-ova nego TM-ova. Dobiveno je da 21 % TM-ova ima jedno ili više proširenja u strukturi kao što je pokazano na slici 16. Dobivene su statistički značajne razlike u veličini između TM-ova s proširenjima i TM-ova bez proširenja. Na razlike u širini utječu sama proširenja. S obzirom na to da su TM-ovi s proširenjima dulji od TM-ova bez, moguće je da duljina TM-ova utječe na nastanak proširenja, u kojima se nakupljaju stanične komponente potrebne za održavanje strukture. U sljedećem koraku istraživanja trebalo bi istražiti koje se sve stanične komponente nalaze u proširenjima te usporediti ima li ih više nego u ostatku strukture. Nadalje, može se istražiti jesu li proširenja na fiksnom mjestu u strukturi ili se kreću. Proširenja struktura trebalo bi istražiti i u TNT-ovima, što u sklopu ovog rada nije napravljeno, zato što je pronađen premali broj TNT-ova s proširenjima.

Stanice U2OS često tvore filopodije građene od stanične membrane koje se pružaju prema drugim stanicama (Prilozi, slika 34). Iz tih struktura mogli bi se formirati TNT-ovi po mehanizmu stvaranja TNT-ova iz membranskih izbočina nalik filopodijima (Rustom i sur. 2004). Ovu pretpostavku trebalo bi potvrditi snimanjem *de novo* formacije TNT-ova.

5.1.1. Učinak tretmana hladnoćom

Pokazano je da tretman hladnoćom potiče stvaranje većeg broj TNT-ova, kao što je zabilježeno u stanicama CAD (Abounit i sur. 2015). Također, vidljiv je veći udio stanica koje imaju dva, tri ili više TNT-a. Stanice tretirane hladnoćom imaju i veći broj TM-ova (Slika 12). Iako je veći udio stanica s jednim TM-om, ne postoje značajne razlike u udjelu stanica sa dva i tri TM-a u usporedbi s kontrolnim uzorcima (Slika 11). Tretman hladnoćom utječe na brojnost premošujućih struktura u uzorku, ali ne i na njihovu duljinu i širinu, koje se ne razlikuju značajno od kontrolnih uzoraka. Zabilježene su i značajne razlike u morfologiji struktura tretiranih hladnoćom. Dok u kontrolnim uzorcima nisu zabilježeni razgranati TNT-ovi, u uzorcima tretiranim TNT-ovima zabilježeno je 4 % razgranatih TNT-ova. Broj razgranatih TM-ova porastao je za 12 % u uzorcima tretiranim hladnoćom, u usporedbi s kontrolnim uzorcima.

5.1.2. Učinak inhibitora J2 i lokalizacija proteina sHSP27

Pokazano je da inhibitor proteina sHSP27 J2 znatno utječe na brojnost TNT-ova i TM-ova. Broj premošćujućih struktura značajno se smanjio u odnosu na kontrolne uzorke (Slika 12). Također, duljina TNT-ova u uzorcima tretiranim inhibitorom J2 značajno je manja u usporedbi s kontrolnim uzorcima (Slika 13). S obzirom na to da je u stanicama tretiranim inhibitorom J2 uočeno samo smanjenje broja premošćujućih struktura, a ne i potpuna inhibicija nastanka premošćujućih struktura, može se zaključiti da protein sHSP27 nije ključan za formaciju premošćujućih struktura. Pinto i sur. (2020) pokazali su da utišavanje proteina sHSP27 u stanicama PC12 nije spriječilo formaciju TNT-ova, što potvrđuje ovaj zaključak. Koliko je poznato, utjecaj inhibitora J2 na međustanične interakcije nije opisan pa treba preciznije istražiti način na koji inhibitor J2 utječe na smanjenje broja premošćujućih struktura.

U premošćujućim strukturama pokazana je lokalizacija proteina sHSP27. Kako je pokazano, protein sHSP27 nema ključnu ulogu u formaciji premošćujućih struktura, no lokalizacija u strukturama ukazuje na transport kroz strukture. Može se pretpostaviti da je jedna od uloga premošćujućih struktura u stanicama U2OS transport proteina sHSP27 u stanice koje imaju manju ekspresiju proteina sHSP27 ili su više izložene stresnim podražajima. Isto tako, ako je uloga premošćujućih struktura u stanicama U2OS transport proteina sHSP27, može se zaključiti da se nakon tretmana inhibitorom J2 smanjio broj premošćujućih struktura zbog manje razine proteina sHSP27 u stanicama.

Duljina i širina TM-ova ovisno o prisutnosti proteina sHSP27 nije prikazana, zato što su pronađena samo tri TM-a u kojima nije zabilježena prisutnost proteina sHSP27, što je premali broj za odrediti prosječnu veličinu tih struktura. Širina TNT-ova u kojima je uočena lokalizacija proteina sHSP27 statistički se razlikuje od širine TNT-ova bez, no s obzirom na to da je izmjereno 25 struktura, ovi rezultati trebaju se potvrditi na većem broju struktura.

5.1.3. Mikrotubuli u premošćujućim strukturama

Mikrotubuli su pronađeni u 22,4 % TNT-ova i 61,7 % TM-ova. Önfelt i sur (2006). opisali su da se u stanicama makrofaga mikrotubuli nalaze samo u TNT-ovima debljim od 0,7 μm . U stanicama U2OS pronađeni su mikrotubuli u TNT-ovima širine manje od 0,7 μm (Slika 20 C), čime je pokazano da to pravilo ne vrijedi za stanice U2OS. Također, Önfelt i sur. nisu odredili koja je gornja granica širine TNT-ova. Ukoliko su strukture opisane kao „deblji TNT-ovi“ šire od 1 μm , tada se po definiciji premošćujućih struktura klasificiraju u TM-ove.

Duljina i širina TNT-ova ovisno o tome imaju li mikrotubule ne razlikuje se. Kod TM-ova je primijećena značajna razlika u duljini struktura koje imaju mikrotubule i koje nemaju. S obzirom na to da se duljina TNT-ova ne razlikuje, može se pretpostaviti da mikrotubuli u TNT-ovima služe za transport. Duljina TM-ova se razlikuje pa se postavlja pitanje imaju li mikrotubuli kao dio citoskeleta ulogu učvršćivanja TM-ova ili je njihova uloga isključivo sudjelovanje u transportu.

5.1.4. Transport staničnih komponenti

U premošćujućim strukturama između stanica U2OS gledana je lokalizacija mitohondrija i membranskih struktura. Membranske strukture su definirane kao dijelovi staničnih komponenti omeđeni membranom, koji su nespecifično označeni bojom za staničnu membranu WGA. Takve komponente mogle bi biti vezikule ili organeli kao što su lizosomi. Specifičnim označavanjem pojedinih staničnih komponenti moglo bi se odrediti što su točno opažene membranske strukture.

Membranske strukture zabilježene su u 40 % TNT-ova i 70 % TM-ova, što ukazuje na transport membranskih struktura. Mitohondriji su opaženi u malom udjelu premošćujućih struktura. Zabilježeni su u 6,7 % TNT-ova i 15 % TM-ova. Zastupljenost premošćujućih struktura s mitohondrijima je relativno niska, posebice u usporedbi sa zastupljenošću premošćujućih struktura s membranskim strukturama pa se može zaključiti da prijenos mitohondrija nije uloga premošćujućih struktura u U2OS stanicama.

U sljedećem koraku istraživanja trebalo bi istražiti koje se točno komponente prenose u TNT-ovima i TM-ovima u stanicama U2OS.

5.2. Usporedba 2D i 3D staničnog okruženja

Cilj ovog rada bio je usporediti utjecaj staničnog okruženja u odgovoru stanica na stres. Uspoređene su 2D kulture, mikropaternirane kulture i 3D stanične kulture. Promatran je oblik stanica, imaju li premošćujuće strukture te je mjeren intenzitet fluorescencije boje CellROX za detekciju oksidativnog stresa.

Oblik stanica u mikropaterniranim i 3D kulturama je sličan i stanice su pretežno okruglog oblika, zato što im je prostor za rast i kretanje ograničen. Razlika između ovih kultura je što je u mikropaterniranim kulturama prostor ograničen zbog PLL-PEG polimera na kojem stanice ne mogu rasti, a u 3D kulturama susjedne stanice i komponente izvanstaničnog matriksa ograničavaju rast stanica. Prednost mikropaterniranih kultura je što je lakše promatrati pojedinačne stanice, jer su okružene manjim brojem susjednih stanica. Promatranje stanica koje rastu samostalno ili u malim skupinama može biti i nedostatak,

zato što se dobiveni rezultati istraživanja mogu znatno razlikovati od rezultata dobivenih u tkivu. Kod promatranja 3D kultura stanice su zbijene, nema vidljivog prostora i slojevi stanica koji se nalaze iznad ili ispod fokusa slike mogu biti djelomično vidljivi što može ometati mikroskopiranje. Za razliku od mikropaternih i 3D kultura, u 2D kulturama, koje su otprilike 70 % konfluentne stanicama prostor za rast nije ograničen. U takvim uvjetima stanice su razgranatog oblika, no ne luče se sve komponente izvanstaničnog matriksa pa se dobiveni rezultati mogu razlikovati u odnosu na tkiva (Zhang 2004).

Premošćujuće strukture analizirane su u 2D kulturama, kao što je već opisano. U mikropatneranim kulturama pronađen je TM, a u 3D kulturama pronađeni su TNT-ovi. Ovi rezultati dokazuju da i u ovakvim kulturama stanice U2OS stvaraju premošćujuće strukture. U mikropatneranim kulturama formaciju premošćujućih struktura otežava to što su stanice udaljenije nego u 2D kulturama i PLL-PEG polimer odbija stanice. U 3D kulturama teško je razlikovati premošćujuće strukture od stanične membrane susjednih stanica. Za promatranje TNT-ova i TM-ova u mikropatneranim i 3D kulturama potrebna je daljnja optimizacija metoda istraživanja. U mikropatneranim kulturama moglo bi se povećati vrijeme inkubacije stanica ili koristiti drugu metodu izrade kultura. U 3D kulturama, mogli bi se promatrati samo presjeci uzorka. Također, trebalo bi razraditi protokol za snimanje živih 3D kultura.

5.2.1. Intenzitet fluorescencije boje CellROX

U uzorcima 2D i 3D kultura tretiranih hladnoćom intenzitet fluorescencije boje CellROX nije se povećao u odnosu na kontrolne uzorke, kao što je i očekivano, s obzirom na to da tretman hladnoćom ne uzrokuje oksidativni stres. U 2D kulturama intenzitet fluorescencije statistički se ne razlikuje od kontrolnih uzoraka, dok je u 3D kulturama manji u usporedbi s intenzitetom u kontrolnim uzorcima. Očekivano je da će u uzorcima 3D kultura tretiranim hladnoćom intenzitet fluorescencije boje CellROX biti jednak kao u kontrolnim uzorcima. Moguće je da je dobiven manji intenzitet fluorescencije zbog difuzije boje.

U 2D kulturama pokazano je da inhibitor proteina sHSP27 J2 povećava intenzitet fluorescencije boje CellROX u stanicama u odnosu na kontrolne uzorke, što ukazuje na povećanje oksidativnog stresa u stanicama (Slika 31), a potiče i povećanu apoptozu u mikropatneranim kulturama (Slika 26 B). U 3D kulturama pokazano je da inhibitor J2 smanjuje intenzitet fluorescencije boje CellROX, što ukazuje na smanjenje oksidativnog stresa u stanicama. Antioksidativni učinak inhibitora J2 pokazan je i u tkivima pluća miševa, gdje je inhibitor J2 smanjio produkciju ROS-ova nakon tretmana zračenjem (Kim i sur. 2018). Postavlja se pitanje zašto su dobiveni različiti rezultati za 2D kulture i 3D kulture. Kao što je već spomenuto, utjecaj inhibitora J2 na međustanične interakcije nije istražen, koliko je poznato pa bi trebalo istražiti imaju li izvanstanični matriks i arhitektura stanične kulture ulogu u reakciji stanica na inhibitor J2. Također, ne

smije se zanemariti da se komercijalno dostupna otopina inhibitora J2 pripravlja s otapalom dimetil sulfoksid, za kojeg je pokazano da ima toksičan učinak na žive stanice (Galvao i sur. 2014), što znači da postoji mogućnost da je na povećanje oksidativnog stresa u 2D kulturama utjecao i dimetil sulfoksid.

U 3D kulturama stanice na rubnim dijelovima imaju veći intenzitet fluorescencije boje CellROX. 3D kulture su kompaktne strukture sastavljene od više slojeva stanica, među kojima se nalaze i komponente izvanstaničnog matriksa. Takva struktura može utjecati na otežanu difuziju boje prema unutrašnjosti strukture pa je u stanicama na rubnim dijelovima kulture veća koncentracija boje unutar stanica. Souza i sur. (2010) pokazali su da jedino u većim strukturama u sredini kulture dolazi do nekroze pa se može pretpostaviti da stanice na rubu 3D kulture imaju veći intenzitet fluorescencije boje CellROX zbog difuzije.

U uzorcima mikropatniranih kultura nije se uspjelo izmjeriti intenzitet fluorescencije boje CellROX. Tijekom snimanja signal boje nije bio vidljiv pod mikroskopom. Jedan od mogućih razloga je to što su stanice u mikropatniranim kulturama manje gustoće u usporedbi sa 2D i 3D kulturama pa je količina signala bila preslaba. Isto tako, moguće je da boja nije ušla u stanice.

6. Zaključak

U ovom radu opisani su TNT-ovi i TM-ovi u stanicama U2OS. Brojnost premošćujućih struktura u uzorku mijenja se ovisno o vrsti stresnog podražaja kojem su stanice izložene. Može se zaključiti da u 2D kulturama inhibitor proteina sHSP27 J2 smanjuje broj TNT-ova i TM-ova, a tretman hladnoćom povećava. TNT-ovi i TM-ovi su heterogene strukture, koje se u stanicama U2OS razlikuju morfološki i ovisno imaju li mikrotubule. U premošćujućim strukturama u stanicama U2OS prenose se membranske strukture, koje treba dodatno definirati i protein sHSP27. S obzirom na to da je pronađeno malo premošćujućih struktura s mitohondrijima, može se zaključiti da TNT-ovi i TM-ovi u stanicama U2OS ne služe za transport mitohondrija.

Metoda magnetske levitacije pokazala se kao jednostavna metoda za izradu kompleksnijih staničnih kultura. S obzirom na to da se u 3D strukturama luče komponente izvanstaničnog matriksa, ova metoda izrade staničnih kultura može se koristiti kako bi se dobili preliminarni rezultati utječu li komponente izvanstaničnog matriksa i 3D struktura na rezultate nekog istraživanja. Pokazalo se da su stanice u 2D i 3D kulturama različitog oblika i pokazuju drugačiju razinu oksidativnog stresa nakon tretmana inhibitorom proteina sHSP27 J2.

Metoda detekcije oksidativnog stresa pomoću boje CellROX može se koristiti kao brza i jednostavna metoda za provjeru jesu li stanice pod oksidativnim stresom ili za potvrdu uz neku drugu metodu.

7. Literatura

Aboutit, S., Delage, E., Zurzolo, C. (2015): Identification and characterization of tunneling nanotubes for intercellular trafficking. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 67: 12.10.1-12.10.21.

Aboutit, S., Zurzolo, C. (2012): Wiring through tunneling nanotubes – from electrical signals to organelle transfer. *J. Cell Sci.* 125: 1089-1098.

Al-Fageeh, M. B., Smales, C. M. (2006): Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems. *Biochem. J.* 397: 247-259.

Arkwright, P. D., Luchetti, F., Tour, J., Roberts, C., Ayub, R., Morales, A. P., Rodríguez, 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 Res.* 20: 72-88.

Austefjord, M. W., Gerdes, H. H., Wang, X. (2013): Tunneling nanotubes Diversity in morphology and structure. *Commun. Integr. Biol.* 7: 1-5.

Bloemendal, S., Kück, U. (2012): Cell-to-cell communication in plants, animals, and fungi: a comparative review. *Sci. Nat.* 1: 3-19.

Bukoreshtliev, N. V., Wang, X., Hodneland, E., Gurke, S., Barroso, J. F. V., Gerdes, H. H. (2009): Selective block of tunneling nanotube (TNT) formation inhibits intercellular organelle transfer between PC12 cells. *FEBS Lett.* 583: 1481-1488.

Celeghini, E. C. C., Alves, M. B. R., de Arruda, R. P., de Rezende, G. M., Rodriguez, S. A. F., de Sá Filho, M. F. (2019): Efficiency of CellROX deep red and CellROX orange fluorescent probe sin identifying reactive oxygen species in sperm samples from high and low fertility bulls. *Anim. Biotechnol.* 32: 77-83.

Concannon, C. G., Gorman, A. M., Samali, A. (2003): On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis.* 8: 61-70.

Cooper G. M., Hausman R. E. (2004): Stanica. Medicinska naklada, Zagreb

Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D. R., Yamada, K. M. (2001): Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension. *Science.* 294: 1708-1712.

Doshi, B. M., Hightower, L. E., Lee, J. (2008): The role of Hsp27 and actin in the regulation of movement in human cancer cells responding to heat shock. *Cell Stress Chaperons.* 14: 445-457.

Eugenin, E. A., Gaskill, P. J., Berman, J. W. (2009): Tunneling nanotubes (TNT) are induced by HIV-infection of macrophages: a potential mechanism for intercellular HIV trafficking. *Cell. Immunol.* 254: 1-13.

Fujita, R., Yoshida, A., Mizuno, K., Ueda, H. (2001): Cell Density-Dependent Death Mode Switch of Cultured Cortical Neurons Under Serum-Free Starvation Stress. *Cell. Mol. Neurobiol.* 21: 317-324.

Galvao, J., Davis, B., Tilley, M., Normando, E., Duchen, M. R., Cordeiro, M. F. (2014): Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB J.* 28: 1317-1330.

Gerdes, H. H., Bukoreshtliev, N. V., Barroso, J. F. V. (2007): Tunneling nanotubes: A new route for the exchange of components between animal cells. *FEBS Lett.* 581: 2194-2201.

Gömmel, M., Pauli, M., Liao, Y., Häring, P., Pusch, S., Herl, V., Steinhäuser, C., Kronic, D., Jarahian, M., Miletic, H., Berghoff, A. S., Griesbeck, O., Kalamakis, G., Garaschuk, O., Preusser, M., Weiss, S., Liu, H., Heiland, S., Platten, M., Huber, P. E., Kuner, T., von Deimling, A., Wick, W., Winkler, F. (2015): Brain tumor cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature.* 528: 93-98.

Gurke, S., Barroso, J. F. V., Gerdes, H. H. (2008): The art of cellular communication: tunneling nanotubes bridge the divide. *Histochem Cell Biol.* 129: 539-550.

Haimovich, G., Ecker, C. M., Dunagin, M. C., Eggan, E., Raj, A., Gerst, J. E., Singer, R. H. (2017): Intercellular mRNA trafficking via membrane nanotube-like extensions in mammalian cells. *PNAS.* 114: E9873-E9882.

Haisler, W. L., Timm, D. M., Gage, J. A., Tseng, H., Killian, T. C., Souza, G. R. (2013): Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. *Nat. Protoc.* 8: 1940-1949.

Hase, K., Kimura, S., Takatsu, H., Ohmae, M., Kawano, S., Kitamura, H., Ito, M., Watari, H., Hazelett, C. C., Yeaman, C., Ohno, H. (2009): M-Sec promotes membrane nanotube formation by interacting with Ral and the exocyst complex. *Nat. Cell Biol.* 11: 1427-1444.

Jacquemet, G., Carisey, A. F., Hamidi, H., Henriques, R., Leterrier, C. (2020): The cell biologist's guide to super-resolution microscopy. *J. Cell Sci.* 133: 1-9.

Kim, J. Y., An, Y. M., Yoo, B. R., Kim, J. M., Han, S. Y., Na, Y., Lee, Y. S., Cho, J. (2018): HSP27 inhibitor attenuates radiation-induced pulmonary inflammation. *Sci. Rep.* 8: 1-11

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?. *Circ. Res.* 96: 1039-1041.

Kretschmer, A., Zhang, F., Somasekharan, S. P., Tse, C., Leachman, L., Gleave, A., Li, B., Asmaro, I., Huang, T., Kotula, L., Sorensen, P. H., Gleave, M. E. (2019): Stress-induced tunneling nanotubes support treatment adaptation in prostate cancer. *Sci. Rep.* 9: 1-13.

Kumar, A., Kim, J. H., Ranjan, P., Metcalfe, M. G., Cao, W., Mishina, M., Gangappa, S., Guo, Z., Boyden, E. S., Zaki, S., York, I., Sastre-García, A., Shaw, M., Sambhara, S. (2017): Influenza virus exploits tunneling nanotubes for cell-to-cell spread. *Sci. Rep.* 6: 1-14.

Langhans, S. A. (2018): Three-Dimensional *in Vitro* Cell Culture Model sin Drug Discovery and Drug Repositioning. *Front. Pharmacol.* 23: 1-14.

Latario, C. J., Schoenfeld, L. W., Howarth, C. L., Pickrell, L. E., Begum, F., Fischer, D. A., Grbovic-Huezo, O., Leach, S. D., Sanchez, Y., Smith, K. D., Higgs, H. N. (2020): Tumor microtubes connect pancreatic cancer cells in an Arp2/3 complex-dependent manner. *Mol. Biol. Cell.* 31: 1259-1272.

Lefort, C. T., Wojciechowski, K., Hocking, D. C. (2010): N-cadherin Cell-Cell Adhesion Complexes Are Regulated by Fibronectin Matrix Assembly. *J. Biol. Chem.* 286: 3149-3160.

Lichtman, J. W., Conchello, J. A. (2005): Fluorescence microscopy. *Nat. Methods.* 2: 910-919.

Marzo, L., Gousset, K., Zurzolo, C. (2012): Multifaceted roles of tunneling nanotubes in intercellular communication. *Front. Physiol.* 3: 1-14.

Matejka, N., Reindl, J. (2019): Perspectives of cellular communication through tunneling nanotubes in cancer cells and the connection to radiation effects. *Radiat. Oncol.* 14: 1-11.

Önfelt, B., Nedvetzki, S., Yanagi, K., Davis, D. M. (2004): Cutting Edge: Membrane Nanotubes Connect Immune Cells *J. Immunol.* 173: 1511-1513.

Önfelt, B., Nedvetzki, S., Benninger, R. K. P., Purbhoo, M. A., Sowinski, S., Hume, A. N., Seabra, M. C., Neil, M. A. A., French, P. M. W., Davis, D. M. (2006): Structurally Distinct Membrane Nanotubes between Human Macrophages Support Long-Distance Vesicular Traffic or Surfing of Bacteria. *J. Immunol.* 177: 8476-8483.

Osswald, M., Jung, E., Sahm, F., Solecki, G., Venkataramani, V., Blaes, J., Weil, S., Horstmann, H., Wiestler, B., Syed, M., Huang, L., Ratliff, M., Jazi, K. K., Kurz, F. T., Schmenger, T., Lemke, D., Gömmel, M., Pauli, M., Liao, Y., Häring, P., Pusch, S., Herl, V., Steinhäuser, C., Krunic, D., Jarahian, M., Miletic, H., Berghoff, A. S., Griesbeck, O., Kalamakis, G., Garaschuk, O., Preusser, M., Weiss, S., Liu, H., Heiland, S., Platten, M., Huber, P. E., Kuner, T., von Deimling, A., Wick, W., Winkler, F. (2015): Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature*. 528: 1-19.

Pinto, G., Brou, C., Zurzolo, C. (2020): Tunneling Nanotubes: The Fuel of Tumor Progression?. *Trends Cancer*. 6: 874-888.

Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., Bitto, A. (2017): Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid. Med. Cel. Longev.* 2017: 1-13

Pontes, B., Viana, N. B., Campanati, L., Farina, M., Neto, V. M., Nussenzveig, H. M. (2008): Structure and elastic properties of tunneling nanotubes. *Eur. Biophys. J.* 37: 121-129.

Rocchi, P., So, A., Kojima, S., Signaevsky, M., Beraldi, E., Fazli, L., Hurtado-coll, A., Yamanaka, K., Gleave, M. (2004): Heat Shock Protein 27 Increases after Androgen Ablation and Plays a Cytoprotective Role in Hormone-Refractory Prostate Cancer. *Cancer Res.* 64: 6595-6602.

Roehlecke, C., Schmidt, M. H. H. (2020): Tunneling Nanotubes and Tumor Microtubes in Cancer. *Cancers*. 12: 1-21.

Rustom, A., Saffrich, R., Markovic, I., Walther, P., Gerdes, H. H. (2004): Nanotubular Highways for Intercellular Organelle Transport. *Science*. 303: 1007-1010.

Sanderson, M. J., Smith, I., Parker, I., Bootman, M. D. (2014): Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harb. Protoc.* 10: 1-36.

Segerer, F. J., Röttgermann, P. J. F., Schuster, S., Alberola, A. P., Zahler S., Rädler. (2016): Versatile method to generate multiple types of micropatterns. *Biointerphases*. 11: 1-7.

Shankar, K., Mehendale, H. M. (2014): Oxidative Stress. *Encyclopedia of Toxicology*. Academic Press. 735-737.

Souza, G. R., Molina, J. R., Raphael, R. M., Ozawa, M. G., Stark, D. J., Levin, C. S., Bronk, L. F., Ananta, J. S., Mandelin, J., Georgescu, M. M., Bankson, J. A., Gelovani, J. G., Killian, T. C., Arap, W., Pasqualini, R. (2010): Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. *Nat. Nanotechnol.* 5: 291-296.

Santra, M., Dill, K. A., de Graff, A. M. R. (2018): How do Chaperons Protect a Cell's Proteins from Oxidative Damage?. *Cell Syst.* 6: 743-751.

Sowinski, S., Jolly, C., Berninghausen, O., Purbhoo, M. A., Chauveau, A., Köhler, K., Oddos, A., 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. *Nat. Cell Biol.* 10: 211-223.

Stinchcombe, J. C., Bossi, G., Booth, S., Griffiths, G. M. (2001): The Immunological Synapse of CTL Contains a Secretory Domain and Membrane Bridges. *Immunity.* 15: 751-761.

Tirnauer, J. S., Bierer, B. E. (2000): EB1 Proteins Regulate Microtubule Dynamics, Cell Polarity, and Chromosome Stability. *J. Cell Biol.* 149: 761-766.

Wang, X., Gerdes, H. H. (2012): Long-distance electrical coupling via tunneling nanotubes. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1818: 2082-2086.

Wang, X., Gerdes, H. H. (2015): Transfer of mitochondria via tunneling nanotubes rescues apoptotic PC12 cells. *Cell Death Differ.* 22: 1181-1191.

Wang, Y., Cui, J., Sun, X., Zhang, Y. (2011): Tunneling-nanotube development in astrocytes depends on p53 activation. *Cell Death Differ.* 18: 732-742.

Wang, Z. G., Liu, S. L., Tian, Z. Q., Zhang, Z. L., Tang, H. W., Pang, D. W. (2012): Myosin-Driven Intercellular Transportation of Wheat Germ Agglutinin Mediated by Membrane Nanotubes between Human Lung Cancer Cells. *ASC Nano.* 6: 10033-10041.

Watkins, S. C., Salter, R. D. (2005): Functional Connectivity between Immune Cells Mediated by Tunneling Nanotubules. *Immunity.* 23: 309-318.

Wei, Q., Huang, H., (2013): Insights into the role of cell-cell junctions in physiology and disease. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 306: 187-221.

Weil, S., Osswald, M., Solecki, G., Grosch, J., Jung, E., Lemke, D., Ratliff, M., Hänggi, D., Wick, W., Winkler, F. (2017): Tumor microtubes convey resistance to surgical lesions and chemotherapy in gliomas. *Neuro-Oncol.* 19: 1316-1326.

Yasuda, K., Park, H. C., Ratliff, B., Addabbo, F., Hatzopoulos, A. K., Chander, P., Goligorsky, M. S. (2010): Adriamycin nephropathy: a failure of endothelial progenitor cell-induced repair. *Am. J. Pathol.* 176: 1685-1695.

Yasuda, K., Khandare, A., Burianovskyy, L., Maruyama, S., Zhang, F., Nasjletti, A., Goligorsky, M. S. (2011): Tunneling nanotubes mediate rescue of prematurely senescent endothelial cells by lysosomal pool, *Aging* (Albany NY). 3: 597-608.

You, L., Temiyasathit, S., Coyer, S. R., García, A. J., Jacobs, C. R. (2008): Bone Cells Grown on Micropatterned Surfaces are More Sensitive to Fluid Shear Stress. *Cell. Mol. Bioeng.* 1: 182-188.

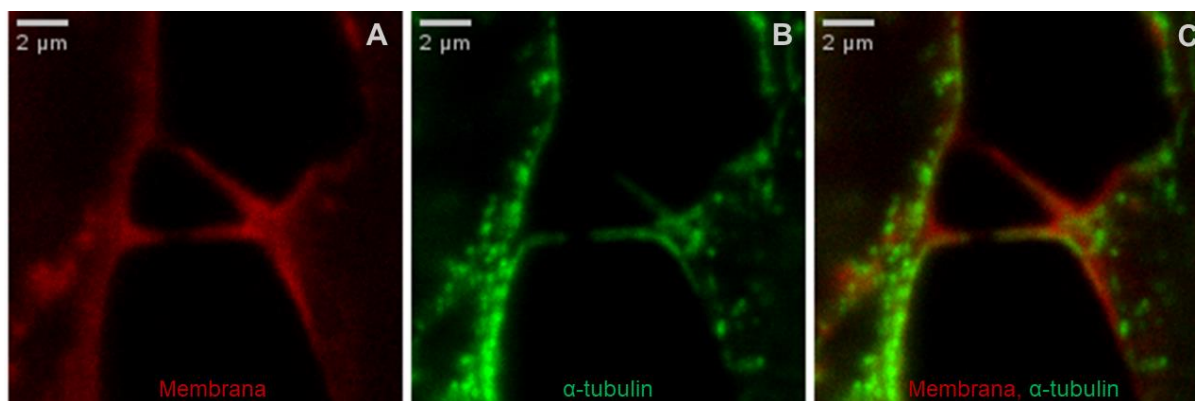
Zhang, S. (2004): Beyond the Petri dish. *Nat. Biotechnol.* 22: 151-152.

<https://www.4dcell.com/> (pristupljeno 7.7.2021.)

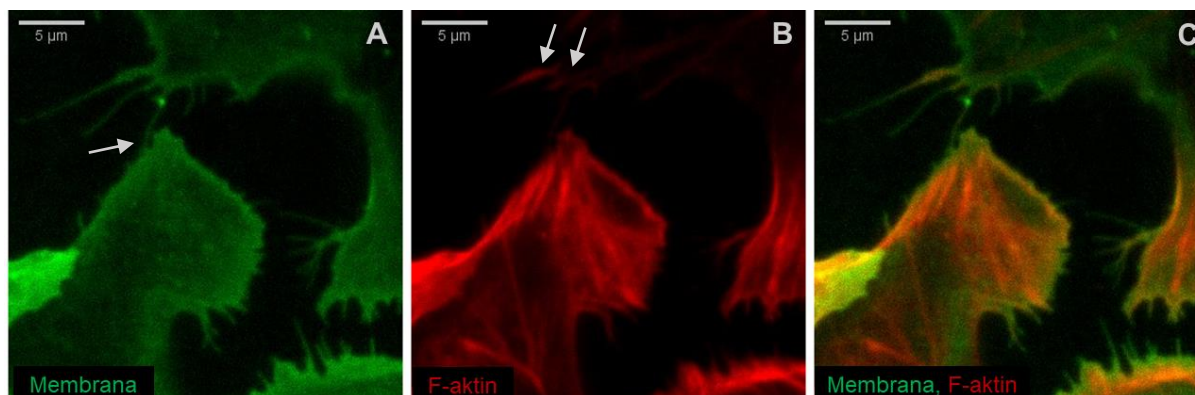
<https://www2.irb.hr/korisnici/iweber/fluovis/konfokalna.htm> (pristupljeno 23.7.2021.)

<https://svi.nl/STED-Microscopy> (pristupljeno 23.7.2021.)

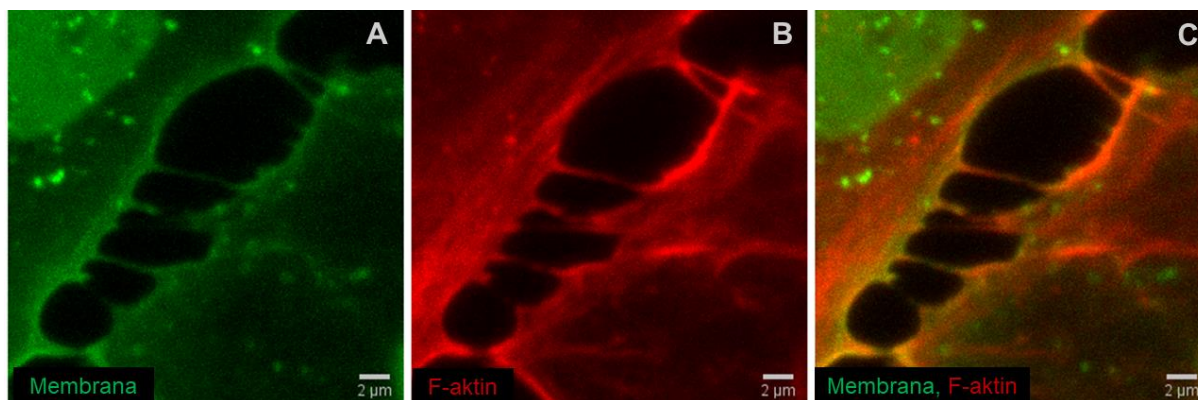
9. Prilozi



Slika 33. Prikaz TNT-a s puknućem. TNT slomljen na sredini u fiksiranim stanicama U2OS. Stanična membrana je označena bojom WGA i mikrotubuli su označeni antitijelom Alexa Fluor 488 conjugated donkey anti-rabbit. Označena veličina je 2 μm.



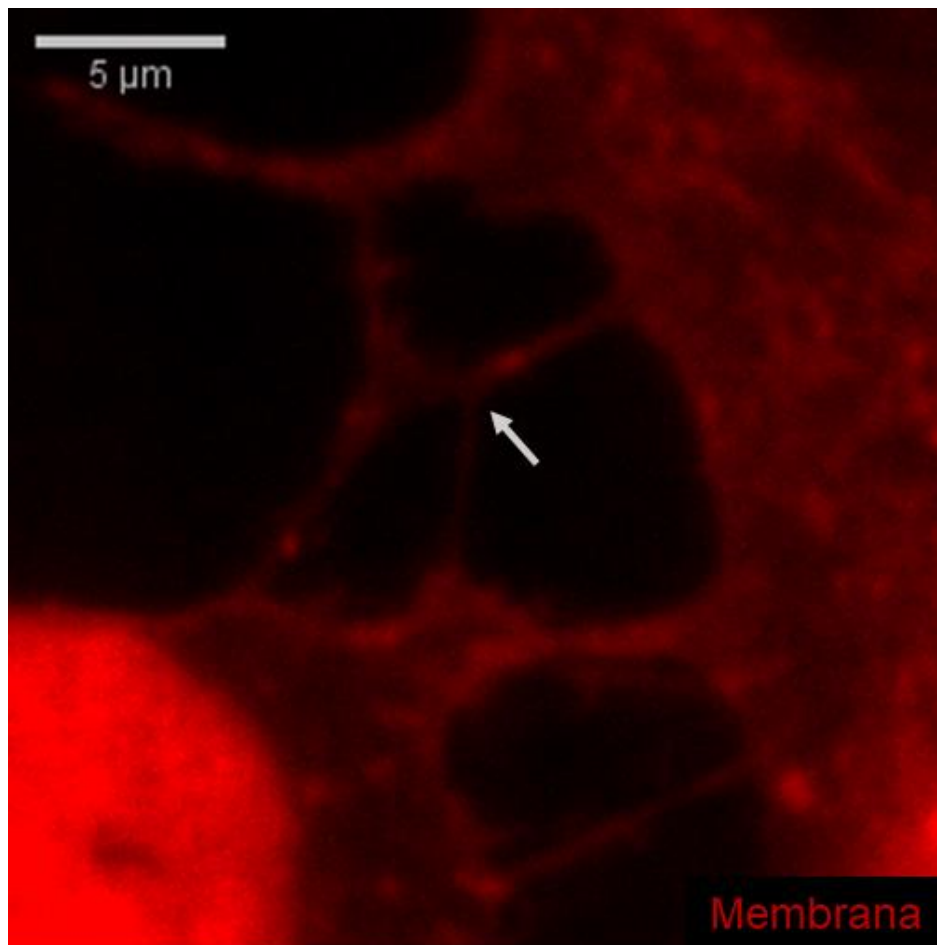
Slika 34. Prikaz filopodija u fiksiranim stanicama U2OS. **A.** Strelica prikazuje filopodij građen od stanične membrane spojen sa susjednom stanicom. **B.** Strelice prikazuju F-aktin koji se nalazi na početku filopodija. Stanična membrana je označena bojom WGA i F-aktin je označen bojom SiR-actin. Oznaka veličine je 5 μm.



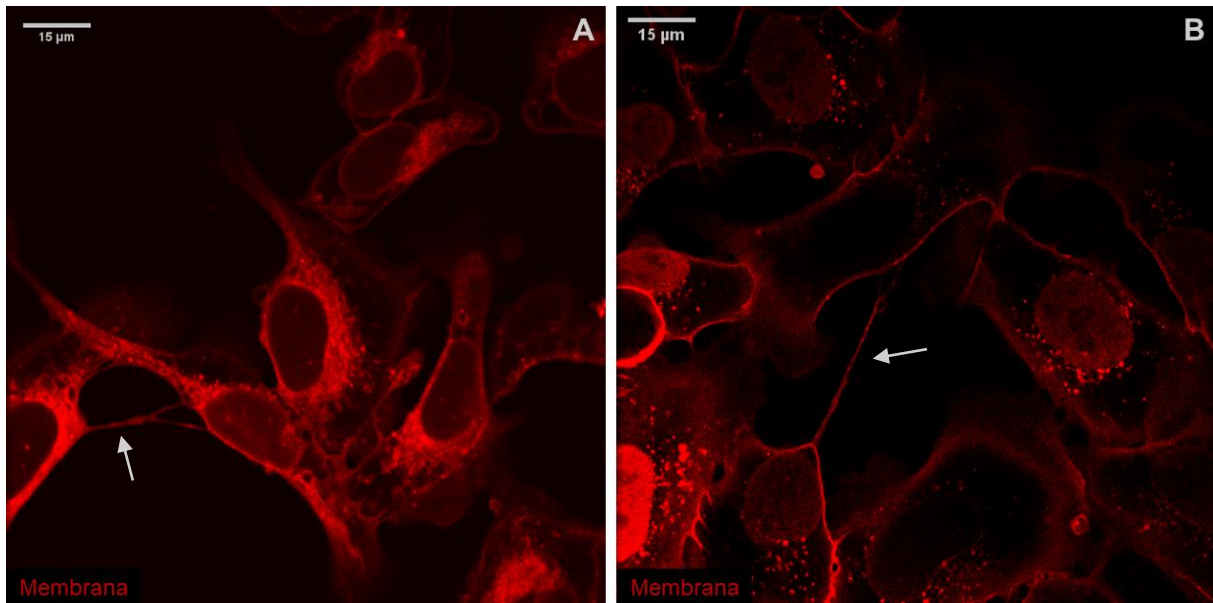
Slika 35. Prikaz stanice povezane s više TNT-ova. Stanice U2OS povezane s pet TNT-ova. Stanice su tretirane hladnoćom tri sata prije fiksacije. Stanična membrana je označena bojom WGA i F-aktin je označen bojom SiR-actin. Oznaka veličine je 2 µm.

Tablica 3. Duljina i širina premošćujućih struktura. Duljina i širina TNT-ova i TM-ova u pojedinoj skupini. Vrijednosti prikazane kao srednja vrijednost i standardna pogreška (*mean ± s.e.m.*).

Tretman	TNT		TM	
	Duljina / µm	Širina / µm	Duljina / µm	Širina / µm
Kontrola	6,059 ± 0,404	0,768 ± 0,017	14,203 ± 1,599	1,394 ± 0,052
Inhibitor J2	4,559 ± 0,162	0,778 ± 0,018	14,333 ± 3,213	1,363 ± 0,106
Tretman hladnoćom	5,488 ± 0,211	0,735 ± 0,012	16,659 ± 2,100	1,291 ± 0,031
Inhibitor J2 + tretman hladnoćom	5,342 ± 0,222	0,754 ± 0,016	12,124 ± 2,055	1,242 ± 0,033



Slika 36. Prikaz stanice s razgranatim premošćujućim strukturama. TNT povezuje stanicu sa razgranatim TM-om. Snimljeno u fiksiranim stanicama U2OS. Strelica pokazuje mjesto gdje se TNT spaja s razgranatim TM-om. Stanična membrana je označena bojom WGA. Oznaka veličine je 5 μm.



Slika 37. Prikaz stanica U2OS u 2D kulturi. Stanice U2OS u 2D kulturi su adherentne i ispružene na podlozi. Kultura je 70 % konfluentna i između stanica ima prostora. **A.** Strelica prikazuje razgranati TM. **B.** Strelica prikazuje TM sa proširenjem. Stanična membrana je označena bojom WGA. Oznaka veličine je 15 µm.

Životopis

Ime i prezime: Ana Petelinec

Email: apetelinec@stud.biol.pmf.hr

Obrazovanje

2012. – 2016. Jezična gimnazija Pula

2016. – 2021. Integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije – smjer nastavnički na Prirodoslovno – matematičkom fakultetu u Zagrebu

Publikacije

Petelinec, A., Nikša, E., Grudiček, D., Sertić Perić, M. (2020): Poučavanje teme Prehrana čovjeka putem istraživačkog učenja i osnovnih načela teorije izbora i kvalitetne škole. *Educatio biologiae*. 6: 65-79.

Popularizacija znanosti

2019. – 2020. Demonstrature iz kolegija Opća zoologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu

2019. Dan kemije i Noć biologije u sklopu Otvorenih dana Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu

2020. Vođenje radionice na YSC2 programu u sklopu Znanstvenog edukacijskog centra u Višnjanu

2021. Dan kemije u sklopu Otvorenih dana Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu

2021. Vođenje radionice na edukacijskom projektu Ljetna tvornica znanosti