

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
MEDICINOS AKADEMIJA

Renata Sveikatiienė

**MEMBRANINIŲ TUNELINIŲ
VAMZDELIŲ TARP NAVIKO
LĄSTELIŲ FORMAVIMASIS
IR SAVYBĖS**

Daktaro disertacija
Biomedicinos mokslai,
biofizika (02B)

Kaunas, 2017

Disertacija rengta 2012–2016 metais Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Kardiologijos instituto Ląstelių kultūrų laboratorijoje

Mokslinis vadovas

Prof. dr. Vytenis Arvydas Skeberdis (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biomedicinos mokslai, biofizika – 02B)

Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto biofizikos mokslo krypties taryboje

Pirmininkas

Prof. dr. Saulius Šatkauskas (Vytauto Didžiojo universitetas, biomedicinos mokslai, biofizika – 02B)

Nariai:

Prof. dr. Neringa Paužienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B)

Prof. dr. Ingrida Ulozienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

Prof. dr. Kęstutis Sužiedėlis (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biofizika – 02B)

Dr. Rytis Prekeris (Kolorado universitetas, JAV, biomedicinos mokslai, biofizika – 02B)

Disertacija ginama viešame biofizikos mokslo krypties tarybos posėdyje 2017 m. kovo 3 d. 13 val. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Kardiologijos instituto posėdžių salėje.

Adresas: Sukilėlių pr. 15, LT-50162, Kaunas, Lietuva.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES
MEDICAL ACADEMY

Renata Sveikatiene

**FORMATION AND PROPERTIES
OF TUNNELING TUBES BETWEEN
TUMOR CELLS**

Doctoral Dissertation
Biomedical Sciences,
Biophysics (02B)

Kaunas, 2017

Dissertation has been prepared at the Institute of Cardiology of Medical Academy of Lithuanian University of Health Sciences during period 2012 to 2016.

Scientific Supervisor

Prof. Vytenis Arvydas Skeberdis, PhD (Lithuanian University of Health Sciences, Biomedical Sciences, Biophysics – 02B)

Dissertation is defended at the Biophysics Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences

Chairperson

Prof. Saulius Šatkauskas, PhD (Vytautas Magnus University, Biomedical Sciences, Biophysics – 02B)

Members:

Prof. Neringa Paužienė, PhD (Lithuanian University of Health Sciences, Biomedical Sciences, Biology – 01B)

Prof. Ingrida Ulozienė, MD, PhD (Lithuanian University of Health Sciences, Biomedical Sciences, Medicine – 06B)

Prof. Kęstutis Sužiedėlis, PhD (Vilnius University, Biomedical Sciences, Biophysics – 02B)

Prof. Rytis Prekeris, PhD (University of Colorado, USA, Biomedical Sciences, Biophysics – 02B)

Dissertation is defended at the open session of the Biophysics Research Council at 1 pm on the 3rd of March 2017 in the Symposium Auditorium of Institute of Cardiology, Lithuanian University of Health Sciences.

Address: 15 Sukilėlių, LT-50162, Kaunas, Lithuania.

TURINYS

SANTRUMPOS	7
IVADAS	10
Darbo tikslas	12
Uždaviniai	12
Mokslinio darbo aktualumas ir naujumas	12
1. LITERATŪROS DISERTACIJOS TEMA APŽVALGA	14
1.1. MTV apibūdinimas	14
1.2. MTV tipai	14
1.3. MTV morfologija	15
1.4. MTV gyvavimo trukmė ir formavimosi būdai	16
1.4.1. MTV formavimasis ląstelėms išleidžiant išaugas	16
1.4.2. MTV formavimasis kontaktavusių ląstelių atsiskyrimo būdu	17
1.5. Molekuliniai MTV formavimosi mechanizmai ir veiksniai, kurie skatina arba slopina MTV formavimąsi	18
1.5.1. Koneksinų įtaka MTV formavimuisi	20
1.5.2. Koneksinų reikšmė navikų patogenezėje	21
1.6. Plyšinės jungtis turintys MTV	22
1.7. MTV funkcijos	22
1.7.1. Ląstelės turinio pernaša	25
1.7.2. Nutolusių ląstelių elektrinis ryšys per MTV	28
1.7.3. Genetinės medžiagos pernaša per PJ turinčius MTV	28
1.8. Į MTV panašios struktūros <i>in vivo</i>	29
2. TYRIMŲ METODAI	30
2.1. Ląstelių kultūros ir jų paruošimas	30
2.2. Tarpląstelinio elektrinio ryšio matavimai	31
2.3. Fluorescencijos vaizdinimo metodas	32
2.4. Ilgalaikio vaizdinimo metodas	32
2.5. Kombinuotasis elektrofiziologijos, fluorescencinės mikroskopijos ir ilgalaikio vaizdinimo metodas	33
2.6. <i>SiRNA</i> pernašos tyrimai	34
2.7. Žaizdos gijimo modelis	34
2.8. Imunocitochemijos metodas	34
2.9. Imunohistochemijos metodas	35
2.10. Statistinė duomenų analizė	35

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	37
3.1. MTV tarp <i>LSCC</i> ląstelių <i>in vitro</i> apibūdinimas.....	37
3.2. MTV formavimosi tarp <i>LSCC</i> ląstelių būdai	40
3.2.1. Pirmasis MTV formavimosi būdas	41
3.2.2. Antrasis MTV formavimosi būdas	42
3.2.3. Trečiasis MTV formavimosi būdas.....	43
3.2.4. Ketvirtasis MTV formavimosi būdas.....	43
3.2.5. Penktasis MTV formavimosi būdas	44
3.3. Elektrinio ryšio per MTV tyrimai	46
3.3.1. Koneksinų raiška <i>LSCC</i> ląstelių kultūroje ir audiniuose.....	46
3.3.2. Atskirų PJ kanalų laidumo tyrimai.....	47
3.3.3. Bendrojo PJ laidumo tyrimai	47
3.4. Įvairių komponentų pernaša per MTV	50
3.4.1. Įvairios molekulinės masės ir krūvio medžiagų pernaša.....	51
3.4.2. Organelių pernaša.....	52
3.4.3. Genetinės medžiagos pernaša.....	54
3.5. Į MTV panašios struktūros <i>LSCC</i> audinyje.....	56
3.6. Įvairių koneksinų įtaka ląstelių gebai formuoti MTV ir ląstelių judrumui <i>in vitro</i>	58
3.7. MTV tarp skirtingų tipų ląstelių <i>in vitro</i>	63
3.8. Rezultatų aptarimas	65
3.9. Rekomendacijos	68
IŠVADOS	69
BIBLIOGRAFIJOS SĄRAŠAS.....	70
MOKSLINĖS PUBLIKACIJOS.....	88
Publikacijos disertacijos tema	91
SUMMARY	117
CURRICULUM VITAE	131
PADĖKA	132

SANTRUMPOS

- Akt-PI3K-mTor* – serino ir treonino kinazės (*Akt*), fosfatidilinozido 3 kinazės (angl. *phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K*) ir rapamicino taikiny s žinduolių organizme (angl. *mammalian target of rapamycin, mTOR*) yra ląstelės ciklo reguliacijai svarbus signalizavimo kelias.
- ATF – adenzintrifosfatas.
- CaCl₂ – kalcio chloridas.
- CAD – pelės katecholaminerginių neuronų (ląstelių) linija.
- cAMF – ciklinis adenzinmonofosfatas.
- cdc42* – *Rho* GTFazės baltymų šeimos baltymas.
- Cx – angl. *connexins* – koneksinai.
- DIC – angl. *differential interference contrast (DIC) microscopy* – diferencinės interferencijos fazių kontrastinė mikroskopija.
- DMEM – angl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium* – Dulbecco modifikuota Eagle terpė.
- EDTA – angl. *ethylenediaminetetraacetic acid* – etilenediamintetraacto rūgštis.
- EGTA – angl. *ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid* – aminopolikarboksilo rūgštis.
- Env – angl. *envelope glycoprotein* – virusų apvalkalo baltymas.
- EPB1, EPB2 – angl. *epithelial bridges* – atitinkamai pirmojo ir antrojo tipo epiteliniai tilteliai.
- Fas – *TNFα* šeimai priklausantis transmembraninis baltymas.
- g_p, g_T* – atitinkamai plyšinės jungties ar MTV laidumas.
- HeLa – 1951 m. Baltimorėje iš Henrietta Lacks gimdos kaklelio naviko mėginio išvesta ląstelių linija – pirmosios žmogaus ląstelės, kurios galėjo būti auginamos laboratorijoje *in vitro* neribotą laiką.
- HEK – angl. *human embryonic kidney* – žmogaus embriono inkstų ląstelių linija.
- HEPES – 4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetanesulfono rūgštis.
- hMSC – angl. *human mesenchymal stem cells* – žmogaus mezenchimos kamieninės ląstelės.
- HUVEC – angl. *human umbilical vein endothelial cells* – žmogaus virkštelės venos endotelio ląstelių linija.
- I_j, I_T* – atitinkamai srovė per plyšinę jungtį ar MTV.
- IF₃ – inozitoltrifosfatas.
- KCl – kalio chloridas.

KOH –	kalio hidroksidas.
LPS –	lipopolisacharidas.
LSCC –	angl. <i>laryngeal squamous cell carcinoma</i> – gerklų plokščiųjų ląstelių piktybinio naviko ląstelių linija.
LST1 –	specifinis leukocitų transkriptas 1.
ME –	mikroelektrodas.
miRNA –	angl. <i>micro RNA</i> – genų raiškos reguliacijoje dalyvaujanti endogeninės kilmės mažoji arba trumpoji nekoduojanti ribonukleino rūgštis.
MgATF –	ATF magnio druska.
MgCl ₂ –	magnio chloridas.
Myo10 –	miozinas X.
M Sec –	naviko nekrozės faktoriaus alfa sužadinamas baltymas 2 (dar vadinamas B94).
MTV –	membraninis tunelinis vamzdelis.
NaCl –	natrio chloridas.
NaOH –	natrio hidroksidas.
NCC –	angl. <i>neural crest cell</i> – nervinės skiauterės ląstelės.
Nef –	angl. <i>negative regulatory factor</i> – virusų neigiamo reguliavimo veiksnys.
NK –	angl. <i>natural killer cells</i> – ląstelės žudikės.
NRK –	angl. <i>normal rat kidney</i> – normalių žiurkių inkstų ląstelių linija.
PC12 –	angl. <i>rat pheochromocytoma</i> – žiurkių feochromocitomos ląstelių linija.
pH –	vandenilio potencialas.
PJ –	plyšinė jungtis.
p53 –	transkripcijos faktorius.
RAGE –	angl. <i>receptor for advanced glycation end products</i> – išplėstinio glikozilinimo galutinių produktų receptorius.
Rho GTFazės –	Rho šeimos mažosios guanozino trifosfatazės.
siRNA –	angl. <i>small interfering RNA</i> arba <i>short interfering RNA</i> – genų raiškos reguliacijoje dalyvaujanti egzogeninės kilmės mažoji arba trumpoji nekoduojanti ribonukleino rūgštis.
SNARE –	angl. <i>Soluble N-ethylmaleimide sensitive fusion proteins Attachment Protein Receptor</i> – tirpiuosius N-etilmaleimidui jautrius susiliejimo baltymus prisijungiančiojo baltymo receptorius.
THP 1 –	žmogaus monocitų ląstelių, išskirtų iš ūmine monocitine leukemija sergančio paciento organizmo, linija.
TNF α –	angl. <i>the tumor necrosis factor α</i> – naviko nekrozės faktorius alfa.

TNFAip2 – 2 tipo *TNF α* sužadinas baltymas.

V_j , V_T – įtampa tarp ląstelių, tiesiogiai sąveikaujančių atitinkamai per plyšines jungtis arba MTV.

ZOI – glaudziųjų jungčių (angl. *the tight junction*) baltymas.

ŽIV – žmogaus imunodeficito virusai.

ŽTLV – žmogaus T ląstelių limfotropiniai virusai.

IVADAS

Įvairūs audiniai – gerai organizuotos sąveikaujančių ląstelių sistemos. Sinchroniška ląstelių tarpusavio sąveika yra svarbus veiksnys įvairių rūšių daugialąsčių organizmų vystymuisi, embriogenezei, audinių atsinaujinimui, gyvybinių funkcijų ir homeostazės palaikymui, ląstelių diferenciacijai, reprogramavimui, migravimui ir išgyvenimui, imuniniams procesams, taip pat patologinių procesų atsiradimui ir progresavimui, įskaitant piktybinius navikus, virusines ir bakterijų sukeltas infekcines ligas, neurodegeneracines ar autoimunines ligas [157, 177]. Kuo sudėtingesnis organizmas, tuo didesnė ląstelių sąveikos, perduodant ilgalaikę ir trumpalaikę informaciją, svarba ir būdų įvairovė.

Informacijos perdavimo iš vienos ląstelės į kitas įvairovė yra labai didelė. Daugumai šių signalizavimo procesų yra būtina tiesioginė ląstelių sąveika. Praėjusio šimtmečio pabaigoje manyta, kad visi įmanomi ląstelių tarpusavio sąveikos būdai, susiję su parakrininio ir endokrininio signalizavimo mechanizmais bei kontaktine ląstelių sąveika per sinapses, priekibos, glaudžiąsias ar plyšines jungtis (tarp gyvūnų ląstelių) ar plazmodezmas (tarp augalų ląstelių), jau atrasti [99]. Vis dėlto XXI amžiaus pradžioje buvo atrasti nauji galimi sąveikos tarp ląstelių būdai: 2004 m. pirmą kartą paskelbta apie du svarbius atradimus šioje srityje. Pirmiausia aprašytos mažos (30–90 nm skersmens) pūslelės (vadinamosios egzomosos), kuriose yra saugomos ir pernešamos molekulės [51]. Maždaug tuo pačiu laiku pirmą kartą paskelbta apie *in vitro* tarp nutolusių žiurkių feochromocitomos (*PC12*), žmogaus embriono inkstų (*HEK*) ar normalių žiurkių inkstų (*NRK*) ląstelių susiformuojančias aktino turinčias membranines struktūras, kurios dėl labai mažų matmenų (*nano* skalės dydžio) buvo pavadintos tuneliniais nanovamzdeliais [158], o kita nepriklausoma tyrėjų grupė pastebėjo ir aprašė tarp imuninių ląstelių susiformuojančių trumpai gyvujančių membraninių tunelinių vamzdelių (MTV) tinklus [136]. Buvo pastebėta, kad per MTV į nutolusias ląsteles gali būti selektyviai pernešamos membraninės pūslelės ir organelės [136, 158]. Vėliau buvo aprašyta, kad *in vitro* MTV formuoja ir įvairių kitų rūšių ląstelės, įskaitant epitelio, imunines [42, 135, 136, 181], kamienines [139] ar nervinio audinio ląsteles [195, 222], be to, MTV gali sujungti ir skirtingų tipų ląsteles (pvz., kardiofibroblastus su kardiomiocitais [66], kaulų čiulpų mezenchimos ar endotelio ląsteles su įvairių navikų ląstelėmis [139]). Tolesni tyrimai atskleidė didelę šių struktūrų morfologijos bei funkcijų įvairovę ir parodė, kad jomis iš vienos ląstelės į nutolusias per MTV sujungtas ląsteles gali būti tiesiogiai pernešami įvairūs ląstelės komponentai, pavyzdžiui: citoplazmoje esančios molekulės (gliukozė, glutationas, gluta-

matas, ciklinis adenozinmonofosfatas (cAMF), inozitoltrifosfatas (IF_3), adozintrifosfatas (ATF)), natrio (Na^+), kalio (K^+) ir kalcio (Ca^{2+}) jonai [4, 178, 202], pūslelės su įvairiomis smulkiomis organelėmis (ankstyvosiomis endosomomis, endoplazminių tinklu, Goldžio kompleksu, lizosomomis) [82, 83, 88, 178, 195, 198] ir net santykinai stambios organelės (pvz., mitochondrijos) [93, 116]. Patologinių mikroorganizmų išplitimas šeimininko organizme, įskaitant bakterijų [135], žmogaus imunodeficitą virusą (ŽIV) [82, 83, 171, 181] ir žmogaus T ląstelių limfotropinių virusų (ŽTLV) [191], taip pat yra susijęs su MTV. Per MTV į nutolusias ląsteles pernešti patogeniniai prionai [61, 62, 123, 195] ir kiti patologiniai baltymai (pvz.: ŽIV 1 *Nef* baltymas [210], beta amiloidas [61, 195] ar patologinio Hantingtono baltymo agregatai [36]) išplinta šeimininko organizme. Ląstelių judėjimas bei bakterijų atpažinimas taip pat yra susiję su MTV susiformavimu (apžvelgta [4, 68, 88]).

Taigi, per dešimtmetį buvo sukaupta nemažai žinių, rodančių, kad tarp nutolusių ląstelių besiformuojantys MTV yra gyvybiškai svarbūs organizmų vystymuisi ir regeneracijai, bet susiję ir su įvairiais patologiniais procesais. Pastebėta, kad tarp skirtingų rūšių ląstelių susiformuojantys labai įvairūs MTV vykdo skirtingas funkcijas, nors išryškėjo ir tam tikri MTV formavimosi, struktūros ir funkcijų dėsningumai, susiję su įvairių ligų (pvz., neurodegeneracinių ligų ir pikybinių navikų) patogenezė. Visgi tikslūs MTV formavimosi mechanizmai ir tai, kuo skiriasi skirtingu būdu susiformavusių MTV struktūra bei funkcijos, vis dar nėra galutinai ištirta [42, 116], o tai labai svarbu, norint išsiaiškinti šiuo metu nepagydomų ar sunkiai gydomų ligų (pvz., įvairių pikybinių navikų, įskaitant glioblastomą, ir neurodegeneracinių sutrikimų) patogenezę, profilaktikos ir gydymo galimybes. 2012 metais, kai buvo pradėti rinkti duomenys šiai disertacijai, apie MTV egzistavimą audiniuose buvo žinoma labai mažai (tik Holly R. Chinnery su bendradarbiais buvo paskelbė apie MTV pelių ragenoje [33]), nebuvo informacijos apie šias struktūras žmogaus organizme ar jų reikšmę vėžio ar neurodegeneracinių ligų patogenezėje. Tuo metu, kai buvo paskelbti pirmieji mūsų tyrimo duomenys, literatūroje radome tik vieną publikaciją, aprašančią MTV žmogaus piktybinio naviko audinyje [110]. Trūko žinių ir apie didesnės molekulinės masės komponentų pernašos per MTV galimybes ir mechanizmus, o apie galimą tiesioginio genetinės informacijos perdavimo per MTV į nutolusias ląsteles galimybę net nebuvo oficialiai iškeltų hipotezių.

Iškelta hipotezė, kad koneksinai (Cx) gali būti svarbūs ląstelių adhezijai, migravimui, dalijimuisi, diferenciacijai ir supiktybėjimui (apžvelgta [130]), tačiau Cx įtaka ląstelių gebai formuoti MTV ir nutolusių ląstelių sąveikai per MTV, susijusiai su ląstelių geba migruoti, vis dar nebuvo ištirti ir aprašyti.

Darbo tikslas

Ištirti MTV formavimąsi tarp gerklų plokščiųjų ląstelių piktybinio naviko (angl. *laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC*) ląstelių bei jų savybes ir Cx įtaką MTV formavimuisi bei ląstelių judrumui.

Uždaviniai

Siekiant įgyvendinti darbo tikslą, buvo užsibrėžti šie uždaviniai:

- 1) ištirti MTV tarp nutolusių *LSCC* ląstelių *in vitro* savybes:
 - MTV formavimosi būdus, geometriją ir morfologiją;
 - elektrinį ryšį per MTV;
 - MTV pralaidumą įvairaus krūvio ir molekulinės masės medžiagoms;
 - MTV formavimosi tarp skirtingų tipų ląstelių galimybę;
- 2) įvertinti į MTV panašių struktūrų egzistavimą *LSCC* audinyje;
- 3) įvertinti egzogeninių *Cx36*, *Cx40*, *Cx43*, *Cx45* ir *Cx47* įtaką modelinių *HeLa* ląstelių judrumui ir MTV tarp jų formavimuisi.

Mokslinio darbo aktualumas ir naujumas

Tyrimai rodo, kad MTV tarp skirtingų tipų ląstelių formuojasi įvairiais būdais, o jų struktūros, geometrijos, gyvavimo trukmės bei vykdomų funkcijų įvairovė labai didelė. Skiriasi ir susiformavusių MTV reikšmė fiziologiniams ar patologiniams procesams. Po to, kai 2004 m. MTV buvo aprašyti pirmą kartą, kilo daug diskusijų ir nesutarimų dėl ląstelių gebos formuoti MTV gyvame organizme. Teigta, kad tai tik ląstelių *in vitro* savybė.

Prieš pradėdant rinkti duomenis šiam disertaciniam darbui, literatūroje rasta labai nedaug duomenų apie MTV formavimąsi tarp piktybinio naviko ląstelių (rastos publikacijos su antinksčių [158], priešinės liaukos [193], gaubtinės žarnos [29] ir glioblastomos [144] ląstelių tyrimų *in vitro* rezultatais), o duomenų apie MTV formavimąsi ir morfologiją piktybiniuose navikuose *in vivo* ar *ex vivo*, įskaitant gerklų plokščiųjų ląstelių navikus, nerasta. Pirmieji pranešimai apie audiniuose pastebėtas į MTV panašias struktūras (pelės ragenoje ir žmogaus pleuros mezoteliomos bei adenokarcinomos audiniuose) pasirodė doktorantūros studijų metu [110, 139, 170], tačiau mes pirmieji aprašėme dviejų tipų membranines struktūras, susiformuojančias tarp *LSCC* ląstelių *in vitro* (vienų sudėtyje buvo vien F aktino, o kitų – ir F aktino, ir mikrotubulių), bei penkis jų formavimosi būdus, o aprašydami MTV spindyje pastebėtas mitochondrijas, pirmieji įvertinome, kad MTV spindžiu juda ne pavienės organelės, o formuojasi

ištisi mitochondrijų tinklai. Be to, pirmieji atskleidėme, kad į MTV panašios dviejų tipų struktūros egzistuoja ir audinyje *ex vivo*.

Elektrinio ryšio ir tiesioginės ląstelės komponentų pernašos per MTV į nutolusias ląsteles savybės vis dar iki galo neištirtos, todėl tyrėme ir kiekybiškai įvertinome įvairios molekulinės masės bei krūvio fluorescencinių medžiagų pernašą per MTV į nutolusias *LSCC* ar *HeLa* ląsteles, pirmieji įvertindami įvairių *Cx* įtaka MTV formavimuisi ir ląstelių gebai migruoti. Taip pat iki šiol mes vieninteliai aprašėme galimą *siRNA* tiesioginę pernašą per MTV į nutolusias ląsteles, pirmiausia atskleisdami *siRNA* pernašą per MTV tarp *LSCC* ląstelių, o vėliau ir iš egzogeninių *Cx* suformuotų plyšinių jungčių (PJ) įtaką šiai pernašai.

Atliktų tyrimų ir paskelbtų duomenų aktualumą bei reikšmę rodo tarptautinis susidomėjimas publikacija su *LSCC* tyrimo duomenimis (<https://globalmedicaldiscovery.com/key-scientific-articles/long-distance-communication-laryngeal-carcinoma-cells/>).

1. LITERATŪROS DISERTACIJOS TEMA APŽVALGA

1.1. MTV apibūdinimas

MTV yra šviesiniu mikroskopu matomi lipidinio dvisluoksnio membranos gaubiami vamzdeliai, suformuojantys tunelius, tiesiogiai sujungiančius nutolusių ląstelių citozolius. Priklausomai nuo ląstelių tipo, šios membranos struktūros gali būti nuo 20 nanometrų (nm) (mažiausias išmatuotasis skersmuo [4]) iki daugiau nei 1 mikrometro (μm) skersmens bei sujungti ląsteles, esančias už atstumo, keletą kartų viršijančio ląstelės didžiausią skersmenį [4, 42, 88, 89, 116, 158]. Skiriamasis MTV, įskaitant nanovamzdelius, požymis yra jų geba neliesti substrato *in vitro* [3, 4, 158]. Pirmiausia aprašyti PC12 ląstelių kultūroje stebėti MTV dėl *nano* skalės matmenų (vamzdelių skersmuo buvo 50-200 nm) ir gebos formuoti tunelius tarpląsteliname užpilde buvo pavadinti tuneliniais nanovamzdeliais [158]. Tačiau vėliau buvo pastebėta daug morfologinių ir struktūrinių MTV, sujungiančių skirtingų rūšių ar net tos pačios rūšies ląsteles, skirtumų (apžvelgta [4, 42, 88, 89, 116]). Tiriant ląstelių kultūras, kartais jie gali likti nepastebėti, nes MTV matmenys yra arti optinės skiriamosios gebos ribos (200 nm) [68]. Mes šias struktūras vadiname membraniniais tuneliniais vamzdeliais (MTV), nes, remiantis tarptautinės standartizacijos organizacijos apibrėžimu, *nano* objektų matmenys yra iki 100 nm, o mūsų stebėtų MTV skersmuo kartais viršijo vieną mikrometrą. Tarp dviejų ląstelių gali susiformuoti daug MTV (pvz.: Russell D. Salter ir Simon C. Watkins, suskaičiavo iki 75 MTV, sujungiančių nutolusias imunines ląsteles) [161]. Be to, jie gali sujungti ne tik pavienes ląsteles, bet ir formuoti ląstelių tinklus [33, 136, 158, 202].

1.2. MTV tipai

Pagal pradinį apibrėžimą MTV yra nutolusias ląsteles kultūroje sujungiantys atviri membraniniai tuneliai [158]. Tačiau imuninių ląstelių tyrimai atskleidė, kad, atsiskiriant kontaktavusioms ląstelėms, susiformuoja uždari MTV [30, 181]. Buvo pastebėta, kad tokių uždarų MTV membrana iš užkrėstų T ląstelių į neužkrėstas nutolusias ląsteles yra pernešami ŽIV 1, o ši pernaša susijusi su membranoje esančiais receptoriais [181]. Atsiskiriant kontaktavusioms ląstelėms žudikėms (angl. *natural killer*, NK ląstelėms) susiformavę uždari MTV gali būti susiję su citotoksiniu poveikiu [30]. Kai kurie MTV gali turėti įtampos valdomas PJ, susidariusias iš Cx [197, 198]. Žmogaus organizme aptinktas 21 skirtingas savybes turinčių Cx tipas, nuo

kurių gali priklausyti ne tik MTV elektrinis laidumas ar pralaidumas, bet ir MTV formavimasis, geometrija bei ląstelių geba migruoti.

2010 metais buvo pastebėtos ir aprašytos membraninės struktūros, pavadintos epiteliniais tilteliais (angl. *epithelial bridges*, *EPB*) [214, 215]. Šie 1–20 µm skersmens MTV yra iki šiol ilgiausi aprašyti (ilgesni nei 1 mm) tiesioginį ryšį tarp ląstelių sukuriantys MTV. Epitelinių tiltelių sudėtyje buvo ir F aktino, ir mikrotubulių, jiems, kaip ir kitiems MTV, yra būdinga nesukibimo su substratu *in vitro* savybė. Pirmojo tipo epiteliniais tilteliais (*EPB1*) buvo pernešami įvairūs ląstelių komponentai, o antrojo tipo (*EPB2*) – tarp nutolusių ląstelių salelių buvo pernešamos ląstelės ar ląstelių grupės, o tai yra visiškai naujas ląstelių migravimo būdas [214, 215].

1.3. MTV morfologija

Po MTV membrana yra citoplazmos gaubiami ląstelės griaučių komponentai su motoriniais ir formavimąsi valdančiais baltymais. Daugumoje MTV yra F aktino, tolygiai išsidėstančio per visą vamzdelio ilgį [158]. Apskritai F aktinas yra laikomas MTV žymeniu ir yra labai svarbus veiksnys formuojantis MTV, jų patvarumui bei komponentų pernašai šiomis struktūromis [3]. Remiantis literatūros duomenimis, plonuosiuose MTV, kurių skersmuo yra mažesnis kaip 100 nm (tuneliniuose nanovamzdeliuose), dažniausiai yra aptinkama tik F aktino, o storesniuose (kurių skersmuo yra didesnis kaip 100 nm) – kartu gali būti ir mikrotubulių [66, 135, 158, 197].

Nors pripažįstama, kad F aktinas yra būtinas MTV tarp nutolusių eukariotinių ląstelių komponentas (ir naudojamas šioms struktūroms *in vitro* atpažinti), tačiau F aktino nebuvo iki kelių šimtų mikrometrų ilgio citokeratino turinčiuose MTV, susiformavusiuose tarp modeliinių šlapimo pūslės epitelio ląstelių. Manoma, kad tokie vamzdeliai greičiausiai nevykdo signalinių funkcijų [192]. F aktino neaptikta ir kai kuriuose neuronus su astrocituais sujungiančiuose MTV [197]. Iškelta hipotezė, kad F aktinas yra svarbus tik pradedant formotis MTV, bet ne toks svarbus vėlesniuose išaugų ilgėjimo ir stabilizavimosi etapuose. Todėl F aktino visada randama trumpuosiuose, bet ne visada jo yra ilguosiuose MTV [197].

Tarp žmogaus plaučių mezoteliomos ir adenokarcinomos ląstelių susiformavusiuose MTV be F aktino dar buvo pastebėti erzinas (kuris susieja aktiną su ląstelės membrana) ir fascinas (proteinkinazės *Ca* reguliuojamas aktiną susiejantis baltymas, kuris skatina formotis naviko ląstelių išaugas ir vėlesnį šių ląstelių metastazavimą bei yra susijęs su blogesne išplitusių navikų prognoze) [69, 78]. Daugiausiai fascino buvo išaugos formavimosi iš plazminės membranos vietoje, o PJ formavimosi srityje identifikuotas glau-

džiųjų jungčių baltymas *ZOI*, todėl manoma, kad šie baltymai taip pat gali būti susiję su membraninių išaugų formavimusi [110].

1.4. MTV gyvavimo trukmė ir formavimosi būdai

Tyrimai rodo, kad MTV *in vitro* yra dinamiškos, trumpalaikės, mechaninių bei cheminių dirgiklių bei šviesos ekspozicijos pažeidžiamos struktūros, kurios yra gan atsparios *EDTA* tripsino poveikiui [158]. Pirmiausia aprašytieji MTV tarp *PC12* ląstelių susiformavo per keletą minučių *de novo* aktino polimerizacijos būdu ir gyvavo nuo kelių minučių iki kelių valandų [158]. Tarp *NRK* ląstelių susiformavę MTV buvo trumpalaikės dinamiškos struktūros, gyvuojančios vidutiniškai 40,7 minutes [63], o MTV tarp T ląstelių gyvavo dar trumpiau – vidutiniškai mažiau kaip 15 min. [181]. Tai, kad MTV formavimąsi ir išlikimą blogina cheminės medžiagos, mechaninės deformacijos ir šviesa, labai komplikuoja šių struktūrų eksperimentinius tyrimus [198]. Jų aptikimą gyvame organizme riboja ne tik pirmiau nurodyti veiksniai (trumpas gyvavimo laikotarpis ir pažeidžiamumas), bet ir tai, kad vis dar nėra atrastų specifinių žymenų, kurie padėtų aptikti MTV *in vivo* [116].

Naudojant skirtingus metodus, buvo nustatyta ir aprašyta, kad MTV tarp gyvūnų ląstelių formuojasi dviem pagrindiniais būdais [42, 217]. Pirmasis iš literatūroje aprašytų būdų – tai MTV susiformavimas iš membraninių išaugų (filopodijų, lamelipodijų), kurios ilgėdamos pasiekia nutolusias ląsteles. Šiuo būdu MTV formuoja nejudrios arba mažai judrios ląstelės [25, 217]. Antruoju būdu MTV susiformuoja, kai kurį laiką kontaktavusios ląstelės pradeda tolti viena nuo kitos. Tokiu būdu MTV formuoja judrios ląstelės (pvz., imuninės ląstelės, kurios turi daugiau galimybių suartėti ir susiliesti su kitomis ląstelėmis) [116, 181, 217], tačiau MTV formavimasis tokiu būdu buvo stebėtas ir tarp mažiau judrių ląstelių (pvz: *NRK* ar *NCC* ląstelių) [181, 200]. Be to, vienos rūšies ląstelės gali formuoti MTV abiem būdais [4].

1.4.1. MTV formavimasis ląstelėms išleidžiant išaugas

Dauguma MTV susiformuoja F aktino polimerizacijos būdu išaugant į filopodijas ar lamelipodijas panašioms išaugoms. Literatūroje aprašyta, kad šiuo būdu formuojantis MTV membraninių išaugų galiukuose yra motorinio baltymo miozino X (*Myo10*) (maždaug 10–100 *Myo10* molekulių [87]), kuris ne tik skatina membraninę išaugą atsirasti ir ilgėti, bet ir yra svarbus funkcionalių MTV formavimosi veiksnys [87]. Veikiant *Myo10* susiformavusios filopodijos neliečia substrato *in vitro* ir ilgėja mechanizmu, nepriklausomu nuo sukibimo su substratu [18]. Ilgėdamos filopodijos tarsi

tyrinėja aplinką, aptikusios nutolusią ląstelę, paliečia jos membranos paviršių, tada šliauždamos paviršiumi suranda tinkamą prisijungimo vietą, kurioje dėl N kadherino ir jį priimančiojo pritaikymo baltymo beta katenino sąveikos susiformuoja jungtys (tarsi išmetami inkarai) [107]. Vienos ląstelės ilgėjančiai membraninei išaugai palietus kitą ląstelę (arba susilietus dviejų ląstelių išaugoms), gali susiformuoti atviri, uždari ar PJ turintys MTV [4]. Membraninių išaugų galiukuose aptiktas baltymas afadinas turėtų palengvinti šį procesą [22].

Tačiau atviri vamzdeliai šiuo būdu susiformuoja palyginti retai [123, 158]. Kad šiuo būdu susiformuotų atviras MTV, tiesiogiai sujungiantis dviejų ląstelių citozolius, pirmiausia turi savaime arba dalyvaujant susiliejimo veiksniams (pvz.: *SNARE* baltymams, sinaptotagminams, virusų susiliejimo baltymams) susilieti susiformavusių išaugų membranos [79, 97, 114]. Manoma, kad tokiam dviejų ląstelių membranų dvisluoksnių susiliejimui yra būtina stabili naviko nekrozės faktoriaus alfa (angl. *the tumor necrosis factor α , TNF α*) sužadinto baltymo, vadinamo *M Sec*, raiška [134]. Membranų susiliejimas priklauso nuo membranos lipidinio dvisluoksnio sudėties ir gebos deformuotis [94]. Tam paprastai naudojama energija, gaunama iš susiliejimo baltymų [62, 79, 97, 114]. Manoma, kad šių baltymų molekulės kaupiasi filopodijos, iš kurios formuojasi MTV, galiuke. Pirmiausia įvyksta dalinis membranų susiliejimas (t. y. susilieja tik išorinis lipidų sluoksnis, o vidiniai ląstelių membranų sluoksniai vis dar būna atskiri). Vėliausiai, susiformavus porai, dviejų nutolusių ląstelių citozoliai susijungia ir todėl šios ląstelės gali tiesiogiai sąveikauti [4, 107].

1.4.2. MTV formavimasis kontaktavusių ląstelių atsiskyrimo būdu

Maža dalis (maždaug 7 proc.) MTV formuojasi atsiskiriant pirmiau kontaktavusioms ląstelėms [4]. Susiformavusio MTV membraną tokiu atveju gali sudaryti vienos arba abiejų ląstelių membranos [42, 57, 88, 158]. Šiuo atveju yra svarbi glaudaus ląstelių kontakto trukmė: kuo ji ilgesnė, tuo didesnė funkcionalių MTV susiformavimo tikimybė [180, 181]. Kartais gali būti sunku vizualiai atskirti, ar ląsteles sujungiantis vamzdelis yra MTV, ar tik besidalijančias, bet dar galutiniai neatsiskyrusias ląsteles sujungiantis tiltelis. Buvo pasiūlyta, kad šiuo atveju MTV skiriamasis požymis yra liekamojo (vidurinio) kūnelio nebuvimas [3, 88]. Priešingomis kryptimis judančioms ląstelėms tolstant vienai nuo kitos, iš pradžių susiformuoja atviras MTV, kuriam užsivėrus, dvi nutolusias ląsteles vis dar gali jungti uždaras MTV [181].

1.5. Molekuliniai MTV formavimosi mechanizmai ir veiksniai, kurie skatina arba slopina MTV formavimąsi

MTV ir su jais susijusių membraninių išaugų formavimosi molekuliniai mechanizmai dar nėra gerai ištirti. Įvairūs tyrėjai, eksperimentavę su skirtingų rūšių ląstelėmis, pateikia skirtingus pastebėjimus apie MTV formavimosi mechanizmus ir skirtingas savo pastebėjimų interpretacijas.

MTV formavimąsi *in vitro* skatina įvairūs veiksniai (apžvelgta [89]): serumo trūkumas [33, 110, 195], uždegimas [33, 49, 72], oksidacinis stresas [44, 195, 221], mažas *pH* hiperglikemijos sąlygomis [110], aukšta temperatūra ir toksinai [81], virusinė infekcija [181], įskaitant ŽIV [6, 50, 129, 132, 133, 210] ir ŽTLV [191], ultravioletinė (UV) spinduliuotė [72] ir kiti veiksniai. *p53* aktyvinimas gali sužadinti *M Sec*, *EGFR* ir *Akt-PI3K-mTOR* signalizavimo kelią ir taip skatinti MTV formavimąsi [195]. *M Sec* raišką didinantys *TNFA* ir prouždegiminis lipopolisacharidas (LPS) taip pat yra MTV formavimąsi sužadinantys veiksniai [33, 149]. Manoma, kad su *M Sec* baltymu ir *Rho* GTFaze *RalA* sąveikaujantis baltymas leukocitų specifinis transkriptas 1 (LST1), kaip ir *EGFR* ir *Akt-PI3K-mTOR*, veikia membranos ir ląstelės griaučių reorganizaciją, F aktino polimerizaciją, sužadina ir moduliuoja išaugų bei funkcionalių MTV formavimąsi, ląstelės poliarizaciją ir adheziją [153, 167, 194, 195, 212]. Ląstelių poliarizacija ir adhezija literatūroje nurodytos kaip svarbios sąlygos susiformuoti stabiliems funkcionaliems MTV tarp imuninių ląstelių [30]. Yra duomenų, kad ląstelės, reaguodamos į stresą, išskiria į aplinką nežinomus baltymus ar metabolitus, į kuriuos reaguodamos kitos ląstelės, pradeda formuoti MTV [72, 195]. Buvo aptiktos mažos Ca^{2+} jonus prisijungiančio baltymo molekulės, kurios apibūdintos kaip išaugų kryptį orientuojančios molekulės S100A4, ir jų išplėstinio glikozilavimo galutinių produktų receptoriai (*RAGE*) [183]. Be chemotaksio, būtina įvairių ląstelės membranoje esančių baltymų sąveika. Literatūros duomenimis, formuojantis MTV, yra svarbūs *cdc42*, *Myo10*, *p53*, *M Sec*, LST1, filaminas, *RalA* GTFazė, *Ral* prisijungiantis baltymas 1 ir endocistos kompleksas [4, 183, 195]. Filopodijų galiukuose aptiktas baltymas *Myo10*, sąveikaudamas su daug kitų baltymų ar lipidų, sužadina ir reguliuoja filopodijų ilgėjimą. Padidėjus *Myo10* raiškai, formuojasi daugiau MTV ir intensyvěja pūslelių pernaša į nutolusias ląsteles per MTV [87, 222]. Aktyvintas *cdc42* baltymas kartu su kitomis molekulėmis stimuliuoja aktino polimerizaciją [92] (greita erdvinė aktino turinčių ląstelės griaučių reorganizacija yra būtina sąlyga ląstelės išaugoms formotis). *Rho* GTFazės, kurioms priklauso ir *cdc42* baltymas, apskritai yra pagrindinis ląstelės griaučių pokyčių, susijusių su išaugų formavimusi, reguliatorius [11, 160], o jas gali aktyvinti įvairūs veiksniai. *Rho* GTFazės sąveikauja su tirozino

kinazėmis, susijusiomis su augimo faktoriaus receptoriais, su G baltymu susijusiais receptoriais bei tarpląstelinio užpildu ir yra susijusios su ląstelių proliferacija (reguliuoja G_1 fazę) bei migravimu [14]. *Rho* GTFazės yra hidrolazės, galinčios prisijungti ir hidrolizuoti guanozino trifosfatą (GTF). Jos yra tarsi tarpląstelinio signalizavimo molekuliniai jungikliai, svarbūs įvairioms ląstelių funkcijoms. *Rho* šeimos baltymai priklauso *Ras* šeimai ir yra svarbūs aktino organizacijai, membraninei pernašai ir įvairioms kitoms ląstelių funkcijoms [27]. Žinoma 20 *Rho* GTFazių, kurių dauguma kokiu nors būdu veikia ląstelės griaučius. Pripažįstama, kad *Rho* GTFazės yra svarbiausios lamelipodijų, filopodijų, invadopodijų ir su lamelipodijų bei filopodijų išaugomis susijusių MTV formavimuisi [151].

Tiriant bendras stresą patyrusių ir nepatyrusių ląstelių kultūrų sistemas, pastebėta, kad MTV pradeda formotis stresą patyrusioje ląstelėje ir ilgėdamas pasiekia sveiką ląstelę, o ne atvirkščiai [195]. Buvo pasiūlyta, kad ląstelės, iš kurių pradeda formotis MTV, kontroliuoja MTV formavimąsi mechanizmu, susijusiu su *p53*, *Akt-PI3K-mTor* signalizavimo keliu ir *M Sec* baltymu. Remiantis šiais duomenimis, daroma prielaida, kad geba suformuoti MTV yra apsauginė ląstelių reakcija į stresą, o per MTV iš vienos ląstelės į nutolusią ląstelę yra tiesiogiai pernešamos įvairios trumpai gyvuojančios organelės ir energiją teikiančios medžiagos [195, 198]. Atskleidus, kad MTV formuoja pažeista ląstelė sveikos ląstelės kryptimi, buvo pastebėta, kad organelės ir energiją teikiančios medžiagos, atvirkščiai, yra pernešamos iš sveikos ląstelės į pažeistąją [199]. Per MTV ląstelės gali perduoti įvairius signalus sveikoms nutolusioms ląstelėms, kai joms iškyla pavojus [195], arba gauti iš sveikų nutolusių ląstelių reikiamų medžiagų ar organelių (pvz., sveikų mitochondrijų) gyvybei išsaugoti [106, 182].

Pastebėta, kad net trumpalaikė *M Sec* baltymo raiška gali paskatinti į susidaryti į MTV panašias struktūras, nors funkcionalūs MTV susiformuoja tik esant stabiliai *M Sec* raiškai [134]. *M Sec* baltymas pirmiausia buvo aprašytas kaip *TNF α* sužadinamasis baltymas 2 (dar vadinamas *TNF α ip2* arba *B94*) [163, 206], kuris laikomas pagrindiniu veiksnio aktino remodeliavimosi, F aktino polimerizacijos ir membraninių išaugų (filopodijų), iš kurių nuosekliai susiformuoja MTV, atsiradimo procesuose [65, 88, 167]. Pastebėta, kad *M Sec* baltymo daugėja aplinkybėmis, kuriomis susiformuoja daugiau MTV (pvz., paveikus vandenilio peroksidu) [65]. Trumpam padaugėjus *M Sec* baltymo, formuojasi uždari, vadinamieji filopodiniai tilteliai [42, 171, 172]. Kitų autorių duomenimis, dalyvaujant *M Sec* baltymui, MTV ne tik sujungia pavienes ląsteles, bet ir turi įtakos funkcionalių MTV tinklų formavimuisi [180]. Vis dėlto, remiantis literatūros duomenimis, *M Sec* baltymas susijęs su formavimusi tik tų MTV, kurių sudėtyje yra tik F aktino ir komponentų pernaša vyksta viena kryptimi [65]. Jis neveikia mikro-

tubulių, todėl storieji MTV, kurių sudėtyje yra ir F aktino, ir mikrotubulių, gali formuotis nuo *M Sec* baltymo nepriklausomu būdu arba dalyvaujant ir *M Sec* baltymui, ir kitiems veiksniams, kurie vis dar nežinomi [134]. Nustatyta, kad *Fas* signalizavimas skatina kitokio tipo MTV formavimąsi (jais pernaša vyksta į abi puses ir yra perduodami su apoptoze susiję signalai) – šis procesas taip pat siejamas su *Rho* GTFazių veikla, bet nepriklauso nuo kaspazės aktyvinimo [11]. Kad susiformuotų MTV, sujungiantys NK ląsteles su ląstelėmis taikiniais, būtina NK ląstelę aktyvinančiojo receptoriaus sąveika su ligandu, esančiu ląstelės taikinio membranoje [30]. Kai MTV formuojasi tarp imuninių ląstelių, kad joms atsiskiriant susiformuotų MTV, ląstelės turi gan ilgą laiką būti susiglaudusios [30, 180].

Nustatyta, kad MTV formavimasis yra susijęs su ŽIV 1 imunosupresiniu *Nef* baltymu [6, 50, 132, 133, 210], kuris keičia imuninių ląstelių aktino organizaciją ir endocitinį aktyvumą. Vien ektopinio *Nef* baltymo raiška monocitų THP 1 ląstelėse skatina formuotis į MTV panašias išaugas, sujungiančias tarpusavyje THP 1 ląsteles arba THP 1 ląsteles su B ląstelėmis. *Nef* baltymas šiais MTV yra pernešamas į sisteminės ir žarnų B ląsteles. Kai į plazminę membraną įsilieja *Nef* baltymas, remodeliuojasi aktinas, o tai gali turėti įtakos formuojantis MTV, sujungiantiems ŽIV 1 užkrėstas THP 1 ląsteles su sveikomis ląstelėmis, ir padėti infekcijai plisti [210]. Gali būti, kad patys ŽIV 1 gali sužadinti *M Sec* raišką ir skatinti membraninių išaugų formavimąsi. Kad susiformuotų MTV, sujungiantys retrovirusų užkrėstas ląsteles su sveikomis ląstelėmis taikiniais, pirmiausia užkrėstosios ląstelės membrana turi susiliesti su sveikos ląstelės membrana. Tam įtakos turi virusų apvalkalo baltymo (angl. *envelope glycoprotein*, *Env*) ryšys su receptoriumi, esančiu ląstelėje taikinyje [100, 171].

MTV formavimąsi *in vitro* slopina medžiagos, kurios slopina F aktino polimerizaciją, ir medžiagos, mažinančios *M Sec* baltymo raišką, be to, kai kurių MTV formavimąsi mažina tubulino inhibitoriai [25, 45, 65, 80, 110, 135, 155]. *Clostridium difficile* toksinas ir specifinis *cdc42* inhibitorius sekraminas A slopina *Fas* sužadintų MTV formavimąsi [155], o *Fas* stimuliavimas skatina MTV formavimąsi [11]. MTV formavimąsi slopina imunodepresantai, slopinantys *mTOR* signalizavimo kelią (pvz., everolimuzas), ir metforminas [110].

1.5.1. Koneksinų įtaka MTV formavimuisi

Cx įtaka MTV formavimuisi iki šiol nebuvo tirta, tačiau žinoma, kad jie ne tik gali formuoti PJ ir specifiskai (priklausomai nuo Cx tipo) reguliuoti ląstelių sąveiką per juos, bet ir vykdo su PJ nesusijusias funkcijas (pvz., dalyvauja ląstelių adhezijos, migravimo, dalijimosi, diferenciacijos ir pikty-

binių navikų atsiradimo, progresavimo bei metastazavimo procesuose) [43, 85, 130, 220]. Literatūroje yra duomenų tik apie Cx26, Cx31.1, Cx32 ir Cx43 įtaką šiems procesams (apžvelgta [220]), o pateikiami duomenys gana prieštaringi (pvz.: nurodoma, kad Cx26, dalyvaudamas aktino remodeliavimo procesuose, slopina ląstelių migravimą [84, 119], Cx31.1, slopindamas G₁ fazę, mažina ląstelių proliferaciją ir nesmulkiųjų ląstelių plaučių piktybinio naviko ląstelių migravimą bei invaziją [216], Cx32 didina žmogaus hepatomos ląstelių proliferaciją, migravimą bei invaziją [102], bet, vartojamas kartu su citostatikais, mažina žmogaus plaučių adenokarcinomos [164] ar metastazavusio inkstų piktybinio naviko ląstelių [54] proliferaciją ir sukelia jų apoptozę. Cx43 didina ląstelių migravimą, sužadina ląstelės griaučių remodeliavimąsi ir mažina ląstelių proliferaciją (kartu padaugėja ir E kadherino) [71]). Manoma, kad Cx, sąveikaudami su priekibos baltymais (kadherinais, kateninais), kurie yra susiję su F aktinu [43, 85], reguliuoja ląstelių migravimą, membraninių išaugų formavimąsi ir tarpląstelinę sąveiką per MTV [43, 52, 112, 211]. Cx43 sankaupos išaugų galiukuose gali turėti įtakos MTV susiformavimui aktino polimerizacijos būdu [39, 73, 197], tokių išaugų stabilumui [48] ir biologinių molekulių per MTV pernašai [200]. Taigi, PJ turintys MTV audiniuose gali būti susiję su biologinių molekulių pernaša, o tai labai svarbi galima sąlyga kamieninių ląstelių diferenciacijai, piktybinių navikų progresavimui, invazijai bei metastazavimui.

1.5.2. Koneksinų reikšmė navikų patogenezėje

Žinios apie Cx įtaką piktybinių navikų patogenezėje taip pat labai prieštaringos. Pastebėta, kad ji priklauso nuo audinio rūšies, piktybinio naviko tipo ir stadijos [41, 130, 220]. Sutrikus Cx raiškai kurios nors rūšies ląstelėse, ląstelių proliferacijos, embriogenezės, regeneracijos, audinių homeostazės palaikymo ir kancerogenezės procesai tampa nekontroliuojami [40]. Cx raiškos sumažėjimas arba Cx persiskirstymas (sumažėjusi raiška ląstelės membranoje, bet padidėjusi raiška citoplazmoje) buvo nustatyti storosios žarnos [176], nesmulkiųjų plaučių ląstelių [209, 218], kiaušidžių [187], krūties [118, 119, 142], gimdos gleivinės [159] ir inkstų piktybinių navikų [203], sarkomos [203], antinksčių feochromocitomos [204], gliomos [5, 38, 174], gimdos kaklelio neoplazijų [2] atvejais. Kitais atvejais, priešingai, buvo pastebėtas Cx raiškos padidėjimas (pvz.: krūties [84], odos bei įvairių plokščiųjų ląstelių [70, 203], storosios žarnos [64] ir kasos piktybinių navikų atvejais [91]). Net tos pačios rūšies navikuose, priklausomai nuo stadijos ir ląstelių padėties navike, Cx raiška gali būti ir padidėjusi, ir sumažėjusi [1]. Todėl manoma, kad pirminiuose navikuose Cx raiška sumažėja, tačiau invazijos ir labiau nediferencijuotų navikų atvejais Cx vėl padaugėja [121].

Atrodo, kad sumažėjusi *Cx* raiška yra susijusi su piktybinio naviko ląstelių „pabėgimu“ iš pirminio naviko, tačiau jų raiškai vėl padidėjus, ląstelės įgyja gebą formuoti metastazes [174] – toks *Cx* raiškos padidėjimas siejamas su blogesne šių navikų prognoze [21, 70, 146].

1.6. Plyšinės jungtis turintys MTV

Ilgą laiką manyta, kad elektrinė ir metabolinė sąveika per PJ yra galima tik tarp susiglaudusių ląstelių. Atradus MTV ir juose pastebėjus *Cx43* raišką, paaiškėjo, kad tokia sąveika galima ir tarp nutolusių ląstelių [158]. Buvo iškelta hipotezė, kad PJ, tikėtina, yra ta vieta, kurioje, ląstelėms atsiskiriant, pradeda formotis MTV [4]. Vieni puskanaliai greičiausiai negarantuoja pakankamos sulipimo jėgos, todėl ryšį palaikyti gali padėti šiose srityse esantys kadherinai (apžvelgta [145]). Membranoje esantys kadherinai gali palengvinti ląstelių ataugos ir nutolusios ląstelės membranų susiliejimą bei PJ kanalo susiformavimą [4].

Nors tolstant ląstelėms ir atsiskiriant membranoms, dalis PJ suyra, kai kurie MTV galiuke esantys PJ kanalai gali išlikti ir kurį laiką funkcionuoti, užtikrindami *Cx* valdomą elektrinį ryšį tarp nutolusių ląstelių per MTV [195, 198, 200]. Formuojantis MTV šiuo būdu, *Cx* raiška turi būti didelė, kad atitinkančių puskanalių susijungimo tikimybė būtų didesnė [4].

Iki šiol MTV buvo aptiktas tik *Cx43*, tačiau spėjama, kad galėtų būti ir kitokių *Cx*, nes daugelyje audinių jų yra dviejų ar daugiau tipų [96]. Vis dar neaišku, ar MTV gali būti ir heterotipinių PJ. Tokių PJ buvimas rodytų labai dideles sąveikos tarp nutolusių skirtingų rūšių ląstelių galimybes. Tuo atveju, kai MTV, per kuriuos galima elektrinė sąveika, formuojasi iš į filopodiją panašių membraninių išaugų, augančios išaugos galiuke gali būti puskanalių, kurie membranoms susilietus, susijungia su atitinkamu ląstelės taikinio puskanaliu ir suformuoja funkcionalų PJ kanalą. Tokių kanalų susiformavimo tikimybė didėja, didėjant *Cx* raiškai ląstelėje [138].

Vis dėlto, nors PJ yra svarbios palaikant elektrinį ryšį per MTV, jos nėra būtinos MTV susiformuoti (pvz., *Cx* nebuvo per į filopodijas panašias membranines išaugas susiformavusiuose MTV tarp *PC12* ląstelių) [200].

1.7. MTV funkcijos

Įvairūs MTV skiriasi ne tik struktūriniais komponentais, matmenimis ar gyvavimo trukme, bet ir vykdomomis funkcijomis. Tarpląstelinė sąveika per MTV yra svarbus nutolusių ląstelių ryšių palaikymo ir gelbėjimosi mechanizmas, padedąs išlikti, keistis informacija ir palaikyti homeostazę nuolat kintančiomis patofiziologinėmis ir aplinkos sąlygoms. MTV sudaro

sąlygas plisti tarpląsteliniais signalams (įskaitant elektrinius) tarp nutolusių ląstelių, o tai būtina gyvų organizmų vystymuisi [28, 47, 197], imuniniam atsakui [11, 30, 42, 56, 135, 136, 181, 213], audinių homeostazės palaikymui ir regeneracijos procesams [4, 103], ląstelių diferenciacijai ir reprogramavimui [93, 184, 196].

Embriogenezė bei įvairūs kiti fiziologiniai (imuninės sistemos veikla, žaizdų gijimas, regeneracija) ir patologiniai procesai (lėtinės ligos, įskaitant piktybinius navikus, neurodegeneracines ligas, kardiovaskulines ligas, diabetą, uždegimą) yra susiję su ląstelių migravimu [19, 53]. Migruojančios ląstelės patiria didelį stresą, jose vyksta dinamiški ląstelės griaučių pokyčiai, audiniuose nuolat kinta ląstelių tarpusavio ryšiai ir sąveika su kitomis ląstelėmis ar tarpląstelinio užpildu, vyksta įvairūs kiti molekuliniai pokyčiai, susiję su įvairiais signalizavimo keliais ir dideliu energijos poreikiu [77]. MTV ne tik padeda ląstelėms judėti bei migruoti – per juos palaikomas tiesioginis nutolusių ląstelių aprūpinimas reikiamomis medžiagomis.

Elektrinė sąveika per PJ turinčius MTV gali būti susijusi su ląstelių (pvz., nervinės skiauterės ląstelės) migravimo sinchronizavimu ir koordinavimu embriogenezės laikotarpiu. Žinoma, kad sąveika per PJ yra pagrindinis signalizavimo mechanizmas ankstyvuoju galvos smegenų raidos laikotarpiu, kai kamieninės nervinės ląstelės per sinapses nesužadamos, nes trūksta ligando valdomų kanalų [154]. Priklausomai nuo diferenciacijos eigos, įvairiose galvos smegenų srityse esančios kamieninės ląstelės gali migruoti ir pasiekti atitinkamas žievės sritis [147]. Nuo MTV priklausomas Ca^{2+} signalų sužadinimas nesubrendusiuose neuronuose siejamas su kryptingu šių neuronų migravimu [150]. Į MTV panašiomis išaugomis plintantys depoliarizacijos signalai sinchronizuoja aktino remodeliavimą, kuris svarbus ląstelių migravimui. Be to, kartu gali veikti keli skirtingi sąveikos per MTV būdai (pvz., tais pačiais MTV plisti ir depoliarizacijos signalai, ir būti pernešamos pūslelės) [198]).

Nervinio audinio diferenciacija yra susijusi su Cx raiškos kitimu ir elektrinio ryšio specifiškumu, kuris įvairiose galvos smegenų srityse išlieka ir gimus bei susiformavus neuronų grandinėms suaugusio žmogaus galvos smegenyse [154]. PJ yra itin svarbios vystantis naujajai žievei [47, 48], iš Cx43 ir Cx26 susidariusios PJ – glijos formavimuisi [48]. MTV, sujungdami neuronus ar neuronus su glijos ląstelėmis, gali didinti neuronų aktyvumą. Atsižvelgiant į tai, kad nervinės skiauterės ląstelės *in vivo* yra susijungusios plonomis ląstelinėmis išaugomis [186], o eksperimentuose *in vitro* buvo užregistruotas su MTV susijęs elektrinis ryšys [88], elektrinių signalų plitimas per PJ turinčius MTV gali būti svarbiausias veiksnys, sinchronizuojantis šių ląstelių migravimą [198]. Migravimo krypčių pasikeitimas yra veikiamas Cx43 [47], todėl galima įtarti, kad glijos pokyčiai gali būti susiję

su MTV ir elektrine sąveika per juose esančias PJ. Visa tai sudaro sąlygas greitam ir selektyviam informacijos, kuri koordinuoja ląstelių migravimą, perdavimui ir tinkamos embriono simetrijos susiformavimui.

Gyjant žaizdoms, dalyvauja daug F aktino turinčios ląstelių membraninės išaugos, kurios sujungia tarpusavyje žaizdos pakraštyje esančias nutolusias ląsteles [115, 208]. Šis procesas yra siejamas su IF₃ kinazės aktyvinimu [101] bei žaizdos priekinio krašto ląstelių membranų depoliarizacija [32, 208, 219]. Membraninėmis išaugomis plintant depoliarizacijos signalams, MTV gali sinchronizuoti F aktino remodeliavimą ir moduluoti žaizdos gijimą [198].

MTV yra svarbūs tarpląstelinei sąveikai uždegimo atveju – uždegimo apimtuose audiniuose šių membraninių struktūrų labai padaugėja [33].

MTV, sujungiančių naviko ląsteles su aplinkinių audinių ląstelėmis, susiformavimas skatina kancerogenezę, jie siejami su navikų invazija ir progresavimu bei atsparumo chemoterapijai mechanizmais (apžvelgta [108, 177]). Piktybinių navikų ląsteles su jį gaubiančių audinių ląstelėmis sujungiantys MTV gali palengvinti naviko plitimą, invaziją ir metastazavimą [44, 108–110]. Neurodegeneracinių ligų atsiradimas ir progresavimas yra siejami su patogeninių baltymų ir prionų bei virusų pernaša į nutolusias ląsteles per MTV [4, 37, 50, 61, 82, 116, 195, 222]. Spėjama, kad piktybinių navikų ir neurodegeneracinių ligų atsiradimo mechanizmai gali būti tie patys [128]. Transkripcijos faktorius *p53* yra svarbus veiksnys apoptozės ir neurodegeneracijos procesuose. *p53* reaguoja į įvairius streso dirgiklius, transkribuoja eilę genų ir gali būti, kad dėl *p53* suaktyvėjimo ląstelės patiria apoptozę, nes lokaliai membraninėse struktūrose kaupia kenksmingas medžiagas ir neleidžia joms plačiai pasklisti audiniuose. Kartu, suaktyvėjus *p53*, skatinamas MTV formavimasis, o per juos ląstelės gali perduoti naudingas ar perdirbamas medžiagas į nutolusias sveikas ląsteles [195]. Nors *p53* vykdo daug reguliavimo funkcijų, dauguma jų neleidžia atsirasti duplikacijos klaidoms ląstelėms patiriant stresą. Šiuo požiūriu su *p53* susiję mechanizmai neleidžia formuotis navikams (t. y. su *p53* susijęs mechanizmas didina ląstelių dalijimosi tikslumą ir trukdo formuotis navikui) [152]. Kadangi MTV formavimasis priklauso nuo *p53* [195], jų susiformavimas gali būti ląstelių savybė įveikti stresinę situaciją ir sumažinti naviko ar neurodegeneracinės pažaidos atsiradimo tikimybę.

MTV siejami su virusų ir prionų sukeltų ligų patogenezė bei metaboliniais ar genetiniais mainais įvairių rūšių bakterijose, ligų sukėlėjų (prionų, virusų, bakterijų, patologinių baltymų) pernaša. Tyrimais buvo patvirtinta, kad su MTV yra susiję kai kurių infekcinių ligų sukėlėjų vystymosi procesai (pvz.: *Plasmodium falciparum* [156], *Bacillus subtilis* [46, 165], *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* [165] ir kt.). Virusinės ligos progresuoja

virusams plintant ląstelėse. Yra publikuota daug duomenų apie pačių virusų pernašą MTV [6, 50, 132, 133, 181, 210] (pvz.: per MTV plisdami ŽIV 1 palaipsniui užkrečia žmogaus imuninės sistemos ląsteles, todėl nepaliekiamai mažėja $CD4^+$ T ląstelių ir pasireiškia sunkus imunodeficitas – įgyto imunodeficito sindromas). Citotoksinės ar užkrečiamosios dalelės (pvz., ŽIV 1 ir ŽTLV 1 virusai, prionai, patologiniai baltymai ir kt.) gali naudoti MTV infekcinės ar neurodegeneracinės bei navikams plisti [4, 37, 61, 68, 116, 135, 136, 181, 195, 222]. Įdomu tai, kad beta amiloidas pernešamas per MTV 2–8 kartais greičiau nei organelės (endoplazminio tinklo, Goldžio aparato komponentai, endosomos ar mitochondrijos) [195]. Susiformavus uždaro tipo MTV, ligų sukėlėjai (pvz., ŽIV 1, leukemiją sukeliantys ŽTLV 1 tarp žmogaus T ląstelių) membrana plinta į nutolusias ląsteles, o šiai pernašai naudojama energija. Virusų pernaša MTV membrana nesusijusi su mikrotubulėmis, bet greičiausiai priklauso nuo sąveikos su receptoriais [135]. Buvo iškelta hipotezė, kad neurodegeneracines ligas sukeliantys prionai (ir egzogeninės, ir endogeninės kilmės), plisdami per MTV, pirmiausia išplinta kaulų čiulpuose, o vėliau patenka į galvos smegenų neuronus [61, 62]. Sukėlėjai (pvz., ŽIV 1) gali pasinaudoti tarp ląstelių jau susidariusiais MTV, bet, veikiant *Nef*, gali ir patys skatinti šių vamzdelių formavimąsi [210].

Vis dėlto dar stokojama duomenų, kad būtų galima tiksliai apibūdinti specifines skirtingais būdais susiformavusių skirtingos struktūros MTV funkcijas kurios nors rūšies ląstelių kultūroje ar juo labiau audiniuose, organuose ar visame organizme.

1.7.1. Ląstelės turinio pernaša

MTV nuo kitų aktino turinčių membraninių išaugų skiriasi tuo, kad sujungia nutolusių ląstelių citozolius ir jais į nutolusias ląsteles gali būti tiesiogiai pernešami įvairūs ląstelės komponentai (apžvelgta [57, 116, 177]). Vien F aktino turinčiais MTV įvairūs komponentai yra pernešami viena kryptimi, o mikrotubules turinčiais vamzdeliais pernaša vyksta į abi puses [135]. Priklausomai nuo MTV esančių ląstelės griaučių komponentų, pernašos mechanizmas gali būti susijęs su skirtingomis motorinių baltymų molekulėmis. Visgi dar neaišku, ar pernašos mechanizmai, susiję su F aktinu ar mikrotubulėmis, gali vienu metu funkcionuoti tame pačiame MTV.

Mažos endocitinės pūslelės vien F aktino turinčiais MTV yra pernešamos spindžiu viena kryptimi su F aktinu susijusių motorinio miozino molekulių (pvz., miozino V) valdomu greičiu [63, 158]. Organelių pernaša per MTV viena kryptimi yra epizodinė, t. y. registruojami vienkartiniai arba keli pernašos epizodai po tam tikro MTV neaktyvumo laikotarpio [158]. Be to,

pastebėta, kad organelės pernešamos ne visais susiformavusiais MTV, todėl buvo iškelta hipotezė, kad MTV turi tarsi subręsti, o organelės pernešamos tik pakankamą brandą pasiekusiais MTV. Kartais MTV gyvuoja pernelyg trumpai, kad galėtų tinkamai subręsti ir tokia pernaša apskritai vyktų [63].

Naudojant specifinius miozino slopiklius, buvo atskleista, kad MTV formavimasis ir organelių pernaša priklauso nuo aktomiozino funkcijos [25, 63]. Šie tyrimai rodo, kad endosominių pūslelių pernaša per MTV (bent jau kai kuriais jų tarp kai kurių rūšių ląstelių) yra aktyvus procesas [135], o ATF sumažėjus, labai sumažėja endosominių pūslelių pernaša tarp nutolusių ląstelių [63]. Buvo stebėta kryptinga ŽIV 1 virusų dalelių ir lizosominių pūslelių pernaša MTV, susiformavusiais tarp T ląstelių ir CAD ląstelių, su F aktinu susijusių motorinio miozino molekulių valdomai pernašai būdingu greičiu, bet vis dar galutinai neišaiškintas tikslus tokios pernašos mechanizmas (endocitinėse pūslelėse, MTV spindžiu ar membranos paviršiumi) [61, 62, 181].

Per MTV, kuriuose yra ne tik F aktino, bet ir mikrotubulių (pvz., tarp imuninių ląstelių [11, 30, 135], pirminių neuronų ir astrocitų [197], *HUVEC* ląstelių vykstant angiogenezei [124]), komponentai gali būti pernešami į abi puses su mikrotubulėmis susijusiu būdu veikiant kinezino ir dineino mechanizmui [135]. Tokiai pernašai taip pat naudojama energija.

Pernešant komponentus per MTV viena kryptimi ar į abi puses, naudojama energija. Nustatyta, kad energiją teikiančios medžiagos (gliukozė, cAMP, IF_3 , ATF) ar Na^+ , K^+ ir Ca^{2+} jonai į nutolusias ląsteles patenka per MTV difuzijos būdu [4, 178, 202]. Ca^{2+} jonai gali ne tik judėti difuzijos būdu MTV spindžiu [202], bet jų koncentraciją ląstelėje gali didinti ir antrinio signalo tarpininko IF_3 , kurio pasyvi difuzija per MTV yra daug greitesnė už Ca^{2+} jonų, skatinamas Ca^{2+} jonų atsipalaidavimas iš endoplazminio tinklo [10]. Tokia galimybė buvo nurodyta, pastebėjus, kad Ca^{2+} jonų koncentracijos per MTV sujungtose ląstelėse yra susijusios su IF_3 pernaša [178]. Be to, mechanškai stimuliuojant vieną ląstelę, depoliarizacijos signalas plinta per MTV į nutolusią ląstelę, kurios membranoje pasiekus slenkstinę depoliarizaciją, atsiveria įtampos valdomi Ca^{2+} kanalai – tai taip pat gali moduluoti Ca^{2+} jonų koncentraciją ląstelėje [200].

Literatūroje rasta duomenų apie mitochondrijų judėjimą MTV, susiformavusiais tarp kamieninių endotelio ląstelių ir kardiomiocitų [93], astrocitų [195], pirminių žmogaus inkstų epitelio ląstelių [45], kaulų čiulpų kamieninių ląstelių ir kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelių [190], žmogaus tinklainės pigmentinio epitelio ląstelių [205], žmogaus piktybinės pleuros mezoteliomos ląstelių [110], bet jie gana prieštaringi. Yra pasiūlyta keletas galimų mitochondrijų pernašos per MTV mechanizmų, parodant, kad kryptingas mitochondrijų judėjimas MTV spindžiu nėra susijęs su endocitoze ar pūsle-

lių pernaša [182], bet priklauso nuo MTV esančių F aktino ir mikrotubulių [199], o šią pernašą moduliuoja iš *Cx43* susiformavusios PJ [72, 139] ir *Rho* GTFazės [8, 185]. Tyrimai rodo, kad mikrotubules turintys MTV pradeda formotis stresą patyrusiose ląstelėse, praradusiose citochromą C, neperėjusiose į kitą apoptozės fazę, kuriai būdingas kaspazės 3 aktyvinimas, o mitochondrijos šiuose MTV išsidėsto šalia mikrotubulių ir yra pernešamos pagal mikrotubulių eigą iš sveikų į stresą patyrusias ląsteles [199] ir gali padėti pažeistoms ląstelėms atstatyti aerobinį kvėpavimą bei išgyventi [106, 182]. Kai kurie tyrėjai nurodo, kad mitochondrijos pernešamos MTV tik viena kryptimi [56], bet vienais atvejais – iš sveikų į pažeistas ląsteles [199], o kitais, priešingai, – iš pažeistų į sveikas ląsteles [7, 195]. MTV, turinčių mikrotubules, susiformavimas bei susijusi sveikų mitochondrijų pernaša ankstyvojoje apoptozės stadijoje gali apsaugoti stresą patiriančias ląsteles [199] ir atkurti aerobinį ląstelių kvėpavimą [106, 182]. Be to, pastebėta, kad tarp skirtingų tipų ląstelių susiformavusiais MTV mitochondrijos pernešamos iš kamieninių ląstelių į pažeistas ląsteles [75] – tai taip pat gali padėti pažeistoms ląstelėms išgyventi. Tačiau pažeistos mitochondrijos ir jų mutavusi mtRNR iš pažeistų ląstelių yra pernešamos į sveikas ląsteles ir taip galbūt skatina patologijos (pvz., neurodegeneracinių pažeidimų, glioblastomų ar kitokių navikų) išlikimą ir plitimą [7, 195]. Be to, pastebėta, kad mitochondrijų pernaša per MTV iš stromos ląstelių į vėžio ląsteles sužadino šių ląstelių fenotipo pokyčius [139].

Literatūroje yra pateiktos kelios hipotezės, kuriomis bandoma paaiškinti organelių pernašos per MTV ir patekimo į nutolusią ląstelę taikinį mechanizmus. Pagal vieną iš jų, organelių pernašą palengvina trumpalaikis MTV galiuko membranos susiliejimas su per MTV sujungtos nutolusios ląstelės membrana [26, 198]. Tokiu būdu organelės gali būti pernešamos ir uždarysiais MTV, per kuriuos nutolusios sujungtos ląstelės elektrinio ryšio negali palaikyti. Manoma, kad šiuo atveju MTV membranoje esantys puskanaliai gali moduluoti membranų susiliejamą, o susiformavus PJ kanalams – įvairių komponentų pernašą [198]. Pagal kitą hipotezę, organelės į nutolusias ląsteles yra pernešamos MTV galiuke susiformavus membranos apgaubtiems pūslelių dariniams, kurie pirmiausia patenka į tarp dviejų membranų esantį plyšį (tarp MTV galiuko membranos ir sujungtos nutolusios ląstelės membranos), o tada endocitozės būdu patenka į ląstelę taikinį [198]. Pagal trečią hipotezę, organelės patenka į ląstelę taikinį šiai fagocitavus kitos ląstelės MTV galiuko dalį su joje esančia pūslele arba kelių pūslelių dariniu [175]. Tokiu būdu gali susiformuoti net trigubą membraną su PJ turinčios pūslelės [141]. Visais atvejais MTV perneštos organelės patenka į nutolusios ląstelės taikinio citozolį [198].

1.7.2. Nutolusių ląstelių elektrinis ryšys per MTV

Nustatyta, kad srovės dydis priimančiojoje ląstelėje yra atvirkščiai proporcingas MTV ilgiui ir tiesiogiai priklauso nuo ląstelių sujungiančių MTV skaičiaus [200]. Teigiama, kad efektyvus atstumas, per kurį galima sukelti poveikį nutolusioms ląstelėms per MTV, negali būti daug kartų ilgesnis už ląstelės skersmenį [200]. Be to, buvo iškelta hipotezė, kad elektrinis ryšys per MTV yra daug selektyvesnis nei tarp susiglaudusių ląstelių, nes yra registruojamos mažesnės amplitudės, todėl signalas pasiekia tik priimančiąją per MTV sujungtą ląstelę taikini, bet greičiausiai negali išplisti į kitas greta ar toliau esančias ląsteles [198, 200]. Kadangi signalo amplitudės mažėjimas ilgėjant MTV priklauso nuo MTV skersmens, storesniųjų MTV efektyvus ilgis signalo plitimui gali būti didesnis. Laidumas tarp dviejų nutolusių ląstelių, kurias sujungia du MTV, yra didesnis, palyginti su laidumu tarp vienu panašaus ilgio MTV sujungtų ląstelių [200]. Tai rodo, kad elektrinis signalas gali lygiagrečiai plisti per keletą MTV.

Vis dėlto nutolusių ląstelių elektrinis ryšys per MTV priklauso ne tiek nuo pačio vamzdelio matmenų ir tarp ląstelių susiformavusių MTV skaičiaus, bet labiau nuo MTV esančių PJ skaičiaus bei jų funkcionalumo [198, 200]. Be to, pastebėta, kad elektrinis ryšys tarp nutolusių ląstelių per MTV yra palaikomas tik tam tikrą ribotą laikotarpį. Šiuo laikotarpiu stebima ir didelė *Cx43* raiška [197]. Dauguma atsiskyrimo būdu tarp įvairių rūšių ląstelių susiformavusių MTV gali būti perduodami depolarizacijos signalai [68, 116, 195, 198, 200]. Manoma, kad, kontaktavusių ląstelių atsiskyrimo būdu besiformuojantis MTV, per kuriuos yra palaikomas elektrinis ryšys, susiformuoja būtent PJ buvimo vietose. Atitolstant ląstelėms, PJ struktūros palaipsniui yra ir lieka tik su MTV susijusi jos dalis. MTV atveju gali susidaryti daug mažiau PJ nei tarp susiglaudusių ląstelių, kurių PJ plokštelės gali turėti nuo kelių dešimčių iki kelių šimtų tūkstančių kanalų [179].

2012–2013 metais, kai buvo pradėti rinkti duomenys disertacijai, literatūroje buvo aprašyti tik *Cx43* turintys MTV, per kuriuos elektrinį ryšį palaikė įvairių rūšių ląstelės [200], tačiau spėjama, kad MTV galėtų būti ir kitokių *Cx*, nes daugumoje audinių ar ląstelių paprastai būna dviejų ar daugiau rūšių *Cx* [96]. Vis dar neišsiaiškinta, ar MTV gali būti ir heterotipinių PJ.

1.7.3. Genetinės medžiagos pernaša per PJ turinčius MTV

Prieš pradedant rinkti ir paskelbiant mūsų tyrimų duomenis, literatūroje nebuvo nei informacijos, nei iškeltų hipotezių apie galimą genetinės medžiagos pernašą per MTV. Nors Virginijus Valiūnas su bendradarbiais jau buvo paskelbė, kad mažosios RNR gali pereiti iš *Cx43* susidariusiais PJ kanalais

tarp susiglaudusių ląstelių [188], o reguliuojančiųjų RNR (*si/miRNA*) pernašai yra būtinos funkcionalios PJ [67, 86, 90, 98, 104], iki šiol vis dar plačiai diskutuojama dėl *si/miRNA* pernašos per PJ galimybių, nes eksperimentų sąlygomis sudėtinga įrodyti, jog mažosios RNR pereina būtent PJ kanalais, o ne pinocitozės būdu [20].

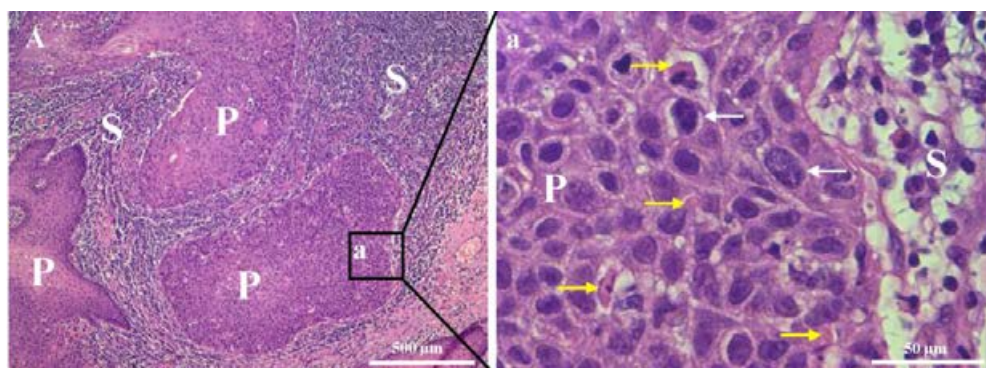
1.8. Į MTV panašios struktūros *in vivo*

MTV gali būti susiję su įvairiais organizme vykstančiais fiziologiniais ir patologiniais procesais. Pirmuosius duomenis apie MTV žinduolių audiniuose *ex vivo* paskelbė Holly R. Chinnery su bendradarbiais, atlikę tyrimus su pelės ragenos ir pastebėję ragenos stromoje membranines į nanovamzdelius panašias struktūras tarp kaulų čiulpų MHC klasės II⁺ ląstelių [33]. Pirmuosius duomenis apie MTV žmogaus audiniuose paskelbė Emil Lou su bendradarbiais, tyrę žmogaus piktybinės pleuros mezoteliomos ir adenokarcinomos mėginius [110]. Netrukus buvo paskelbta, kad į MTV panašios struktūros susiformuoja tarp migruojančių ląstelių kiaušidžių piktybinio naviko metastazinių mazgelių eksplantų kultūroje [139]. Tačiau iki mūsų tyrimo ir prieš paskelbiant mūsų tyrimo duomenis, nebuvo publikuotų duomenų apie MTV ar į juos panašias struktūras kitų rūšių piktybiniuose navikuose *in vivo* ar *ex vivo*, įskaitant gerklų plokščiųjų ląstelių piktybinius navikus.

2. TYRIMŲ METODAI

2.1. Ląstelių kultūros ir jų paruošimas

Pagrindiniai tyrimai buvo atlikti su *LSCC* ląstelėmis, kurių pirminė kultūra buvo sukurta mūsų laboratorijoje iš histologiškai apibūdinto gerklų plokščiųjų ląstelių piktybinio naviko (2.1.1 pav.) audinio (pirminės *LSCC* ląstelių linijos sukūrimo metodika išsamiai aprašyta mūsų publikacijoje [223]). Buvo tiriamos 5–15 persėjimų *LSCC* ląstelės.



2.1.1 pav. *LSCC* audinio apibūdinimas

(A) Vidutiniškai diferencijuota žmogaus gerklų plokščiųjų ląstelių karcinoma. (a) *LSCC* naviko parenchimą (P) sudaro atipinės epitelio ląstelės su daugybiniais hiperchrominiais gigantiškaisiais branduoliais ir atipinėmis mitozėmis (į jas nukreiptos baltos rodyklės) bei keratinizuojančiosios ląstelės (į jas nukreiptos geltonos rodyklės). Supančią stromą (S) sudaro limfocitais infiltruotas jungiamasis audinys (dažyta hematokslinu ir eozinu).

Cx įtakos MTV formavimuisi ir ląstelių judrumui tyrimai buvo atlikti su modelinėmis *HeLa* ląstelėmis be koneksinų (žmogaus gimdos kaklelio piktybinio naviko) ląstelėmis (*ATCC CCL-2*, Manassas, JAV) ir *HeLa* ląstelėmis, į kurias transfekcijos būdu buvo stabiliai įterpti tiriamieji *Cx*, sujungti su fluorescenciniais baltymais (*Cx36 EGFP*, *Cx43 EGFP* ir *Cx40 CFP*) arba be fluorescencinio žymens (*Cx45* ir *Cx47*) (visi šie *Cx* yra CNS, *Cx36* dar yra kasos beta ląstelėse, *Cx45* – širdies laidžiojoje sistemoje, o *Cx43* apskritai yra labiausiai organizme paplitęs *Cx*, kuris aptinkamas beveik visuose audiniuose). Stabilios tirtuosius *Cx* ekspresuojančių *HeLa* ląstelių linijos buvo gautos bendradarbiaujant su prof. F. Bukausko laboratorija (*Albert Einstein College of Medicine*, New York, JAV) (išsamiai aprašyta mūsų publikacijoje [224]).

MTV formavimosi tarp skirtingų tipų ląstelių tyrimams buvo naudotos žmogaus mezenchimos kamieninės ląstelės (angl. *human mesenchymal stem cells, hMSC*) (Lonza, Walkersville, JAV).

Ląstelės buvo sėjamos ant dengiamųjų stiklelių 2–3 kartus per savaitę ir kultivuojamos *DMEM* augimo terpėje su 10 proc. veršiuko serumo bei 1 proc. sudėtinio antibiotikų (100 V/ml penicilino ir 100 µg/ml streptomicino) tirpalo (*Gibco Laboratories*) drėgnoje 5 proc. CO₂ aplinkoje 37 °C temperatūroje. *HeLa* ląstelių, ekspresuojančių *Cx36 EGFP* ir *Cx43 EGFP*, atrankai buvo naudotas 500 µg/ml G418 genetinio tirpalas, o *Cx40 CFP*, *Cx45* ir *Cx47* atrankai – 1 µg/ml puomicino (*Invitrogen*, JAV) tirpalas. Jeigu šiame skyrelyje ir toliau nenurodyta kitaip, naudotos *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Vokietija) medžiagos.

2.2. Tarpląstelinio elektrinio ryšio matavimai

Elektrinio ryšio per MTV tarp *LSCC* arba *HeLa* be *Cx* ir įvairius transfekcijos būdu stabiliai įterptus *Cx* ekspresuojančių *HeLa* ląstelių savybės buvo tirtos dvigubo *patch-clamp* metodu (angl. *dual whole cell patch-clamp* – pastovios įtampos dvigubo visos ląstelės jonų srovių matavimo metodas). Dengiamasis stiklelis su paruošta tiriamųjų ląstelių kultūra buvo perkeliamas į nenutrūkstamo pratekėjimo eksperimentinę kamerą, įmontuotą ant motorizuoto invertuoto *Olympus IX81* mikroskopo (*Olympus Life Science Europa GmbH*, Hamburg, Vokietija), sujungto su *patch-clamp* stiprintuvu *Axopatch 200B*, konverteriu *MultiClamp 700B* ir *Digidata 1440A* skaitmeninio duomenų registravimo programine įranga (*Molecular Devices, Inc.*, JAV) stalelio ir pasirenkama per MTV sujungtų tiriamųjų ląstelių pora, neturinti kontakto su kitomis ląstelėmis. Eksperimentų metu ląstelės buvo nepertraukiamai perfuzuojamos kambario temperatūros modifikuotu *Krebs Ringer* tirpalu (išorinio tirpalo sudėtis: 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM gliukozės, 2 mM piruvato ir 5 mM *HEPES*; išorinis tirpalas buvo titruojamas su *NaOH* iki *pH* = 7,4). Eksperimentams naudoti borosilikato elektrodai su reikiamos formos galiukais, pagaminti naudojant P-97 mikroelektrodų (ME) gaminimo įrangą (*Sutter Instrument Co.*, JAV). ME vamzdeliai buvo užpildyti vidiniu tirpalu (vidinio tirpalo sudėtis: 130 mM KCl, 10 mM natrio aspartato, 3 mM MgATF, 1 mM MgCl₂, 0,2 mM CaCl₂, 2 mM *EGTA*, 5 mM *HEPES*; vidinis tirpalas buvo titruojamas *KOH* iki *pH* = 7,2–7,3). Siekiant sumažinti varžos įtaką laidumui per PJ (*g_j*), buvo naudojami ne didesnės kaip 3 MΩ varžos ME.

Pasirinkus susiglaudusių ar per MTV susijungusių tiriamųjų ląstelių porą, mikromanipulatoriaus pagalba abu ME buvo priartinami prie atitinkamų ląstelių, ir suformuojamas geras kontaktas tarp ME galiuko ir ląstelių mem-

branos. Tada kontakto vietoje trumpalaikio elektrinio impulso pagalba atve-riamos ląstelių membranos ir iš pradžių į abi ląsteles paduodama vienoda įtampa ($V_1 = V_2$). Po to į vieną iš ląstelių paduodamas įtampos impulsas (ΔV_1) ir suformuojama jungties įtampa (V_j tarp susiglaudusių ląstelių arba V_T tarp per MTV sujungtų ląstelių) (V_j arba $V_T = V_1 - V_2 = \Delta V_1$), o antrojoje ląstelėje, matuojama tarpląstelinė srovė (atitinkamai I_j arba $I_T = \Delta I_2$). Laidu-mas per PJ arba MTV (atitinkamai g_j arba g_T) buvo apskaičiuojamas pagal formulę atitinkamai $g_j = -I_j/V_j$ arba $g_T = -I_T/V_T$ (minuso ženklas rodo, kad tarpląstelinė srovė, registruojama antrojoje ląstelėje, yra priešingos krypties nei pirmojoje ląstelėje). g_T priklausomybei nuo V_T matuoti į pirmąją ląstelę buvo paduodama 30 s trukmės pjūklo pavidalo V_T (nuo 0 iki -120 mV), o antrojoje ląstelėje registruojamas atitinkamai I_j arba I_T atsakas. Susiforma-vus atviram MTV, jo g_T nepriklauso nuo V_T , o tais atvejais, kai nutolusias ląsteles jungia PJ turintis MTV, stebima esamam Cx būdinga g_T priklausomo-ybė nuo V_T .

Duomenys buvo analizuojami, naudojant *pClamp 10* programinę įrangą (*Molecular Devices, Inc.*, JAV).

2.3. Fluorescencijos vaizdinimo metodas

Fluorescencijos vaizdinimas (Cx vizualizavimas ir komponentų pernašos tyrimai) buvo derinamas su elektrofiziologiniais tyrimais. Fluorescencijos signalai buvo registruojami, naudojant motorizuotą *Olympus IX81* mikro-skopą (*Olympus Life Science Europa Gmbh*, Hamburg, Vokietija), sujungtą su šaldomu skaitmeniniu fotoaparatu *Orca R²* (*Hamamatsu Photonics K.K.*, Japonija), fluorescencijos sužadinimo sistema *MT10* (*Olympus Life Science Europa Gmbh*, Hamburg, Vokietija), pseudokonfokaline sistema *OptiGrid* (prireikus) ir programine įranga *XCELLENCE* (*Olympus Soft Imaging Solutions Gmbh*, München, Vokietija).

2.4. Ilgalaikio vaizdinimo metodas

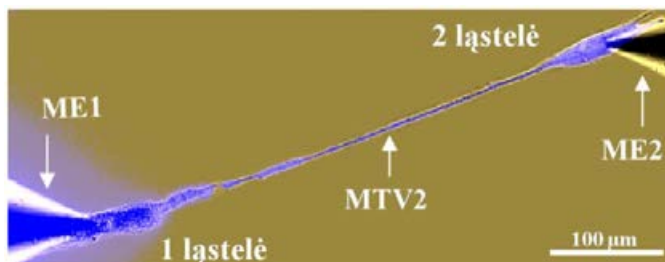
LSCC ir *HeLa* ląstelių judrumas ir MTV tarp šių ląstelių formavimasis buvo tirti ilgalaikio registravimo (angl. *time-lapse*) metodu drėgnoje 5 proc. CO_2 aplinkoje $37^\circ C$ temperatūroje, naudojant *INUBG2E-ONICS* inkuba-vimo įrangą (*Tokai Hit*, Shizuoka-ken, Japonija), įmontuotą ant motorizuoto invertuoto *Olympus IX81* mikroskopo (*Olympus Life Science Europa Gmbh*, Hamburg, Vokietija) stalelio; skaitmeninę kamera *Orca R²* (*Hamamatsu Photonics K.K.*, Japonija); fluorescencijos sužadinimo sistemą *MT10* (*Olympus Life Science Europa Gmbh*, Hamburg, Vokietija); įvairaus didinimo objektyvus (*UPLFLN 4x/0,13*, *UPLFLN 10x/0,3*, *UPlanSapo*

20x/0,85 arba *PlanApo N 60x/1,42 OD*); diferencinės interferencijos kontrasto priedą bei programinę įrangą *XCELLENCE (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Vokietija)*.

2.5. Kombinuotasis elektrofiziologijos, fluorescencinės mikroskopijos ir ilgalaikio vaizdinimo metodas

Tiriant įvairios molekulinės masės ir krūvio dažų (*Alexa Fluor [AF 350: 326, -1; AF 488/3000 dextrane: 3000, -1; AF 488 hydrazide: 488, -1], Lucifer Yellow [LY: 443, -2], DAPI [279, +2]*) sklidimo per MTV savybes, buvo derinami pirmiau aprašyti elektrofiziologijos, fluorescencinės mikroskopijos ir ilgalaikio vaizdinimo metodai.

Tiriamuoju dažų užpildytu ME vamzdeliu atvėrus vieną ląstelę (pirmoji ląstelė), fluorescencinė medžiaga iš ME1 difuzijos būdu patekdavo į šią ląstelę, sklido per MTV ir galėjo kauptis nutolusioje antrojoje ląstelėje (2.5.1 pav.). Kad būtų išvengta dažų nutekėjimo per ME2, antroji ląstelė buvo atveriamą baigiant eksperimentą ir tada išmatuojamas MTV elektrinis laidumas (g_T).



2.5.1 pav. Dažų sklidimas MTV tarp LSCC ląstelių

Dažo medžiaga per ME1 vamzdelį patenka į 1-ąją ląstelę, ją užpildo ir pirmiausia difuzijos būdu užpildo MTV2, po to patenka į 2-ąją ląstelę.

MTV pralaidumas dažui buvo apskaičiuojamas, įvertinus dažo fluorescencijos kitimą antrojoje ląstelėje pagal formulę:

$$P_T = (vol_2 \cdot \Delta FI_2 / \Delta t) / (FI_1 - FI_2)$$

Čia $\Delta FI_2 = FI_{2,n+1} - FI_{2,n}$ fluorescencijos pokytis antrojoje ląstelėje per laiko intervalą $\Delta t = (t_{n+1} - t_n)$, o vol_2 yra antrosios ląstelės tūris, apskaičiuotas kaip rutulio nuopjovos tūris pagal formulę:

$$vol_2 = (1/6) \cdot \pi \cdot h \cdot (3a^2 + h^2)$$

Čia pagrindo skersmuo a yra ilgiausiojo ir trumpiausiojo ląstelės skersmenų vidurkis, o h – ląstelės aukštis. Tokiu būdu apskaičiuotasis *HeLa* ląstelių vidutinis tūris buvo $1\,800\,\mu\text{m}^3$, o *LSCC* ląstelių – $68\,000\,\mu\text{m}^3$.

Fluorescencijos tyrimams buvo naudoti *Invitrogen* (*Eugene*, JAV) dažai ir reagentai, paruošti pagal gamintojo rekomendacijas. Siekiant kiek galima sumažinti fluorescencijos blyškumą, tyrimai buvo atlikti ilgalaikio ląstelių vaizdinimo metodu, ląsteles kas 1 min. apšviečiant mažo intensyvumo ir trumpos ekspozicijos ($\sim 0,5$ s) šviesa.

2.6. *SiRNA* pernašos tyrimai

SiRNA sklidimas per MTV buvo tirtas pirmiau aprašytu kombinuotuoju elektrofiziologijos, fluorescencinės mikroskopijos ir ilgalaikio registravimo metodu, tik šių tyrimų metu ME1 vamzdelis buvo užpildytas pagal gamintojo nurodymus paruošta *siRNA*, sujungta su *Alexa Fluor 488* (*siRNA/AF488*, *QIAGEN*, Venlo, Nyderlandai). Jeigu sąlygos leido, antroji ląstelė buvo atveriamą eksperimento pabaigoje ir išmatuojamas g_T . Pagal registruojamą g_T/V_T atsaką, buvo įvertinta, ar tiriamasis MTV yra atviro tipo vamzdelis, ar turi PJ. Eksperimento eigoje MTV tipas buvo nustatomas, panaudojant PJ blokatorių oktanolį (dažui sklindant per atviro tipo MTV, oktanolis dažo kaupimosi antroje ląstelėje nestabdo, o sklindant PJ turinčiais MTV – stabdo). MTV pralaidumas *siRNA/AF488* buvo įvertintas taip, kaip aprašyta pirmiau.

2.7. Žaizdos gijimo modelis

HeLa ląstelių judrumas, kuris siejamas su piktybinio naviko invazyvumu, buvo tirtas, naudojant žaizdos gijimo modelį. Šiems tyrimams ląstelės buvo įprastai auginamos ant dengiamųjų stiklelių, kol tolygiai vienu sluoksniu padengdavo visą jų paviršių. Susiformavęs sluoksnis centrinėje dalyje buvo suardomas steriliu skalpeliu ir ląstelių liekanos pašalinamos, plaunant augimo terpe. Žaizdos gijimas buvo vertintas, apskaičiuojant likusį laisvą (ląstelių neužimtą) žaizdos plotą po 5, 10 arba 12 valandų [59].

2.8. Imunocitochemijos metodas

Lėkštelėse su ant dugno esančiais dengiamaisiais stikleliais kultivuojamos *LSCC* arba *HeLa* ląstelės buvo fiksuojamos 4 proc. paraformaldehidu (15 min.) ir paveikiamos 0,2 proc. *Triton X-100/PBS* (3 min.). Taip paruošti dengiamieji stikleliai su ląstelėmis drėgnoje 5 proc. CO_2 aplinkoje 37°C temperatūroje inkubatoriuje 1 val. buvo veikiami pelės antikūnu prieš alfa

tubuliną (*Sigma-Aldrich*, Steinheim, Vokietija). *LSCC* ląstelės dar buvo veikiamos pirminiais antikūnais: triušio antikūnu prieš *Cx43* (*Invitrogen*, JAV), pelės antikūnu prieš *Cx43* (*Transduction Laboratories*, Lexington, KY, JAV), triušio antikūnu prieš *Cx26* (*Invitrogen*, JAV) ir triušio antikūnu prieš *Cx30* (*Sigma-Aldrich*, Steinheim, Vokietija). Po to *LSCC* ar *HeLa* ląstelės tokiomis pat sąlygomis 30 min. buvo veikiamos antriniais antikūnais: ožkos antikūnu prieš pelės *IgG H&L*, sujungtu su *Cy5* (*Abcam*, Cambridge, Jungtinė Karalystė), arba asilo antikūnu (*LSCC*) prieš triušio *IgG*, sujungtu su *FITC* (*Santa Cruz*, CA, JAV). F aktinas buvo žymimas *LSCC* ar *HeLa* ląstelių inkubatoriuje drėgnoje 5 proc. CO₂ aplinkoje 37 °C temperatūroje 30 min. veikiant *Alexa Fluor 594* faloidinu (*Invitrogen*, JAV), branduolio produktai – *DAPI* (*Vector Laboratories*, JAV). Mitochondrijos buvo vizualizuojamos gyvas ląstelių pagal gamintojo nurodymus paveikiant mitochondrijoms specifiniu žymeniu *MitoTracker Green* (*Invitrogen*, JAV). Taip paruoštos ląstelės toliau buvo tirtos ir duomenys analizuojami pirmiau aprašytu fluorescencinės mikroskopijos metodu.

2.9. Imunohistochemijos metodas

Imunohistochemijos metodu buvo pažymėtos į MTV panašios struktūros ir *Cx* bei vizualizuotos mitochondrijos *LSCC* audiniuose *ex vivo*. Po pirmio paruošimo (išsamiai aprašyta publikacijoje 2) stikleliai su audinio pjūviais drėgnoje 5 proc. CO₂ aplinkoje 4 °C temperatūroje inkubatoriuje pirmiausia 1 val. buvo veikiami pelės pirminiu antikūnu prieš alfa tubuliną (*Sigma-Aldrich*, Steinheim, Vokietija) arba 18–20 val. triušio antikūnu prieš *Cx43* (*Invitrogen*, JAV), triušio antikūnu prieš *Cx26* (*Invitrogen*, JAV) ir triušio antikūnu prieš *Cx30* (*Sigma-Aldrich*, Steinheim, Vokietija), tada 2 val. veikiami antriniais rūšiai specifiniais asilo antikūnais prieš pelę arba asilo antikūnais prieš triušį, sujungtais su *FITC* (*Chemicon*, CA, JAV). F aktinas buvo žymimas *Alexa Fluor 594* faloidinu (*Invitrogen*, JAV). Mitochondrijos buvo vizualizuojamos antikūnais prieš mitochondrijas (*Acam*, Cambridge, Jungtinė Karalystė) ir antriniais asilo antikūnais prieš pelę, sujungtais su *FITC* (*Chemicon*, JAV). Ant taip paruoštų mėginių buvo uždedamas dengiamasis stiklelis, naudojant terpę su *DAPI* (*Vector Laboratories*, JAV) (metodika ir vaizdų analizavimo įranga išsamiai aprašytos 2014 m. publikacijoje su disertacijos duomenimis).

2.10. Statistinė duomenų analizė

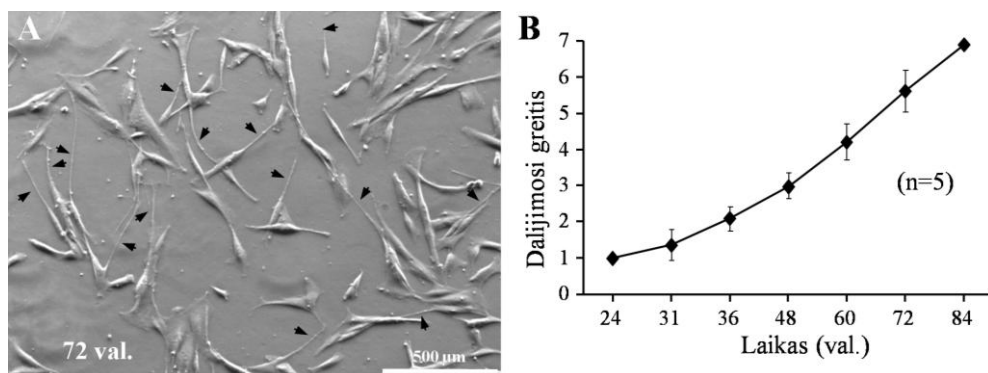
Duomenys buvo analizuojami, naudojant *SigmaPlot 10* programinę įrangą (*Systat*, *Richmond*, JAV) ir eksperimentų rodmenys pateikiami kaip

vidurkis $\pm$ standartinė paklaida (*SEM*), apskaičiuoti iš ne mažiau kaip trijų nepriklausomų matavimų. Palyginant duomenis, skirtumų patikimumui įvertinti buvo naudojamas Stjudento *t* kriterijus, o skirtumas laikomas statistiškai reikšmingu, jeigu *p* reikšmė yra $< 0,05$.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. MTV tarp *LSCC* ląstelių *in vitro* apibūdinimas

Buvo tirtos 5–15 persėjimo *LSCC* ląstelės, kai jų dauginimasis ir judrumas ($19,4 \pm 2,8 \mu\text{m/val.}$; $n = 20$) *in vitro* buvo intensyviausi (3.1.1 pav.). Šiose ląstelėse buvo natūralių Cx (išsamiai aprašyta 3.3.1. poskyryje) ir joms, kaip ir kitų piktybinių navikų ląstelėms, buvo būdingas mažas membranų potencialas ($-13,7 \pm 1,2 \text{ mV}$; $n = 40$) [16]. Tyrimai atskleidė, kad nutolusios *LSCC* ląstelės geba palaikyti tiesioginį ryšį per ilgus (iki 1 mm) MTV, kurie tarp nutolusių ląstelių *in vitro* formavosi penkiais būdais. Ant 1,2 cm skersmens dengiamojo stiklelio suskaičiavus 3 564 *LSCC* ląsteles (1 cm^2 plote buvo maždaug 3 200 ląstelių), buvo suskaičiuoti 136 skirtingais būdais susiformavę MTV (MTV formavimosi būdai aprašyti 3.2 poskyryje). Storiausieji (iki $5 \mu\text{m}$ siauriausioje vietoje) ir ilgiausieji (iki 1 mm) MTV tarp *LSCC* ląstelių *in vitro* (3.1.1 A pav.) priminė Brett G. Zani su bendradarbiais aprašytuosius epitelinius tiltelius [215].



3.1.1 pav. *LSCC* ląstelių dalijimosi *in vitro* apibūdinimas

(A) *LSCC* ląstelės *in vitro* (praėjus 3 paroms po aštuntojo persėjimo). Juodos rodyklės nukreiptos į įvairiais būdais susiformavusius MTV. (B) Aštuntojo persėjimo *LSCC* ląstelių dalijimosi greitis ($n = 5$).

Be šių MTV, matomų *LSCC* ląstelių kultūroje net mažai padidinus, buvo pastebėta ir daug plonesnių ($< 1 \mu\text{m}$) bei trumpesnių (iki $100 \mu\text{m}$) MTV, kurių struktūra ir morfologija atitiko Amin Rustom su bendradarbiais [158] pateiktą pirminį tunelinių nanovamzdelių apibūdinimą (3.1.1 lentelė).

Formuojantis MTV ar epiteliniams tilteliams, labai svarbūs komponentai yra F aktinas ir mikrotubulės [4, 214]. F aktinas yra laikomas tunelinių nanovamzdelių žymeniu [116, 158]. *LSCC* ląstelių kultūrą paveikus falo-

dinu, kuris išryškina F aktiną, ir antikūnais prieš alfa tubuliną, kurie padeda vizualizuoti mikrotubulės, buvo įrodyta, kad tarp *LSCC* ląstelių *in vitro* susiformavo dviejų morfologinių tipų MTV: 27 proc. atvejų ($n = 136$) per visą MTV ilgį buvo vien tik F aktinas, o 73 proc. – ir F aktinas, ir mikrotubulės (3.1.1 lentelė).

3.1.1 lentelė. MTV tarp *LSCC* ląstelių *in vitro* savybių suvestinė

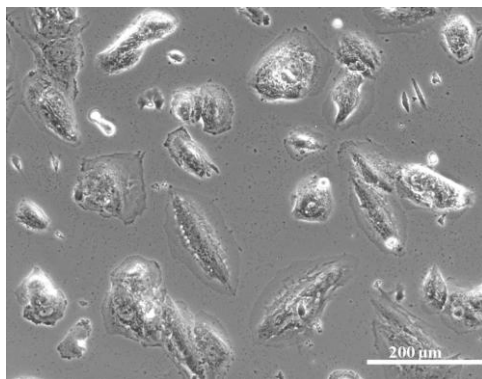
MTV tipas ^a	PJ	l (μm)	d (μm)	g_j (nS)	Specifinis žymuo
MTV1	–	380 ± 54 (23) ^b	$2,4 \pm 0,2$ (23)	$5,3 \pm 1,0$ (23)	F aktinas alfa tubulinas
MTV2	<i>Cx43</i>	174 ± 12 (27)	$2,1 \pm 0,2$ (27)	$6,8 \pm 0,9$ (27)	F aktinas alfa tubulinas
MTV3	<i>Cx43</i>	125 ± 20 ^c (15)	$1,2 \pm 0,1$ (15)	$2,6 \pm 0,5$ (15)	F aktinas alfa tubulinas
MTV4	<i>Cx43</i>	321 ± 46 ^d (11)	$1,9 \pm 0,2$ (11)	$3,2 \pm 0,7$ (11)	F aktinas alfa tubulinas
MTV5	<i>Cx43</i>	44 ± 6 (14)	$< 0,3$ ^e (12)	$0,56 \pm 0,06$ (12)	F aktinas

Pastabos. PJ – plyšinė jungtis; l (μm) – ilgis (mikrometrai); d (μm) – mažiausias skersmuo (mikrometrai); g_j (nS) – PJ elektrinis laidumas (nanosimensai). *Cx43* – MTV buvo *Cx43*.

^a Apie MTV formavimosi tarp nutolusių *LSCC* ląstelių būdus žr. toliau 3.3 poskyryje.

^b Skliaustuose nurodytas eksperimentų skaičius. ^c Jeigu iš galinės lamelipodijos išaugo antrinė lamelipodija, nurodytas antrinės lamelipodijos ilgis. ^d Dviejų išaugų ilgio, išmatuoto nuo ląstelės kūno iki dviejų lamelipodijų susikirtimo taško, suma. ^e Įprastu optiniu mikroskopu nebuvo galimybių išmatuoti ploniausių MTV skersmens.

Aktino polimerizacijos slopikliai (pvz., citochalazinas B ar D) sutrikdo MTV formavimąsi, bet mažai veikia jau susiformavusius MTV [25, 177]. Šviežiai persėtas *LSCC* ląsteles paveikus aktino polimerizacijos slopikliu latrunkulinu A (20 nmol), MTV tarp *LSCC* ląstelių nesiformavo, o *LSCC* ląstelių kultūrą, kurioje jau buvo susiformavęs MTV tinklas, paveikus mikrotubulių polimerizacijos slopikliu kolchicinu (10 μmol ; 24 val. ekspozicija), visi MTV išnyko (3.1.2 pav.).

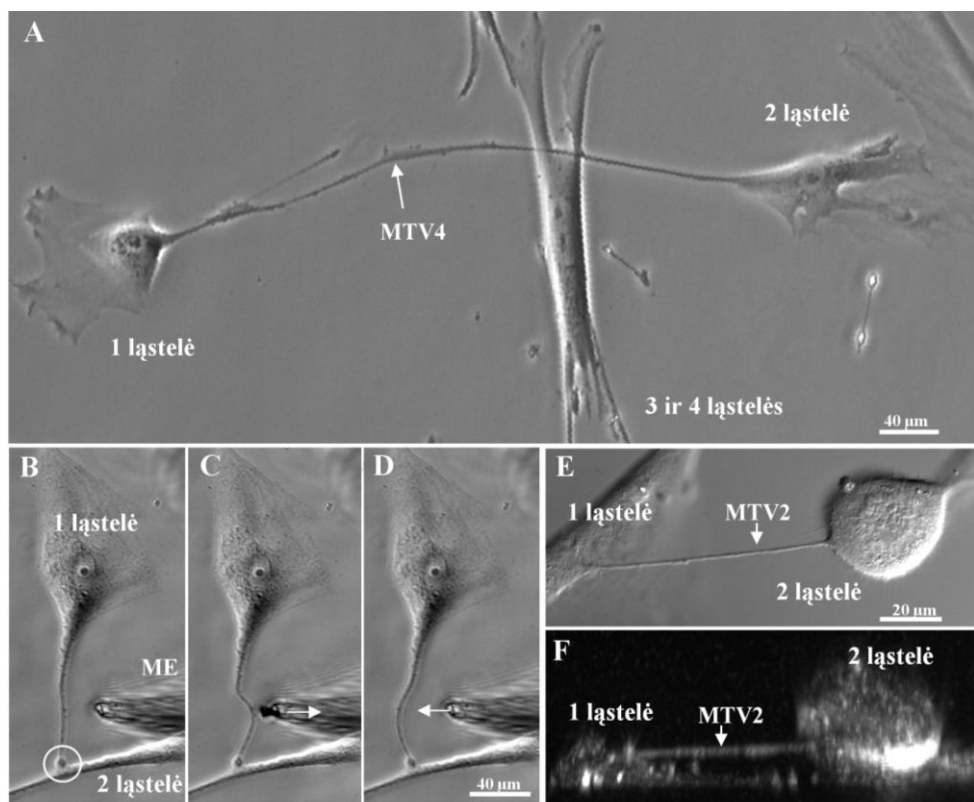


3.1.2 pav. MTV formavimosi *in vitro* slopinimas kolchicinu

LSCC ląstelės po 24 val. 10 μmol kolchicino ekspozicijos. Prieš paveikiant kolchicinu, tarp šių ląstelių jau buvo susiformavęs MTV tinklas.

Mūsų duomenys neprieštaruja kitų autorių iškeltai hipotezei, kad F aktinas yra svarbus tik pradedant formuotis MTV, bet ne toks svarbus vėlesniuose išaugų ilgėjimo ir stabilizavimosi etapuose, todėl jo visada yra trumpuosiuose, bet ne visada randama ilguosiuose MTV [197]. Paskelbta publikacijų, kuriose teigiama, kad aktinas tiesiogiai netgi neskatina membraninių išaugų ar MTV ilgėjimo, o tik yra svarbus membraninių išaugų ir vamzdelių ertmės stabilizavimui [74]. Tubulinas yra keletą kartų lankstesnis už aktiną [58], todėl mikrotubules turintys MTV yra atsparesni aplinkos poveikiui ir susiformavę gyvuoja ilgiau [12], o tai leidžia su jais atlikti daugiau ir sudėtingesnių tyrimų.

Tirtieji MTV *in vitro* buvo pakilę virš substrato, kaip ir kitų tyrėjų aprašyti MTV [4, 158] ar epiteliniai tilteliai [214, 215], tačiau lamelipodijų ilgėjimo laikotarpiu jų priekinis galiukas substratą lietė. Migruojančios ląstelės *LSCC* ląstelių kultūroje lengvai palįsdavo po kitas ląsteles sujungiančiais MTV (3.1.3 A pav. ir 3.4.2.1 A pav.). Iš išaugų, panašių į lamelipodijas susiformavusio MTV nesukibimas su substratu buvo pademonstruotas į MTV per nulaužtą ME paduodant teigiamą ar neigiamą slėgį (3.1.3 B–D pav.). Šių MTV pakilimą virš substrato atskleidė ir vaizdų Z–X projekcijose analizė (3.1.3 E, F pav.).



3.1.3 pav. MTV tarp LSCC ląstelių pakilimas virš substrato

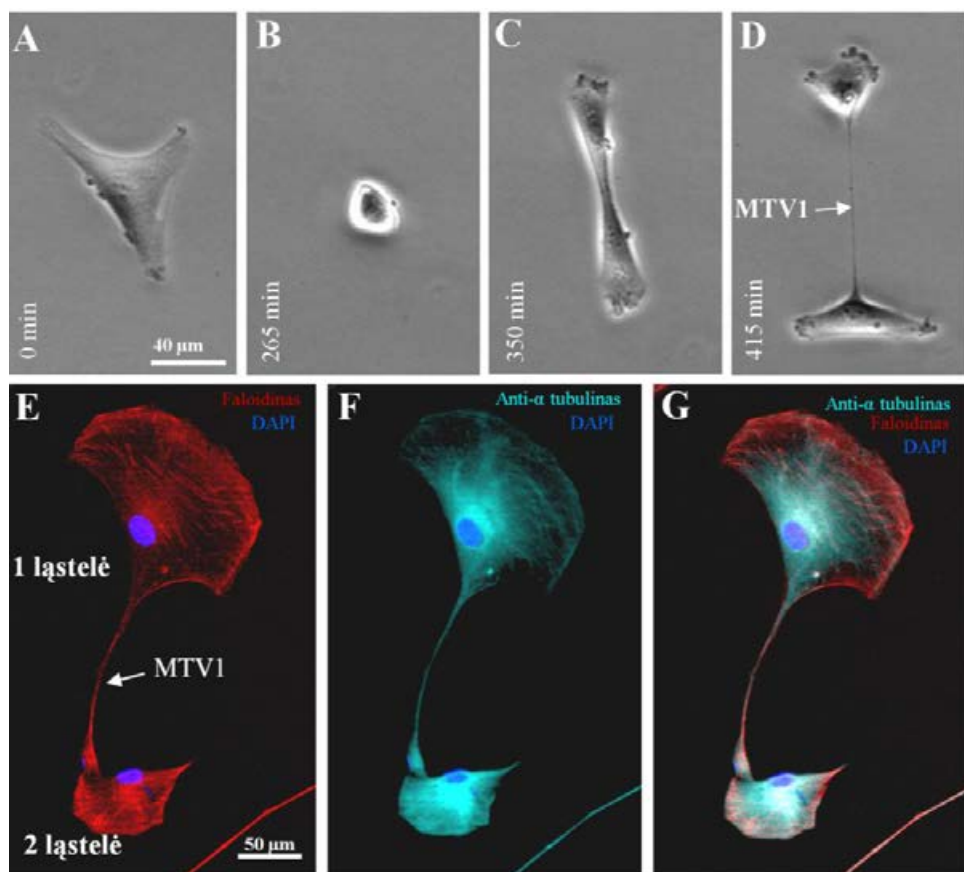
(A) MTV4 tarp 1 ir 2 LSCC ląstelių driekiasi virš kitų dviejų (3 ir 4) ląstelių (nepublikuoti duomenys). (B–D) MTV2 tarp LSCC ląstelių galima deformuoti, paveikus teigiamu ar neigiamu slėgiu. (E, F) Vaizdų Z–X rekonstrukcijoje matyti, kad MTV2 yra pakilęs virš substrato (DIC vaizdas).

3.2. MTV formavimosi tarp LSCC ląstelių būdai

Analizuojant ilgalaikio vaizdų registravimo duomenis, buvo išskirti penki MTV, sujungiančių LSCC ląsteles *in vitro*, formavimosi būdai. MTV1 formavosi pasidalijusioms ląstelėms atitolstant vienai nuo kitos (3.2.1.1 A–D pav.), MTV2 – galinei vienos ląstelės lamelipodijai pasiekus nutolusią ląstelę (3.2.2.1 A pav.), MTV3 – iš antrinių lamelipodijų, augančių iš priekinės ar galinės lamelipodijų (3.2.3.1 A pav.), MTV4 – susikryžiusvus galinėms ar antrinėms lamelipodijoms (3.2.4.1 A pav.), MTV5 – iš į filopodijas panašių išaugų (3.2.5.1 D pav.).

3.2.1. Pirmasis MTV formavimosi būdas

MTV1 formavimosi tarp *LSCC* ląstelių eiga parodyta 3.2.1.1 A–D pav. Subrendusiai ląstelei po mitozės pasidalijus į dvi ląsteles, šios atitoldamos galutinai neatsiskiria, išlaikydamos tiesioginį ryšį per substrato noliečiančius atvirus membraninius tunelius. MTV1 yra patys ilgiausi (iki 1 mm ilgio) ir storiausieji (iki 5 μm skersmens), jų sudėtyje buvo ir F aktino, ir mikrotubulių (3.2.1.1 E–G pav. ir 3.1.1 lentelė), o tai reiškia, kad įvairūs komponentai per MTV1 gali būti pernešami į abi puses [11, 30, 135].

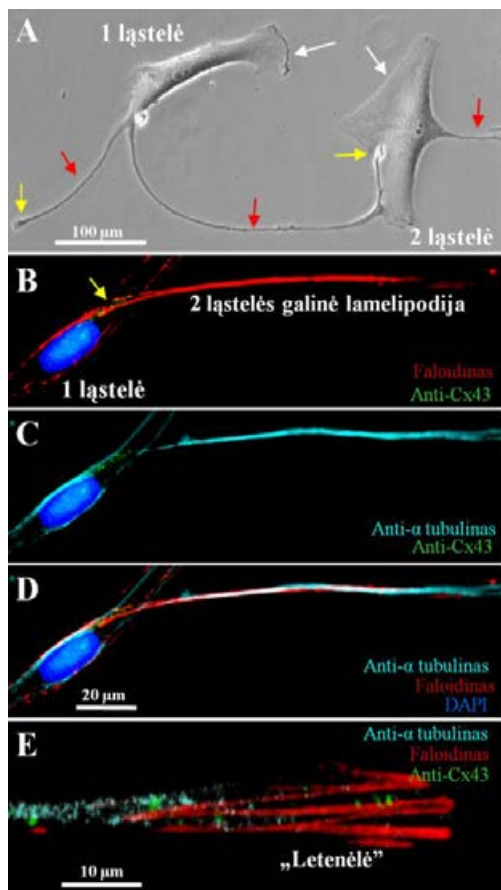


3.2.1.1 pav. MTV1 tarp *LSCC* ląstelių *in vitro*

(A–D) MTV1 formavimosi eiga: subrendusi *LSCC* ląstelė suapvalėja (B) ir po mitozės (C) pasidalija į 2 dukterines ląsteles, kurioms atitolstant, išlaikomas tiesioginis ryšys per atvirus MTV1 (D). (E–G) MTV1 sudėtyje yra ir F aktino (raudona spalva), ir alfa tubulino (šviesiai mėlynei žalsva spalva). (Mėlyna spalva – branduoliai).

3.2.2. Antrasis MTV formavimosi būdas

MTV2 formavosi vienos ląstelės galinei lamelipodijai pasiekus nutolusią ląstelę (3.2.2.1 A pav.), o jų sudėtyje buvo ir F aktino, ir mikrotubulių (3.2.2.1 B–E pav. ir 3.1.1 lentelė). Substrato paviršiumi šliaužiančiame į letenėlę panašiamo lamelipodijos galiuke kartu su F aktinu ir mikrotubulėmis dažnai pastebėtas ir *Cx43* (3.2.2.1 B–E pav.), todėl, lamelipodijos galiukui palietus nutolusią ląstelę, galėjo susiformuoti PJ.



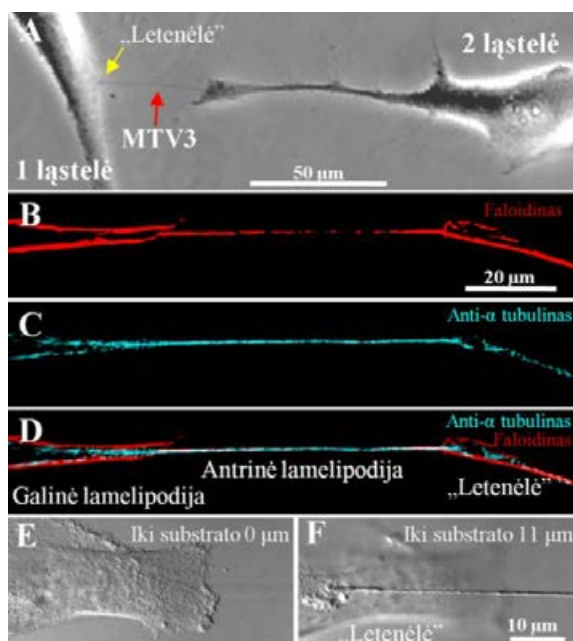
3.2.2.1 pav. MTV2 tarp LSCC ląstelių in vitro

(A) Priekinės lamelipodijos (į jas nukreiptos baltos rodyklės) dalyvauja ląstelių judėjime. Iš 1-osios ląstelės išaugusi galinė lamelipodija (į jas nukreiptos raudonos rodyklės) suformavo MTV2, kuris sujungė 1-ąją ląstelę su 2-ąja ląstele. (B–D) MTV2 sudėtyje yra ir F aktino (raudona spalva), ir alfa tubulino (šviesiai mėlsvai žalsva spalva). (E) Galinėse ar antrinėse lamelipodijų „letenėse“ (į jas nukreiptos geltonos rodyklės) matyti ne tik F aktinas ir alfa tubulinas, bet ir iš *Cx43* sudaryti puskanaliai (žalia spalva). (Mėlyna spalva – branduoliai).

Dvigubo *patch-clamp* metodu įrodyta, kad tokiu būdu susiformavo funkcionalios iš *Cx43* sudarytos PJ (aprašyta 3.3 poskyryje).

3.2.3. Trečiasis MTV formavimosi būdas

Nutolusias *LSCC* ląsteles sujungiantys MTV3 formavosi iš galinių ar priekinių lamelipodijų išaugus antrinėms lamelipodijoms (3.2.3.1 A pav.), o jų sudėtyje buvo ir F aktino, ir mikrotubulių (3.2.3.1 B–D pav. ir 3.1.1 lentelė). MTV3 taip pat buvo pakilę virš substrato (3.2.3.1 E, F pav.), jų ilgis siekė iki 300 μm , o mažiausias skersmuo buvo maždaug 0,5–2 μm (3.1.1 lentelė).



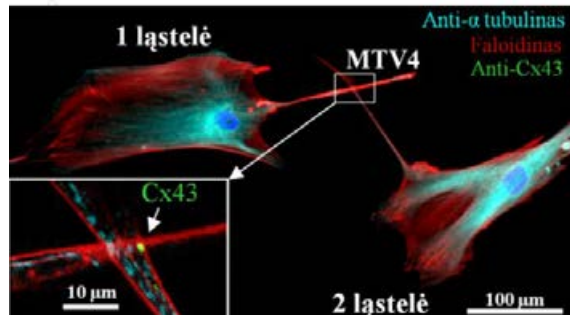
3.2.3.1 pav. MTV3 tarp *LSCC* ląstelių *in vitro*

(A) Iš 2-osios ląstelės galinės lamelipodijos išaugusi antrinė lamelipodija (į ją nukreipta raudona rodyklė) suformavo MTV3, kuris 2-ąją ląstelę sujungė su nutolusia 1-ąja ląstele. (B–D) MTV3 sudėtyje yra ir F aktino (raudona spalva), ir alfa tubulino (šviesiai mėlsvai žalsva spalva). (E, F) 1-ąją ląstelę su 2-ąja ląstele sujungiantis MTV3 yra per 11 μm pakilęs virš substrato (*DIC* vaizdas).

3.2.4. Ketvirtasis MTV formavimosi būdas

LSCC ląstelės buvo pakankamai judrios *in vitro*, todėl joms migruojant, ilgėjančios jų galinės ar antrinės lamelipodijos kartais susikryžiuodavo suformuodamos MTV4, kuriuose buvo ir F aktino, ir mikrotubulių, taip pat

iš *Cx43* sudarytų PJ (3.2.4.1 pav.). Šių PJ funkcionalumas įrodytas dvigubo *patch-clamp* metodu (aprašyta 3.3 poskyryje). Tokių MTV formavimosi tarp nutolusių ląstelių galimą būdą mes atskleidėme pirmieji ir kol kas vieninteliai.



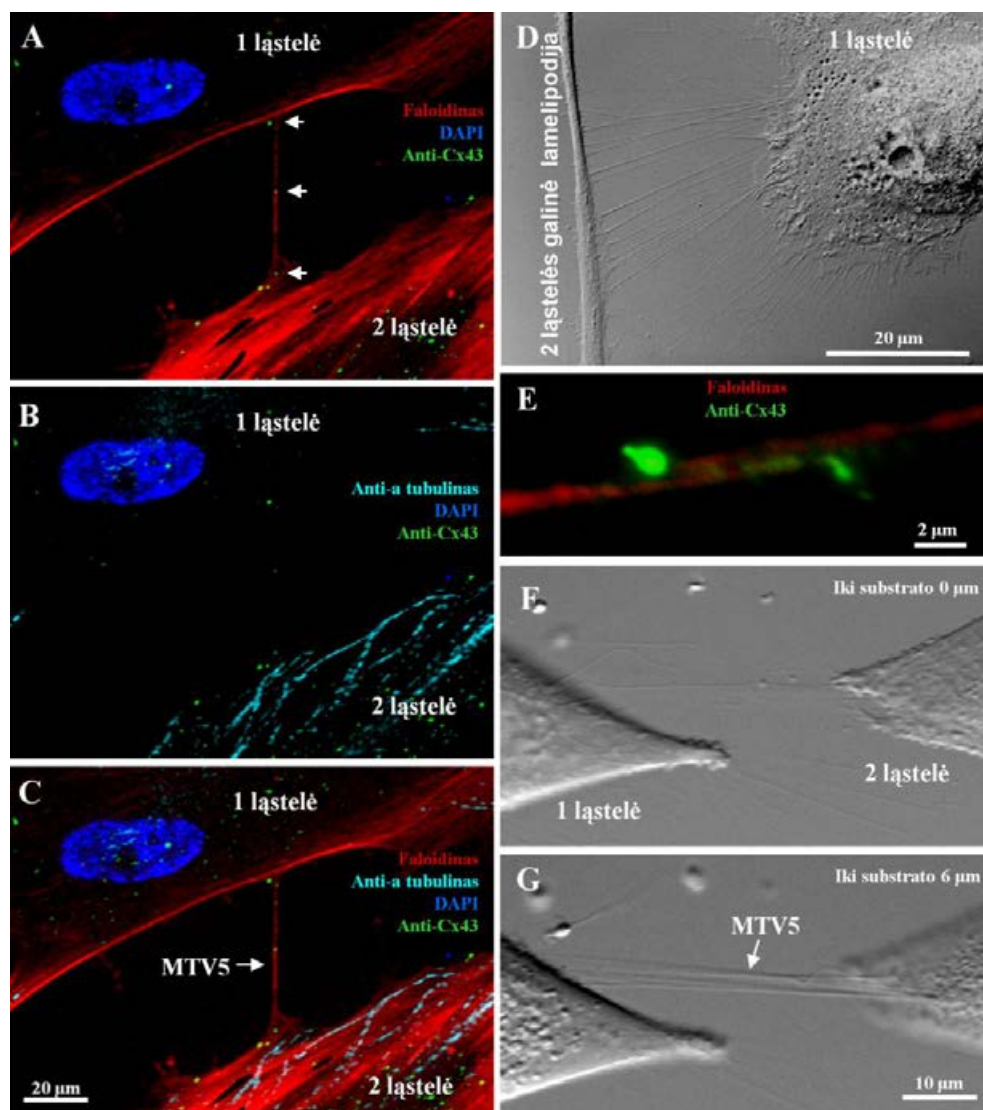
3.2.4.1 pav. MTV4 tarp *LSCC* ląstelių *in vitro*

MTV4 susiformavo, susikryžiauvus galinėms ar antrinėms lamelipodijoms. Lamelipodijų susikryžiavimo vietoje pastebėtos *Cx43* PJ (žalias taškas, į kurį nukreipta balta rodyklė intarpe). (F aktinas – raudona spalva; alfa tubulinas – šviesiai mėlyna spalva; branduoliai – mėlyna spalva).

3.2.5. Penktasis MTV formavimosi būdas

MTV5 buvo patys ploniausi ir trumpiausi MTV (3.1.1 lentelė). MTV5 formavosi susiglaudusių *LSCC* ląstelių atsiskyrimo būdu arba ilgėjančioms vienos ląstelės filopodijoms pasiekus nutolusią ląstelę (3.2.5.1 D pav.). Kartais MTV5 susiformuodavo susijungus susitikusioms dviejų nutolusių *LSCC* ląstelių augančioms filopodijoms, kurių galiukuose pastebėtas *Cx43*, o susiformavę MTV5 šiuo atveju turėjo funkcionalias iš *Cx43* susidariusias PJ (3.2.5.1 E ir 3.1.1 lentelė). Susiformavusių PJ, susidariusių iš *Cx43*, funkcionalumas buvo įrodytas dvigubo *patch-clamp* metodu (aprašyta 3.3 poskyryje). MTV5, kaip ir kitais būdais susiformavę MTV, buvo pakilę virš substrato (3.2.5.1 F, G pav.), bet neturėjo mikrotubulių (3.2.5.1 B pav.).

Manoma, kad formuojantis MTV5 greičiausiai dalyvauja membranoje esantys N kadherinai ir beta kateninai, kuriems veikiant kontakto vietoje lipidų dvisluoksnis deformuojasi, išlinksta [94], ir tarp dviejų ląstelių membranų pirmiausia susiformuoja inkarinės jungtys [107]. Literatūros duomenimis, šios membranos susiliejo molekules kaupiasi filopodijos, iš kurios formuojasi MTV, galiuke [107].



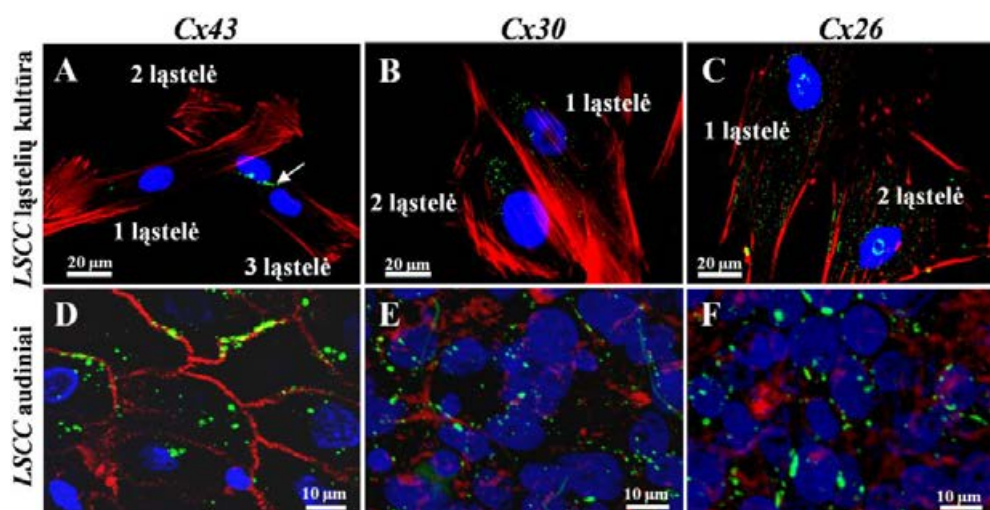
3.2.5.1 pav. MTV5 tarp LSCC ląstelių in vitro

(A–D) MTV5, kurių sudėtyje yra tik F akтино (raudona spalva). (A–C) Ląstelių paviršiuje ir pagal MTV5 eigą matomi Cx43 (žalia spalva; į juos nukreiptos trumpos baltos rodyklės). (E) MTV5 turėjo funkcionalias iš Cx43 susiformavusias PJ. (F, G) MTV5, sujungiantys 1-ąją ląstelę su 2-ąja ląstele, yra per maždaug 6 μ m pakilę virš substrato (DIC vaizdas). (Alfa tubulinas – šviesiai melsvai žalsva spalva; branduoliai – mėlyna spalva).

3.3. Elektrinio ryšio per MTV tyrimai

3.3.1. Koneksinų raiška *LSCC* ląstelių kultūroje ir audiniuose

Remiantis literatūros duomenimis, gerklų plokščiojo epitelio piktybiniuose navikuose buvo aptikti *Cx43*, *Cx30* ir *Cx26*, o jų raiška vykstant kancerogenezei gerklų epitelyje nekinta [168]. Panaudojus specifinius antikūnus, *LSCC* ląstelių kultūroje ir audiniuose taip pat buvo pastebėtas *Cx43*, *Cx30* ir *Cx26* švytėjimas (3.3.1.1 pav.).



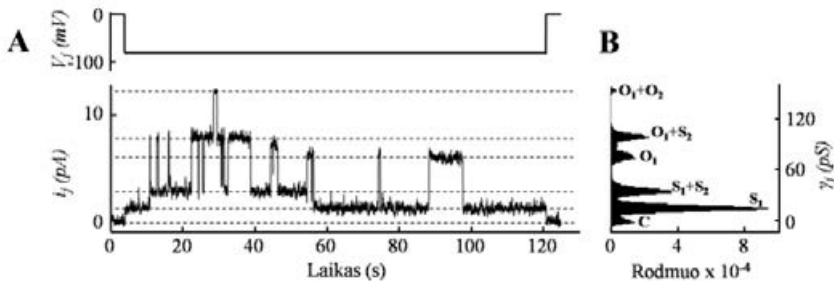
3.3.1.1 pav. *Cx43*, *Cx30* ir *Cx26* raiška *LSCC* *in vitro* ir audiniuose

Imunocitocheminiu metodu paruoštoje *LSCC* ląstelių kultūroje (A–C) ir imunohistocheminiu metodu paruoštuose *LSCC* audiniuose (D–F) pastebėti *Cx43*, *Cx30* ir *Cx26*. (A, D) *Cx43* PJ tarp *LSCC* ląstelių (žalios spalvos taškai, į kuriuos nukreipta balta rodyklė), kurių funkcionalumas patvirtintas *patch-clamp* metodu. (B, E) *Cx30* *LSCC* ląstelėse *in vitro* ir audiniuose. (C, F) *Cx26* *LSCC* ląstelėse *in vitro* ir audiniuose.

Norint išsiaiškinti, ar trijų tipų *Cx*, aptikti *LSCC* ląstelėse, turi įtakos elektriniam ryšiui tarp nutolusių *LSCC* ląstelių, buvo atlikti elektrofiziologijos tyrimai dvigubo *patch-clamp* metodu, įskaitant atskirų PJ kanalų laidumo įvertinimą. Elektrofiziologijos tyrimais nustatyta, kad funkcionalias PJ tarp susiglaudusių *LSCC* ląstelių *in vitro* formuoja vienintelis *Cx43*, todėl *Cx26* ir *Cx30* greičiausiai yra membranoje ir (ar) citozolyje esantys puskanaliai, vykdantys su PJ nesusijusias funkcijas [130].

3.3.2. Atskirų PJ kanalų laidumo tyrimai

Iš *Cx26*, *Cx30* ar *Cx43* sudarytų atskirų PJ kanalų laidumas (atvirosios / liekamosios būsenos) yra atitinkamai 115–150/30 pS, 160/27 pS ar 90–110/30 pS [24, 60, 127]. Buvo patikrinta, ar tokio dydžio laidumą (γ_j) galima išmatuoti PJ turinčiuose MTV(2–5). Srovės per atskirus PJ kanalus tarp nutolusių *LSCC* ląstelių, sujungtų skirtingais būdais susiformavusiais MTV, buvo išmatuotos, paveikus PJ kanalų slopikliu oktanoliu (0,5 mmol). Jis labai sumažino elektrinį ryšį tarp *LSCC* ląstelių ir leido užregistruoti atskirų PJ kanalų atsidarymą. Paduodant 2 min. trukmės -80 mV įtampos impulsą (V_j) į vieną iš per MTV sujungtų *LSCC* ląstelių, buvo išmatuotos srovės per atskirus PJ kanalus (i_j) (3.3.2.1 A pav.). Naudojant *pClamp 10* programinę įrangą pagal visų taškų histogramą, aproksimuotą pagal Gauso funkciją, buvo apskaičiuoti atskirų PJ kanalų atvirosios ir liekamosios būsenos laidumai (3.3.2.1 B pav.).



3.3.2.1 pav. Atskirų PJ kanalų tarp *LSCC* ląstelių laidumas

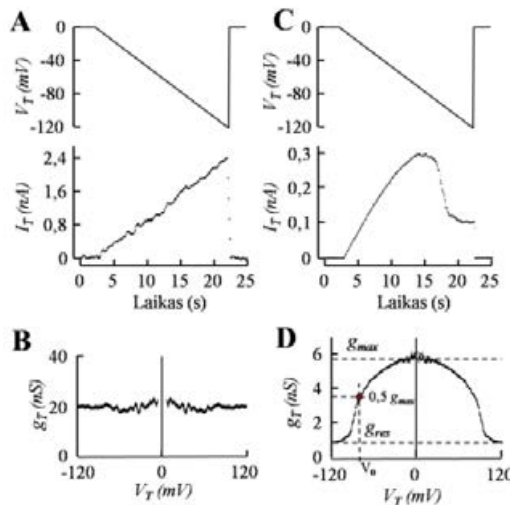
(A) Atskirų PJ kanalų srovės (i_j) tarp *LSCC* ląstelių (apatinė dalis), paduodant 2 min. trukmės -80 mV įtampos impulsą (V_j) (viršutinė dalis). (B) Atskirų PJ kanalų atvirosios (O) ir liekamosios (S) būsenų laidumai (γ_j). Galima atpažinti du funkcionalių PJ kanalus su atitinkamais liekamosios ir atvirosios būsenos laidumais, būdingais iš *Cx43* susidariusių PJ kanalams.

Vidutinis atskirų PJ kanalų atvirosios ir liekamosios būsenų laidumas tarp susiglaudusių ląstelių buvo atitinkamai $94 \pm 6\text{ pS}$ ir $32 \pm 3\text{ pS}$ ($n = 11$), o per PJ turinčius MTV – atitinkamai $93 \pm 6\text{ pS}$ ir $33 \pm 3\text{ pS}$ ($n = 9$). Taigi, matavimai padėjo atskleisti, kad elektriniam ryšiui tarp susiglaudusių ar nutolusių *LSCC* ląstelių palaikyti yra svarbūs tik iš *Cx43* susidarę PJ kanalai.

3.3.3. Bendrojo PJ laidumo tyrimai

PJ gali turėti daug funkcionalių kanalų: vidutinis laidumas tarp susiglaudusių *LSCC* ląstelių buvo $33,6 \pm 6,2\text{ nS}$ ($n = 15$). Laidumo (g_T) per MTV(1–

5) tarp nutolusių *LSCC* ląstelių duomenys pateikti 3.1.1 lentelėje. Bendrasis MTV laidumas priklauso nuo MTV ilgio ir skersmens [200], o ypač PJ buvimo ar nebuvimo MTV sąlyčio su nutolusia ląstele vietoje [198]. MTV ilgį ir išorinį skersmenį buvo galima gan tiksliai išmatuoti, visgi g_T ribojantis veiksnys yra ne išorinis, o vidinis MTV skersmuo, kurį įvertinti tiriant įprastu optiniu mikroskopu nėra galimybių. Dvigubo *patch-clamp* metodu buvo atskleista, kad MTV1 dažniausiai yra atviri vamzdeliai, neturintys PJ kanalams būdingos laidumo priklausomybės nuo įtampos (angl. *voltage gating*) (3.3.3.1 A, B pav.). Tais atvejais, kai MTV(2–5) turėjo funkcionalias PJ, buvo užregistruota iš *Cx43* susidariusiems PJ kanalams būdinga g_T priklausomybė nuo V_T (3.3.3.1 C, D pav.).

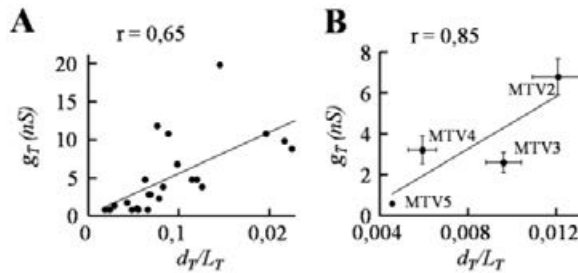


3.3.3.1 pav. Elektrinis ryšys per MTV tarp *LSCC* ląstelių

(A, C) Elektrinis ryšys per MTV tarp *LSCC* ląstelių buvo išmatuotas, paduodant neigiamo poliškumo pjūklo pavidalo nuo 0 iki -120 mV įtampos impulsą (V_T) į vieną iš per MTV sujungtų *LSCC* ląstelių (viršutinė dalis). Srovės per MTV (I_T) atsakas, kuris yra būdingas atviriems vamzdeliams (A apatinė dalis) ir MTV, turintiems funkcionalias PJ (C apatinė dalis). (B) Susiformavus atviriems vamzdeliams (pvz., MTV1), nebūna g_T per MTV priklausomybės nuo V_T (pavaizduota su simetrine kita dalimi). (D) Varpo formos g_T priklausomybė nuo V_T rodo, kad MTV turi funkcionalias *Cx43* PJ.

MTV elektrinis laidumas koreliavo su jų matmenimis: g_T tiesiogiai priklausė nuo MTV skersmens ir buvo atvirkščiai proporcingas MTV ilgiui, ką skelbia ir kiti tyrėjai [200]. MTV1 atveju koreliacija buvo vidutinė ($r = 0,65$) (3.3.3.2 A pav.), bet tam įtakos galėjo turėti ribotos galimybės išmatuoti MTV skersmenį (koreliacija greičiausiai pagerėtų, jeigu būtų

galima išmatuoti vidinį, o ne išorinį MTV skersmenį). MTV(2–5) vidutinis laidumas gerai koreliavo su MTV matmenimis (3.3.3.2 B pav.).



3.3.3.2 pav. MTV laidumo priklausomybė nuo MTV matmenų

(A) MTV1 laidumo ir matmenų koreliacija. (B) MTV(2–5) laidumo ir matmenų koreliacija. MTV5, kurių skersmuo < 200 nm, į statistinę analizę neįtraukti (nes nebuvo galimybių tiksliai išmatuoti jų skersmens). (Paruošta pagal 3.1.1 lentelės duomenis).

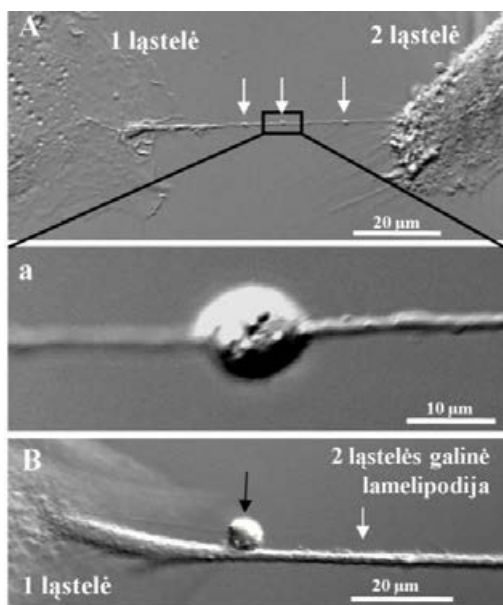
Vis dėlto kartais PJ turinčių MTV g_T nepriklausė nuo MTV matmenų. Tai galima paaiškinti taip: nei MTV ilgis, nei skersmuo, nei lamelipodijos galiuko dydis negali nulemti PJ plokštelės dydžio ar funkcionalių PJ kanalų skaičiaus joje, kaip ir susiglaudusių ląstelių atveju didesnis susiglaudimo plotas negarantuoja, kad susiformuos didesnė PJ plokštelė ar plokštelėje bus daugiau funkcionalių PJ kanalų ir dėl bus didesnis jų laidumas. Taigi, elektrinis ryšys per PJ turinčius MTV priklauso ne tik nuo MTV ilgio ir tarp nutolusių ląstelių susiformavusių MTV skaičiaus, bet ir nuo PJ kanalų skaičiaus bei jų funkcionalumo [200]. Maždaug 20 proc. ląstelių, susijungusių per MTV5 (6 iš 32 atvejų), mūsų eksperimentuose nepalaikė elektrinio ryšio, kaip ir kitų autorių atliktų tyrimų duomenimis [200]. Tai greičiausiai yra susiję su viena iš 3 galimų priežasčių: 1) elektrinio ryšio nebūna, kai susiformuoja uždari vamzdeliai, kuriais įvairūs komponentai gali būti pernešami tik membrana arba MTV spindžiu aktyvios pūslelių pernašos ar pino-citozės būdais; 2) elektrinis ryšys per PJ dar neatsirado, MTV suformavus *de novo* būdu; 3) ląstelės jau prarado elektrinį ryšį per PJ, nes prasidėjo jų atsiskyrimas.

Fluorescencijos tyrimais imunohistocheminiu būdu paruoštuose LSCC audinio preparatuose ir imunocitocheminiu būdu paruoštose LSCC ląstelėse *in vitro* aptikome trijų tipų Cx, o elektrofiziologijos tyrimais įrodėme, kad funkcionalius PJ kanalus tarp susiglaudusių ir per MTV(2–5) susijungusių LSCC ląstelių formuoja vienintelis Cx43. Cx26 ir Cx30 reikšmė palaikant ryšį tarp nutolusių LSCC ląstelių vis dar yra neaiški, tačiau atsižvelgdami į iš Cx26 ir Cx30 suformuotų PJ kanalų laidumą ir galimą šių kanalų porų dydį [131], kurie yra didesni už Cx43 PJ kanalų, galime numatyti, kad Cx26

ir *Cx30* turėtų būti labai svarbūs ląstelių sąveikai (išsamiai aprašyta 3.8 skyriuje).

3.4. Įvairių komponentų pernaša per MTV

Įvairūs komponentai tarp nutolusių *LSCC in vitro* judėjo ir MTV spindžiu, ir buvo pernešami MTV membrana (3.4.1 pav.).



3.4.1 pav. Komponentų pernaša per MTV

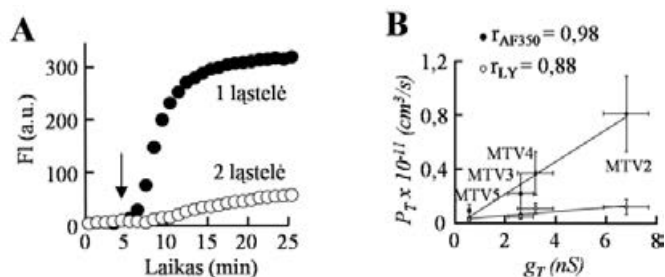
(A ir a) Komponentų pernaša MTV spindžiu (*DIC* vaizdas) (į transportuojamus komponentus nukreiptos baltos rodyklės). (B) Komponentų pernaša MTV membranos paviršiumi (į transportuojamą komponentą nukreipta juoda rodyklė) (*DIC* vaizdas).

Komponentų pernašos mechanizmai iki šiol nėra gerai ištirti ir aprašyti. Literatūros duomenimis (1.7.1. poskyris), pernašos MTV spindžiu mechanizmas yra siejamas su aktyvią prisijungiančiuoju motoriniu baltymu miozinu Va [55]. Tokiu būdu MTV spindžiu yra pernešamos organelės ir pūslelės. Pernašai MTV membrana yra svarbi komponento sąveika su membranoje esančiais receptoriais – taip per MTV iš užkrėstų į neužkrėstas ląsteles patenka mikroorganizmai [135, 181].

3.4.1. Įvairios molekulinės masės ir krūvio medžiagų pernaša

Vertinant skirtingais būdais susiformavusių MTV pralaidumą įvairios molekulinės masės ir krūvio medžiagoms, fluorescencinių dažų pripildytu ME buvo praveriama viena ląstelė, medžiaga difuzijos būdu pamažu ją užpildė ir per MTV pateko į nutolusią LSCC ląstelę (2.5.1 pav.). Laikas, po kurio fluorescencinė medžiaga pradeda kauptis antrojoje ląstelėje, priklauso nuo MTV ilgio, o kaupimosi kinetika – nuo MTV pralaidumo. Pirmojoje ląstelėje pusiausvyros fluorescavimas dažniausiai nusistovėjo per maždaug 10–20 min., o nutolusioje – gerokai vėliau (3.4.1.1 A pav.).

Literatūros duomenimis, PJ kanalai praleidžia ne didesnes kaip 1,2 kDa molekules [131, 173]. Mūsų tyrime buvo patikrinta, ar PJ neturintys MTV praleidžia didesnės molekulinės masės molekules (3.4.1.1 lentelė). MTV1 praleido mažiausiai 3 kDa molekules (pvz., AF488/3000). Visais būdais susiformavę MTV praleido kitas tirtas mažesnės molekulinės masės fluorescencines medžiagas (AF350, LY, DAPI), o jų pralaidumas labai priklausė nuo molekulės krūvio, pavyzdžiui: MTV1 pralaidumas LY (molekulinė masė 443, krūvis –2) tik 3 kartais skyrėsi nuo pralaidumo AF488/3000 (atitinkamai 3000, –1). Nors AF350 (krūvis –1) ir LY molekulinės masės yra panašios, MTV(1–5) pralaidumas šioms medžiagoms skyrėsi keletą kartų. Vidutinis MTV(2–5) pralaidumas fluorescenciniams dažams koreliavo su jų vidutinio elektrinio laidumo rodmenimis (3.4.1.1 B pav.).



3.4.1.1 pav. MTV tarp LSCC ląstelių pralaidumas AF350 ir LY fluorescenciniams dažams

(A) Fluorescencinių dažų kaupimosi kinetika po 1-osios ląstelės atvėrimo dažų užpildytu ME. (B) MTV pralaidumo fluorescenciniams dažams ir elektrinio laidumo koreliacija.

3.4.1.1 lentelė. MTV tarp LSCC ląstelių in vitro pralaidumas

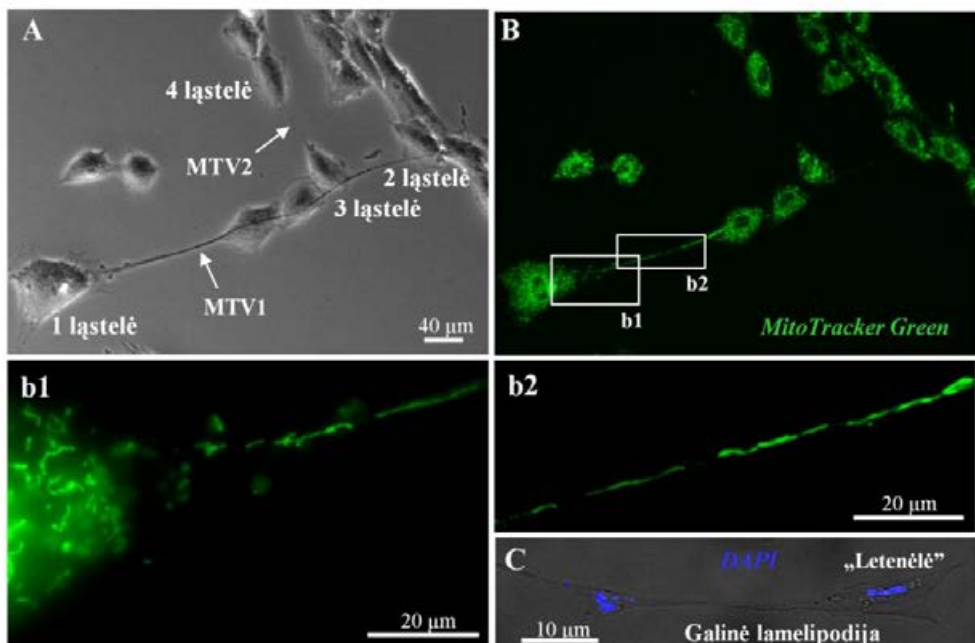
Tipas	$P_T \times 10^{-11} \text{ (cm}^3\text{/s)}$					Mito
	<i>AF350</i>	<i>AF488/3000</i>	<i>LY</i>	<i>DAPI</i> ^a	<i>siRNA/AF488</i>	
MTV1	6,04±1,91 (7)	0,73±0,41 (4)	2,52±1,37 (7)	+	0,34±0,07 (4)	+
MTV2	0,85±0,24 (7)	–	0,16±0,06 (6)	+	0,05±0,01 (6)	+
MTV3	0,24±0,11 (5)	–	0,047±0,015 (5)	+	nd	+
MTV4	0,37±0,16 (4)	–	0,11±0,04 (4)	+	nd	+
MTV5	0,09±0,03 (5)	–	0,027±0,007 (8)	+	nd	–

Jeigu MTV pralaidus, nurodyta „+“, jeigu nepralaidus – „–“, jeigu nėra duomenų – nd.

Mito – mitochondrijos. Skliaustuose nurodytas eksperimentų skaičius. ^a Teigiamo krūvio dažai prisijungia prie nukleotidų, todėl *DAPI* pernaša kiekybiškai nevertinta. $p < 0,05$

3.4.2. Organelių pernaša

MTV(1–4) buvo pastebėtas mitochondrijų judėjimas (3.4.1.1 lentelė), kaip panašiu metu nurodė ir kiti tyrėjai [139], bet mes pirmieji atskleidėme, kad mikrotubules turinčiais MTV juda ne tik pavienės mitochondrijos, bet juose formuojasi gausūs mitochondrijų tinklai (3.4.2.1 B pav. su b1 ir b2 intarpais). MTV5, kuriuose nebūna mikrotubulių, mitochondrijų nepastebėta. Tai patvirtina, kad mitochondrijų pernaša per MTV tarp LSCC ląstelių priklauso nuo mikrotubulių.



3.4.2.1 pav. Mitochondrijų tinklas MTV tarp LSCC ląstelių *in vitro*

(A) MTV1, sujungiantis 1-ąją ląstelę su 2-ąja ląstele, driekiasi virš 3 kitų ląstelių, įskaitant 3-ąją, kuri per MTV2 yra sujungta su 4-ąja ląstele. (B) Visose ląstelėse bei MTV1 ir MTV2 matomas gausus mitochondrijų (žalia spalva) tinklas (b1 ir b2 intarpai). (C) DAPI (mėlyna spalva) pernaša per MTV tarp LSCC ląstelių *in vitro*.

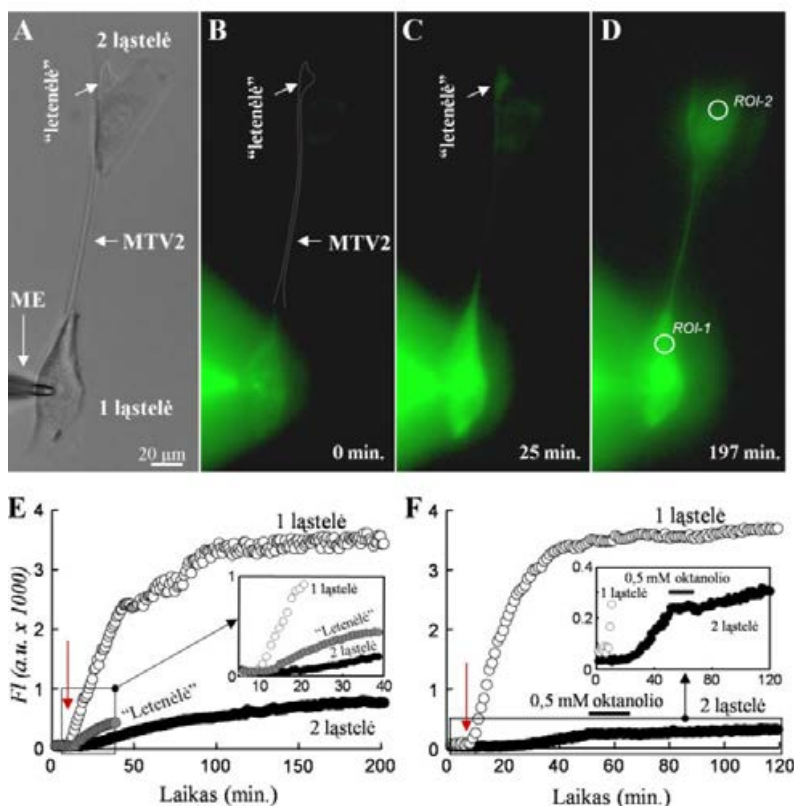
Prieštaringi literatūros duomenys apie mitochondrijų pernašos MTV kryptį yra apžvelgti 1.7.1 poskyryje. Mūsų atrasti mitochondrijų tinklai MTV, turinčiuose ir F aktino, ir mikrotubulių, rodo, kad šios organelės galėtų būti pernešamos į abi puses. Literatūroje aprašyta, kad į abi puses mitochondrijos pernešamos stambesniaisiais (ne *nano* skalės) MTV tarp to pačio tipo (tarp imuninių [135], mezoteliomos [110], inkstų ląstelių [45]) ar tarp skirtingų tipų ląstelių [143]. Pastebėta, kad mitochondrijų pernaša per MTV iš stromos ląstelių į piktybinio naviko ląsteles sužadino šių ląstelių fenotipo pokyčius, siejamus su atsparumu chemoterapijai [139]. Mūsų pastebėjimas (mitochondrijų tinklų buvimas MTV) gali rodyti, kad galimybės tiesiogiai perduoti energiją ir signalus į nutolusias ląsteles yra labai didelės [169]. Labai ilgų (iki 1 mm ilgio) MTV1 susiformavimas tarp besidalijančių ląstelių gali rodyti, kad navikų atveju, kai ląstelių dalijimasis yra sutrikęs, tiesioginio ryšio tarp ląstelių palaikymas per didelius atstumus ir mitochondrijų pernaša tarp šių ląstelių gali palengvinti piktybinio naviko progresavimą, invaziją ir metastazavimą. Yra iškelta hipotezė, kad sveikų mitochondrijų pernašą per MTV tarp skirtingų tipų ląstelių galima panaudoti

gydymui [15], pavyzdžiui, saugant miokardą nuo išeminio pažeidimo [117] ar gydant neurodegeneracines ligas [76, 148].

3.4.3. Genetinės medžiagos pernaša

MTV(1–4) buvo pastebėtos mažos (1–2 μm skersmens) *DAPI* prisipildžiusios pūslelės (3.4.2.1 C pav.). Jos priminė *DAPI* žymėtą mitochondrijų DNR, aptiktą žmogaus osteosarkomos ląstelėse [113]. Tačiau, remiantis literatūra, nukleoidų, kuriuose būna mitochondrijų DNR, skersmuo yra maždaug 99 nm (t. y. daug kartų mažesnis už mūsų pastebėtų pūslelių skersmenį). Net kelių nukleoidų darinio skersmuo būna ne didesnis kaip 300 nm [95]. Todėl buvo iškelta hipotezė, kad pastebėtose pūslelėse gali būti pernešamos branduolio medžiagos, o tai rodytų, kad genetinė informacija per MTV gali būti tiesiogiai perduodama į nutolusias ląsteles.

Norint įsitikinti, kad *miRNA* į nutolusias *LSCC* ląsteles gali būti pernešama tiesiogiai per MTV (turinčius ar neturinčius PJ), buvo atlikti fluorescencijos tyrimai su endogeninės *miRNA* egzogeniniu atitikmeniu *siRNA*, sujungta su *Alexa Fluor 488* dažu (*siRNA/AF488*) (3.4.3.1 pav.). Patikrinti, ar *siRNA/AF488* pernaša susijusi su MTV esančiomis PJ, buvo naudojamas PJ kanalų slopiklis oktanolis (0,5 mmol; 15 min.), kuris sustabdė *siRNA/AF488* kaupimąsi antroje ląstelėje (3.4.3.1 F pav.), bet, nutraukus oktanolio ekspoziciją, *siRNA/AF488* šioje ląstelėje toliau kaupėsi. Didelės molekulinės masės *siRNA/AF488* kaupimasis priimančiojoje ląstelėje buvo daug lėtesnis nei kitų tirtų fluorescencinių medžiagų. MTV1 ir MTV2 pralaidumas (P_T) buvo atitinkamai $3,4 \pm 0,7 \times 10^{-12} \text{ cm}^3/\text{s}$ ($n = 4$) ir $5,0 \pm 1,1 \times 10^{-13} \text{ cm}^3/\text{s}$ ($n = 6$) (3.4.1.1 lentelė). Vėliau mūsų atlikti eksperimentai su *HeLa* ląstelėmis patvirtino, kad *siRNA/AF488* yra pernešama PJ turinčiais MTV, ir atskleidė, kad ši pernaša priklauso nuo ekspresuojamo Cx tipo.



3.4.3.1 pav. MTV pralaidumas siRNA/AF488

(A) Dvi per MTV2 sujungtos LSCC ląstelės (DIC vaizdas). *SiRNA/AF488* (2 μ M) per ME vamzdelį suleista į 1-ąją ląstelę, greitai ją užpildo (B) ir difuzijos būdu per MTV2 sklinda bei pamažu kaupiasi šios ląstelės buvusios lamelipodijos, iš kurios susiformavo MTV2, „letenėlėje“ (C) ir dar lėčiau kaupiasi 2-ojoje ląstelėje (D). (E, F) Raudona rodykle parodytas 1-os ląstelės atvėrimo momentas. (E su intarpu) *SiRNA/AF488* kaupimosi 1-oje ir 2-oje ląstelėse ir „letenėlėje“ kinetika. (F su intarpu) Paveikus oktanoliu (0,5 mM), *siRNA/AF488* kaupimasis 2-oje ląstelėje buvo grįžtamai užblokuotas (tai įrodo, kad *siRNA/AF488* yra pernešama per PJ).

SiRNA ir *miRNA* pernašą per iš *Cx43* susidariusias PJ tarp susiglaudusių ląstelių jau buvo aprašyta įvairių tyrėjų [20, 86, 90, 104, 188, 207], bet ji vis dar nėra tvirtai įrodyta dėl kai kurių su ląstelių artumu (susiglaudimu) susijusių techninių problemų. Mes pirmieji atskleidėme bei kiekybiškai įvertinome galimą *siRNA* pernašą atvirojo tipo ir PJ turinčiais MTV. *SiRNA* pernašą PJ turinčiais MTV yra galima dėl PJ kanalų matmenų (iš *Cx43* sudarytų PJ kanalų skersmuo yra 1,0–1,5 nm [188]), o lazdelės pavidalo *miRNA/siRNA* molekulės mažasis skersmuo yra panašaus dydžio [20, 188]). Jau publikavus mūsų LSCC tyrimo duomenis, Virginijus Valiūnas su bendradarbiais atsklei-

dė, kad per iš *Cx43* susidariusių PJ kanalus pernešta dvigubos grandinės *siRNA* gali slopinti genų raišką ląstelėje taikinyje [189].

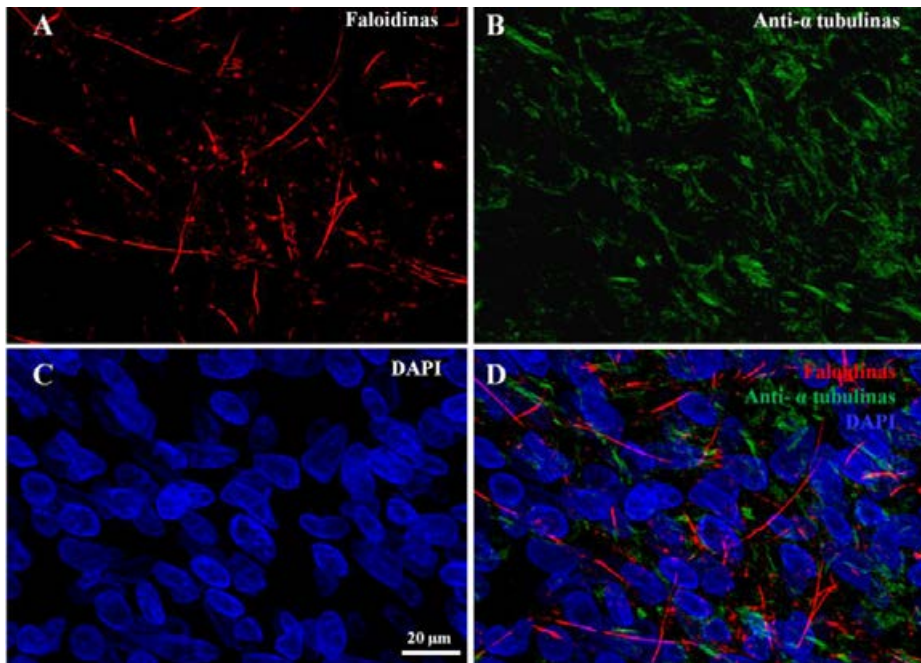
Mūsų pastebėta *DAPI* pūslelių ir *siRNA/AF488* pernaša per MTV tarp ląstelių rodo, kad egzistuoja tiesioginis kelias perduoti *miRNA* ir *siRNA* į nutolusias ląsteles, kuris yra daug greitesnis ir veiksmingesnis už pinocitozę ar endocitozę.

3.5. Į MTV panašios struktūros *LSCC* audinyje

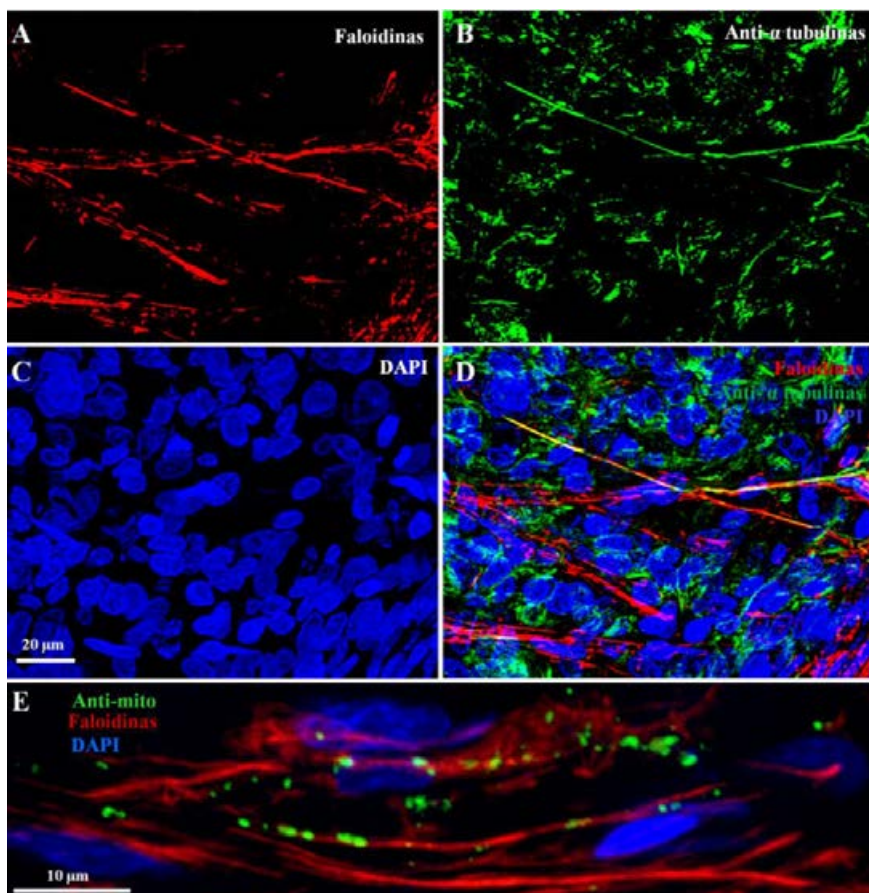
Iki šiol publikuoti tik pavieniai duomenys apie audiniuose pastebėtas į MTV panašias struktūras: pelės ragenos stromoje [33], tarp atsivestų triušiuų mezenchimos ir epitelio kamieninių ląstelių [125], žmogaus pleuros mezoteliomos ir adenokarcinomos mėginiuose [110] bei tarp migruojančių ląstelių žmogaus kiaušidžių vėžio eksplantų kultūroje [139]. Siekiant įrodyti, kad MTV formuojasi ne tik *LSCC* ląstelių kultūroje, bet ir audiniuose, ištirti *LSCC* audinio mėginiai. Mėginio pjūvius paveikus faloidinu ir antikūnais prieš alfa tubuliną, *LSCC* audinyje, kaip ir tarp *LSCC* ląstelių *in vitro*, buvo pastebėtos dviejų tipų struktūros: vienos jų buvo iki 1 μm skersmens ir iki maždaug 100 μm ilgio, o per visą jų ilgį buvo matomas F aktinas (3.5.1 pav.). Tai, tikėtina, yra ląstelių kultūroje matyti MTV5.

Kitos struktūros buvo ilgesnės (iki 300 μm) ir storesnės (maždaug 2–3 μm), jose buvo ir F aktino, ir alfa tubulino (3.5.2 pav.). Be to, šiuo atveju šalia F aktino buvo galima įžiūrėti mitochondrijas (3.5.2 E pav.). Šios struktūros galbūt atitinka kuriuo nors kitu būdu ląstelių kultūroje susiformavusį MTV(1–4).

Tiksliai įvertinti MTV savybių audiniuose nebuvo galimybių, nes 25 μm storio audinio pjūviuose šios struktūros tik labai retais atvejais buvo nepažeistos.



3.5.1 pav. Į MTV5 panašios struktūros LSCC audinio mėginiuose (A–D) Struktūros sudėtyje yra F aktino (raudona spalva), bet nematyti alfa tubulino (žalia spalva). (Mėlyna spalva – branduoliai).

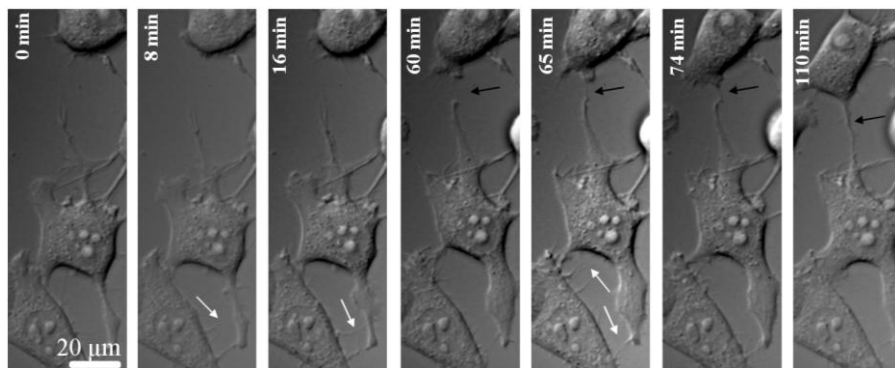


3.5.2 pav. Į MTV(1–4) panašios struktūros LSCC audinio mėginiuose (A–D) Struktūros sudėtyje yra ir F aktino (raudona spalva), ir alfa tubulino (žalia spalva). (E) Greta F aktino (raudona spalva) matomos mitochondrijos (žalia spalva). (Mėlyna spalva – branduoliai).

3.6. Įvairių koneksinų įtaka ląstelių gebai formuoti MTV ir ląstelių judrumui *in vitro*

Cx įtakos MTV formavimuisi ir *HeLa* ląstelių judrumui *in vitro* tyrimai buvo atlikti su *HeLa* ląstelėmis be Cx ar *HeLa* ląstelėmis, į kurias transfekcijos būdu buvo įterpti Cx36, Cx43 ir Cx40, sujungti su fluorescenciniais baltymais (Cx36 EGFP, Cx43 EGFP ir Cx40 CFP), arba Cx45 ir Cx47 be fluorescencinio žymens. Tarp *HeLa* ląstelių su transfekcijos būdu įterptais Cx *in vitro* susiformavo uždarojo ar atvirojo tipo bei PJ turintys MTV (susiformavimo dažnumo santykis atitinkamai 1:2:4). Jie buvo įvairaus

skersmens (nuo mažiau kaip 200 nm iki daugiau kaip 2 μm) ir ilgio (iki 70 μm) (3.6.1 pav. ir 3.6.1 lentelė).



3.6.1 pav. MTV formavimasis tarp *HeLa* ląstelių *in vitro*

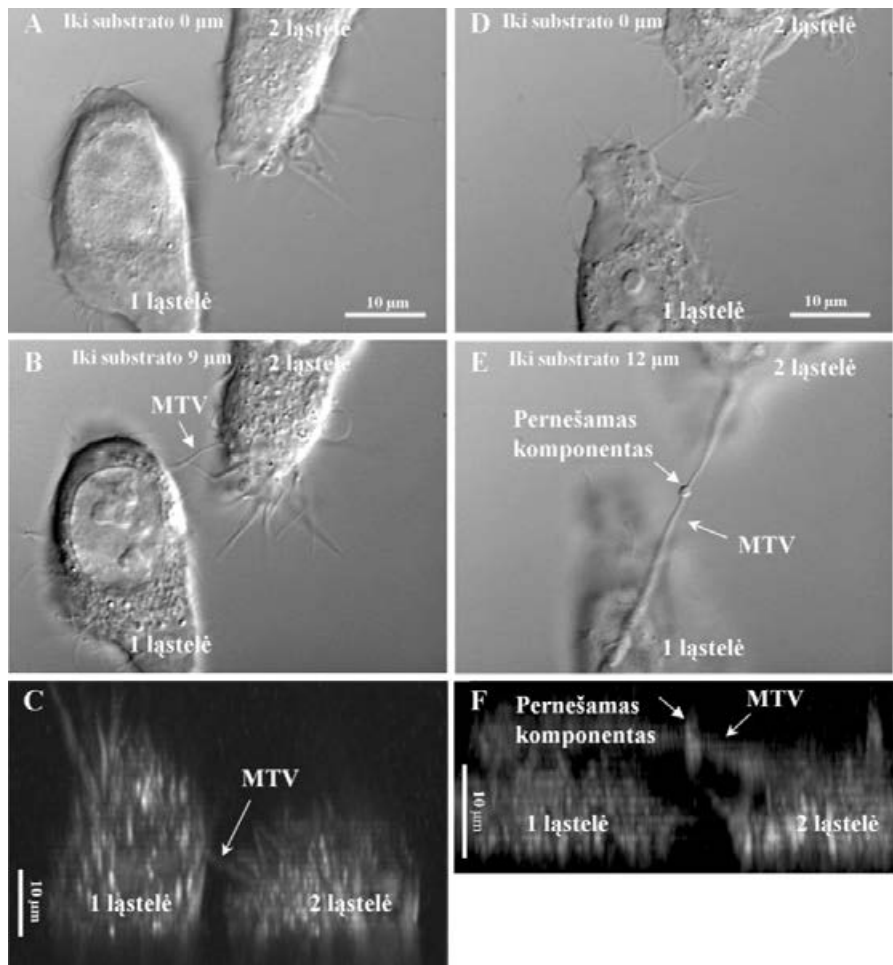
Plonųjų (į juos nukreiptos baltos rodyklės) ir storųjų (į juos nukreiptos juodos rodyklės) MTV formavimasis.

Ploniausiųjų ($< 200\text{ nm}$) MTV tarp *HeLa* ląstelių skersmens, kaip ir tiriant *LSCC* ląsteles *in vitro*, tiksliai išmatuoti nebuvo galimybių. Ploniausieji MTV gyvavo labai trumpai (dešimtimis sekundžių). Storesnieji MTV (skersmuo $> 300\text{ nm}$) formavosi ląstelėms dalijantis ir atsiskiriant arba lamelipodijų formavimosi mechanizmais, gyvavo dešimtimis minučių ar net valandą ir ilgiau, todėl su jais buvo galimi įvairūs eksperimentai.

Tarp *HeLa* ląstelių susiformavę MTV buvo nesukibę su substratu (3.6.2 A–E pav.), o jų spindžiu arba membrana buvo pernešami įvairūs komponentai (3.6.2 E ir F pav.). Tačiau formuojantis MTV per į lamelipodijas panašias išaugas, lamelipodijos ilgėjimo laikotarpiu jų priekinis galiukas buvo sukibęs su substratu, o tai buvo susiję su ląstelių geba migruoti bei formuoti MTV. *HeLa* ląsteles paveikus faloidinu ir antikūnais prieš alfa tubuliną, buvo įrodyta, kad tarp *HeLa* ląstelių be *Cx* ar *HeLa* ląstelių, kuriose vyko įvairių *Cx* (3.6.3 A ir B pav.), kaip ir tarp *LSCC* ląstelių *in vitro*, susiformavo dviejų tipų MTV: vienuose buvo tik F aktino, o kituose – ir F aktino, ir mikrotubulių (3.6.3 A–D pav.). *HeLa* ląstelių kultūroje susiformavo vidutiniškai 17 proc. vien aktino turinčių MTV bei 83 proc. ir F aktino, ir mikrotubulių turinčių MTV. Šis santykis nepriklausė nuo ląstelėje esančio *Cx* tipo.

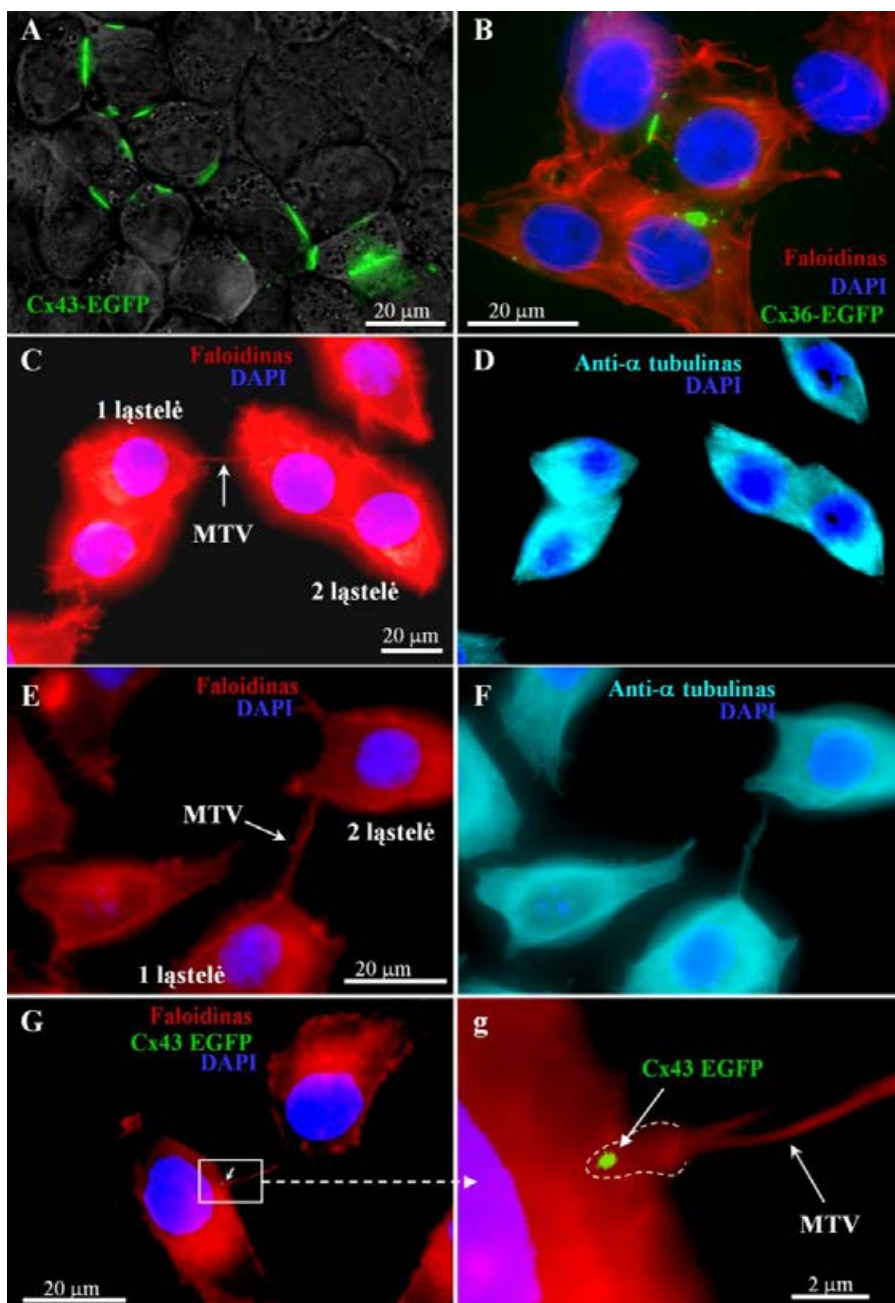
Nei vienos izoformos *Cx* neturėjo įtakos MTV tarp *HeLa* ląstelių matmenims, bet jų skaičius 1 mm^2 plote buvo reikšmingai didesnis tarp ląstelių su *Cx36 EGFP* ir mažesnis tarp ląstelių su *Cx43 EGFP*, *Cx45* ir *Cx47*,

palyginti su *HeLa* ląstelėmis be *Cx* (3.6.1 lentelė ir 3.6.4 pav.). MTV tipas irgi nepriklausė nuo to, koks *Cx* buvo ląstelėje (n = 94).



3.6.2 pav. MTV tarp *HeLa* ląstelių *in vitro*

(A–C) MTV, susiformavę filopodijų augimo būdu, yra pakilę virš substrato. (D–F) MTV, susiformavę kontaktavusių *HeLa* ląstelių atsiskyrimo būdu arba lamelipodijų augimo būdu. (A–E) Keičiant atstumą iki substrato ir (C, F) rekonstruojant vaizdų Z-X projekcijas, įrodyta, kad MTV tarp *HeLa* ląstelių *in vitro* yra pakilę virš substrato.



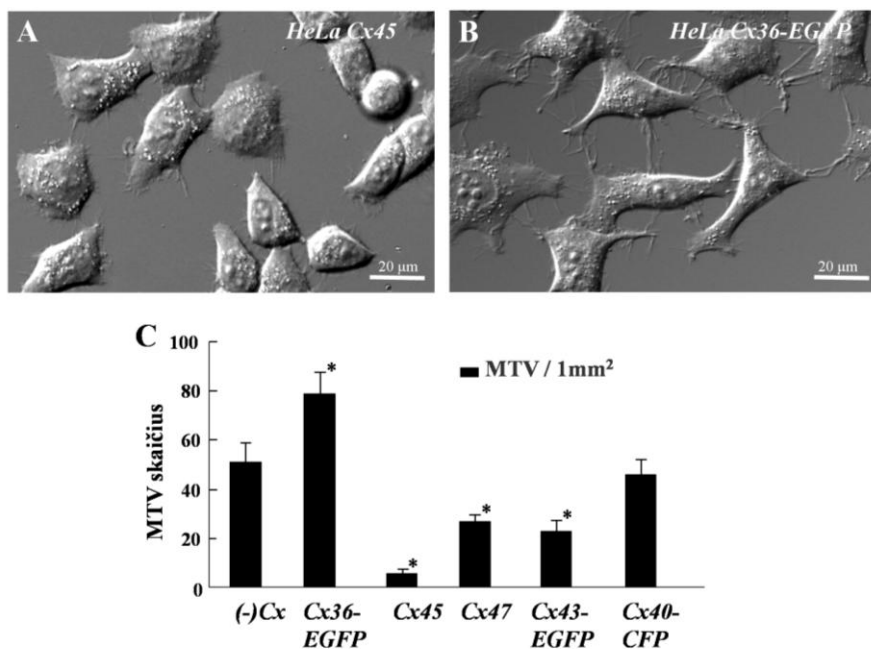
3.6.3 pav. MTV tarp nutolusių *HeLa* ląstelių *in vitro* morfologiniai tipai (A, B) Būdingas *HeLa* ląstelių su *Cx43 EGFP* ir *Cx36 EGFP*, tarp kurių susiformavę daug PJ plokštelių, vaizdas. (C, D) MTV (parodyti baltomis rodyklėmis), kuriuose yra vien F aktino (raudona spalva). (E, F) MTV, kuriuose yra ir F aktino (raudona spalva), ir alfa tubulino (šviesiai žalsvai melsva spalva). (G ir g) MTV, turintys iš *Cx43 EGFP* sudarytą PJ (žalios spalvos taškas, parodytas balta rodykle).

3.6.1 lentelė. MTV tarp *HeLa* ląstelių *in vitro* savybių suvestinė

Cx izoforma	Eksperimentų skaičius (n)	MTV ilgis (μm)	MTV skaičius 1 mm^2 plote
<i>HeLa</i> be Cx	214	$16,3 \pm 0,4$	51 ± 8
<i>Cx36 EGFP</i>	330	$17,0 \pm 0,4$	79 ± 9^a
<i>Cx40 CFP</i>	126	$15,9 \pm 0,5$	46 ± 6
<i>Cx43 EGFP</i>	96	$17,0 \pm 1,1$	23 ± 4^a
<i>Cx45</i>	68	$14,3 \pm 1,0$	$5,7 \pm 1,6^a$
<i>Cx47</i>	112	$15,1 \pm 0,5$	27 ± 3^a

MTV skersmuo buvo $0,4\text{--}2,4 \mu\text{m}$ ($n = 210$; vidutiniškai $0,9 \mu\text{m}$) ir nepriklausė nuo Cx tipo.

^a $p < 0,05$, palyginti su *HeLa* ląstelėmis be Cx.

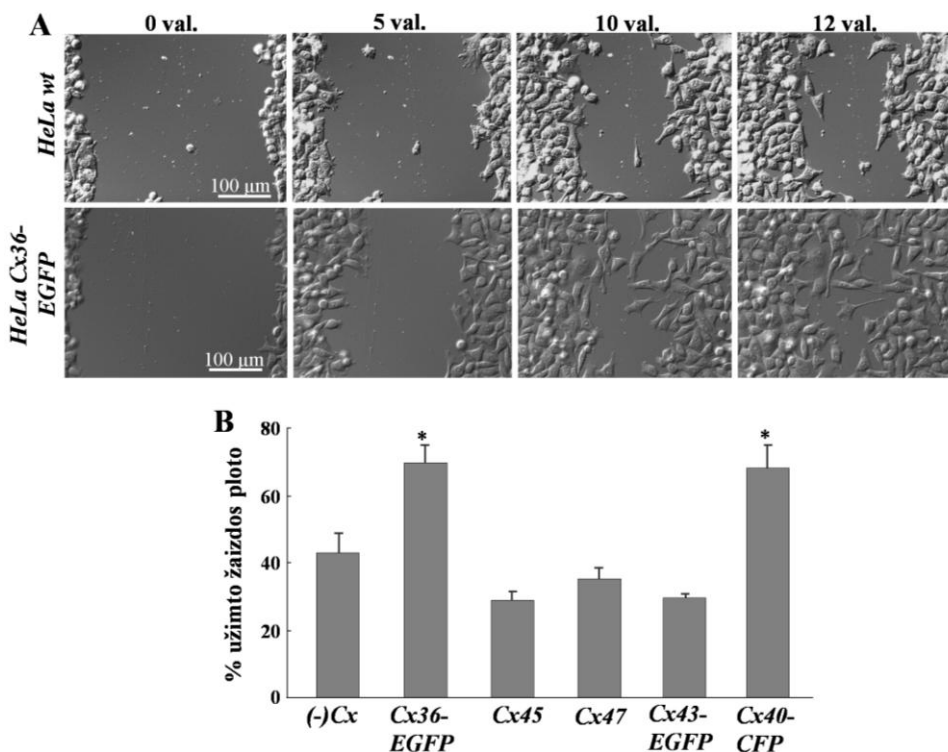


3.6.4 pav. MTV skaičiaus tarp *HeLa* ląstelių priklausomybė nuo transfekcijos būdu įterpto Cx tipo

(A) Būdingas *HeLa* ląstelių su transfekcijos būdu įterptais Cx45 ir (B) *Cx36 EGFP* kultūrų vaizdas. (C) *HeLa wt* ir atskirus Cx ekspresuojančios *HeLa* ląstelės buvo sėjamos maždaug panašiu tankumu (3×10^4) ir, praėjus 36 val., skaičiuojami MTV (DIC mikroskopo pagalba per $\times 20$ objektyvą) 15 atsitiktinių būdu pasirinktų sričių, kartojant skaičiavimus 2 skirtinguose persėjimuose bei apskaičiuojant vidutinį MTV skaičių 1 mm^2 plote ($n = 2 \times 15 = 30$) (pagal 3.6.1 lentelės duomenis). * $p < 0,05$, palyginti su *HeLa* ląstelėmis be Cx.

Tiriant skirtingų Cx įtaką *HeLa* ląstelių judrumui *in vitro*, taikytas žaizdos gijimo modelis. *HeLa* ląstelės, kuriose buvo *Cx36 EGFP* ar *Cx40 CFP*, statistiškai patikimai greičiau užėmė pažeistą plotą (t. y. buvo

judresnės), palyginti su *HeLa* ląstelėmis be *Cx* ir *HeLa* ląstelėmis, kuriose buvo *Cx43 EGFP*, *Cx45* ar *Cx47*. Statistiškai reikšmingų skirtumų tarp *HeLa* ląstelių be *Cx* ir *HeLa* ląstelių, ekspresuojančių *Cx43 EGFP*, *Cx45* ar *Cx47*, nebuvo. Po 12 valandų stebėjimo *HeLa* ląstelės be *Cx* buvo užėmusios $42,8 \pm 6,0$ proc. pažeisto ploto, *HeLa* ląstelės, kuriose buvo *Cx36 EGFP*, – $69,6 \pm 5,4$ proc., *HeLa* ląstelės, kuriose buvo *Cx40 CFP*, – $68,3 \pm 6,7$ proc., *HeLa* ląstelės, kuriose buvo *Cx43 EGFP*, – $29,7 \pm 1,1$ proc., *HeLa* ląstelės, kuriose buvo *Cx45*, – $29,0 \pm 2,4$ proc., o *HeLa* ląstelės, kuriose buvo *Cx47*, – $35,3 \pm 3,3$ proc. (3.6.5 A ir B pav.).



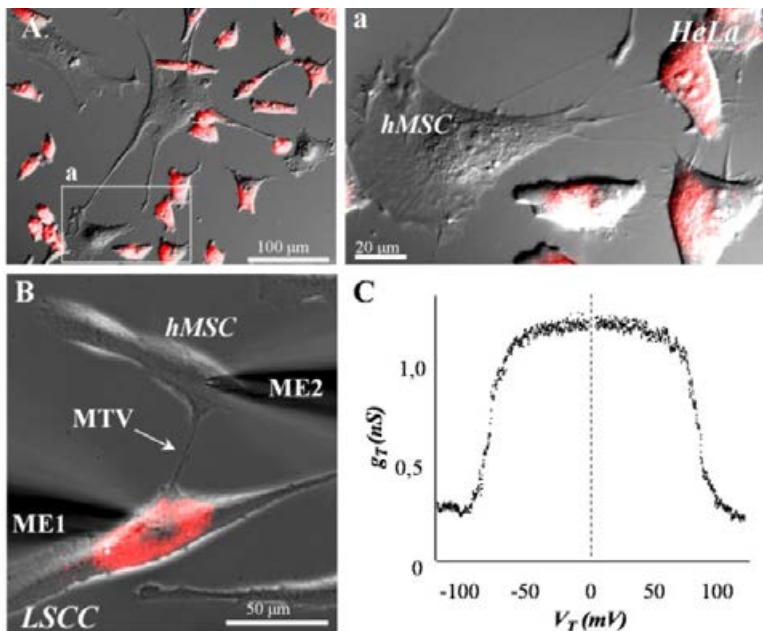
3.6.5 pav. *HeLa* ląstelių judrumas *in vitro*

(A) Žaizdos gijimo modelis su *HeLa* ląstelėmis be *Cx* ir *HeLa* ląstelėmis, kuriose transfekcijos būdu yra įterptas *Cx43 EGFP*, praėjus 5, 10 ir 12 val. po žaizdos suformavimo. (B) *HeLa* ląstelių be *Cx* ir *HeLa* ląstelių, kuriose buvo transfekcijos būdu įterptų skirtingų *Cx*, judrumo palyginimas praėjus 12 val. po žaizdos suformavimo ($n = 3$). * $p < 0,05$, palyginti su *HeLa* ląstelėmis be *Cx*.

3.7. MTV tarp skirtingų tipų ląstelių *in vitro*

HeLa ir *LSCC* ląstelės *in vitro* tiesiogiai sąveikavo per MTV su žmogaus mezenchimos kamieninėmis ląstelėmis (angl. *human mesenchymal stem*

cells, *hMSC*). Pastebėta, kad *HeLa* ląstelės, kuriose buvo transfekcijos būdu įterptas *Cx43*, ir *LSCC* ląstelės, kuriose yra natūralių *Cx43*, geba suformuoti funkcionalias PJ turinčius MTV su *hMSC* ląstelėmis (3.7.1 pav.). PJ funkcionalumas įrodytas dvigubo *patch-clamp* metodu užregistravus būdingą g_T priklausomybę nuo V_T). Tarp 4 ląstelių porų buvo išmatuota $g_T = 4,0 \pm 1,5$ nS.



3.7.1 pav. MTV tarp *HeLa* ar *LSCC* ir *hMSC* *in vitro*

(A) Tarp PKH26 žymėtų *HeLa* ląstelių (rausva spalva), kuriose yra transfekcijos būdu įterptų *Cx43*, ir *hMSC* ląstelių susiformavę MTV. (a) Plonesni MTV tarp *HeLa* ir *hMSC* ląstelių (didesnis padidėjimas). (B) Nutolusias *LSCC* ir *hMSC* ląsteles sujungiantis MTV, per kurį šios ląstelės palaiko elektrinį ryšį (įrodyta, paduodant dvigubo poliškumo pjūklą pavidalo nuo 0 iki -120 mV ir nuo 0 iki 120 mV įtampos impulsą (V_T) į *hMSC* ląstelę ir išmatavus srovę (I_T) *LSCC* ląstelėje. (C) PJ būdinga g_T priklausomybė nuo V_T .

Šis pastebėjimas gali būti naudingas, sprendžiant kai kurias naujų gydymo būdų įdiegimo problemas. Specifinių genų slopinimas yra vienas iš perspektyvių neurodegeneracinių ligų ir piktybinių navikų gydymo būdų, tačiau didžiausia problema – įterpti egzogeninę *siRNA* į ląstelę taikini [20]. Problemą galima spręsti, naudojant mezenchimos kamienines ląsteles kaip *siRNA* tiekimo sistemą, norint regeneruoti pažeistas ar ligos paveiktas ląsteles arba gydant piktybinius navikus [9, 13]. Mat jos nėra imunogeniškos [120], turi didelį proliferavimo potencialą, jose yra *Cx43* ir, kaip parodė mūsų tyrimai, tarp skirtingų tipų ląstelių (*HeLa* ir *LSCC* su *hMSC* ląstelė-

mis) susiformuoja funkcionalias PJ turintys MTV, per kuriuos į nutolusią ląstelę tiesiogiai gali būti pernešama reikiama *siRNA*.

3.8. Rezultatų aptarimas

Šiais tyrimais buvo pirmą kartą atskleista žmogaus *LSCC* naviko ląstelių sąveika per ilgus MTV *in vitro*, be to, panašios struktūros pastebėtos *LSCC* naviko audinių mėginiuose. Nustatyti penki MTV formavimosi tarp *LSCC* ląstelių *in vitro* būdai. Ištyrus tarpląstelinį ryšį, buvo pateiktas kiekybinis elektrinio ryšio per MTV ir MTV pralaidumo įvairaus krūvio ir molekulinės masės medžiagoms įvertinimas. Taip pat įrodyta, kad mikrotubules turinčiuose MTV ne tik juda pavienės mitochondrijos, kaip nurodo kiti autoriai kitų rūšių ląstelių kultūrose [120], bet juose gali formotis ištisi mitochondrijų tinklai. Mitochondrijos greičiausiai galėtų būti pernešamos MTV1, bet ne PJ turinčiais MTV(2–4) ir juo labiau ne MTV5, kuriuose PJ yra, bet nėra mikrotubulių. MTV1 susiformuoja ląstelei po mitozės pasidalijus į dvi dukterines ląsteles – joms atsiskiriant išlaikomas ryšys per trumpučius tarpląstelinius tiltelius, kurie, priklausomai nuo ląstelių rūšies, gali būti kelių ar kelių dešimčių mikrometrų ilgio ir 1–3 μm skersmens [166]. Šie tilteliai ląstelėms galutinai atsiskyrus nutrūksta. Mūsų stebėti MTV1 buvo labai ilgi (iki 1 mm ilgio), o tai gali rodyti, kad naviko ląstelėms nenormaliai dalijančios, ląstelėms nutolstant tarp jų išlieka tiesioginis ryšys. Tokiais MTV pernešamos mitochondrijos gali palengvinti piktybinio naviko invaziją ir progresavimą.

LSCC naviko audiniuose ir ląstelėse *in vitro* buvo aptikti *Cx43*, *Cx30* ir *Cx26*. Žinoma, kad šių *Cx* raiška vystantis gerklų navikams nekinta [120]. Vis dėlto elektrofiziologijos tyrimais (dvigubu *patch-clamp*) nustatyta, kad funkcionalius PJ kanalus tarp susiglaudusių ar per MTV(2–5) susijungusių *LSCC* ląstelių *in vitro* formuoja vienintelis *Cx43*. Pasiūlyta, kad pagal *Cx43* raišką navikuose galima prognozuoti ligos eigą ir atsaką į gydymą [146] ir tikėtina, kad tam gali turėti įtakos MTV formavimasis. *Cx26* ar *Cx30* funkcijos *LSCC* ląstelėse lieka neaiškios, bet jie irgi gali būti labai svarbūs tarpląstelinei sąveikai, nes atskirų jų kanalų laidumas (greičiausiai, ir kanalų skersmuo bei pralaidumas) yra didesnis už iš *Cx43* susidariusių PJ kanalų [24, 60, 127]. Be to, yra tikimybė, kad formuojasi heterotipinės *Cx43/Cx26* ar *Cx43/Cx30* PJ (įrodyta, kad bent jau *Cx43* ir *Cx30* yra suderinami [120]), kurios taip pat gali būti labai svarbios tiesioginiam ryšiui tarp ląstelių, nes *Cx26* ir *Cx30* puskanalių greituosius vartus atidaro teigiamai įtampa, o *Cx43* – neigiama. Todėl tiesioginis reguliuojamas nutolusių naviko ląstelių ryšys per tokius heterotipinius PJ kanalus gali būti labai reikšmingas: jeigu PJ sudarančių puskanalių vartus valdo priešingo poliš-

kumo įtampa, vieno poliškumo V_j gali atverti, o priešingo poliškumo – užverti abu puskanalius, dėl to susiformavus heterotipiniams PJ kanalams registruojama sigmoidinė g_T/V_T priklausomybė, o ne varpo formos kaip homotipinių PJ atveju (3.4.3.1 D ir 3.7.1 C pav.). Dauguma atvejų piktybinių navikų ląstelių ramybės potencialas gerokai mažesnis už normalių ląstelių ar fibroblastų [16], todėl, pavyzdžiui, iš *Cx43/Cx30* susidariusių heterotipinių PJ tarp piktybinio naviko ląstelių ir su piktybiniu naviku susijusių fibroblastų veiklą gali moduluoti membranos potencialas. Sumažėjęs membranos potencialas gali būti funkciškai susijęs su mechanizmais, kuriais onkogenų veikiamos ląstelės iš normalių virsta navikinėmis. Buvo pasiūlyta nauja navikų progresavimo stabdymo strategija, grindžiama membranos potencialo moduliavimu [31]. Dėl elektrinių signalų perdavimo asimetrijos nedidelis V_m pokytis vienoje iš ląstelių, susijungusių per MTV, gali moduluoti elektrinio signalo plitimo kryptį – tai jau buvo atskleista kitų heterotipinių PJ tarp susiglaudusių ląstelių atveju (apžvelgta [137]).

Kancerogenezės procese labai svarbūs yra fibroblastai. Jie dėl piktybinio naviko ląstelių parakrinio signalizavimo virsta su piktybiniu naviku susijusiais fibroblastais, kurie, manoma, sužadina naviko epitelio ląstelių transformaciją į mezenchimos ląsteles ir kartu su jomis išskiria įvairias tarpląstelinį užpildą ardančias medžiagas. Taip sukuriamos sąlygos naviko ląstelių invazijai [34, 35]. Vykstant šiems procesams, ląstelių sąveika per MTV gali būti efektyvesnė už parakarinį signalizavimą, ypač kai MTV sujungia naviko ląsteles su fibroblastais ar kamieninėmis ląstelėmis. Tikėtina, kad nutolusių ląstelių sąveika per MTV5 svarbi homeostazei palaikyti, o sąveika tarp piktybinio naviko ląstelių ir su piktybiniu naviku susijusių fibroblastų per MTV(2–4) – aprūpinant naviko ląsteles maisto ar energiją teikiančiomis medžiagomis ir netgi mitochondrijomis. Ši hipotezė atitinka neseniai paskelbtus duomenis apie tiesioginę mitochondrijų pernašą į piktybinio naviko ląsteles, esančias už didelio atstumo, ir jų atsparumo chemoterapijai apraiškomis [139]. Mitochondrijos yra labai svarbios piktybinių navikų progresavimui. Tačiau jų vaidmuo su piktybiniu naviku susijusiuose fibroblastuose ir piktybinio naviko ląstelėse skiriasi. Sanchez-Alvarez su bendradarbiais paskelbti duomenys rodo, kad, sutrikus su piktybiniu naviku susijusių fibroblastų mitochondrijų funkcijoms, naviko augimas skatinamas, o kai sutrinka epitelio navikų ląstelių mitochondrijų funkcijos, priešingai – naviko augimas slopinamas [162]. Naviko aplinkoje būna daug su piktybiniu naviku susijusių fibroblastų, makrofagų, endotelio, kitų ląstelių, kurios sąveikauja ne tik su tirpiaisiais citokinais bei augimo veiksniais, bet išskiria ir pūsleles (pvz., egzosomas ar onkosomas), kuriose gali būti ATF, baltymų ar *miRNA* [17]. Įrodyta, kad pūslelių pernašai per F aktino ir mikrotubulių turinčius MTV yra naudojama energija, o pati pernaša

priklauso nuo mikrotubulių motorinių baltymų (pvz., kinezinų) [139]. Mūsų eksperimentuose MTV spindyje buvo pastebėtos pūsleles su *DAPI* ir atskleista, kad per MTV yra pernešama *siRNA/AF488*. Taigi, *miRNA* ar *siRNA* gali būti tiesiogiai pernešamos į nutolusias ląsteles, sujungtas per MTV, o toks pernašos būdas yra daug greitesnis ir efektyvesnis už pinocitozės ar egzosomų formavimosi būdus. Be to, *siRNA* pernaša – tai ne paprasta difuzija: jai greičiausiai taip pat naudojama energija, tikėtina, kad čia svarbūs su mikrotubulėmis susiję motoriniai baltymai (pvz., kinezinai ir dineinai) [122] ir MTV besiformuojantys mitochondrijų tinklai, o ATF sintezės inhibitoriais ją galima nuslopinti [135, 201]. PJ gali ne stabdyti, o pačios praleisti *miRNA* ar *siRNA* [104, 189, 207], nes, nepaisant didelės jų molekulinės masės, šios mažosios RNR yra lazdelės pavidalo, o mažasis jų skersmuo yra artimas pernašą šiais kanalais ribojančiam PJ poros skersmeniui [188], todėl *miRNA* ar *siRNA* gali prasiskverbti didesnio skersmens PJ kanalais [20, 189]. Be to, PJ kanalai nėra paprasti cilindrai: dėl krūvį turinčių kanalo struktūrų sąveikos su krūvį turinčiomis pernešamo komponento dalimis jų skersmuo gali reikšmingai keistis [23], todėl šių kanalų pralaidumas labiau priklauso nuo pernešamos molekulės krūvio, o ne matmenų. Jau publikavus mūsų *LSCC* tyrimo duomenis, Virginijus Valiunas su bendradarbiais atskleidė, kad *siRNA* gali būti pernešama tarp susiglaudusių ląstelių per iš *Cx43* susidariusias PJ, bet nepraeina per PJ, kurios susidariusios iš *Cx26* ar *Cx32* [189]. Šie tyrėjai taip pat nustatė, kad per iš *Cx43* susidariusius PJ kanalus pernešta dvigubos grandinės *siRNA* gali slopinti genų raišką ląstelėje taikinyje [189].

Epitelio ląstelių transformacija į mezenchimos ir atvirkščiai (šis procesas gliomų ar krūties vėžio atvejais siejamas su pernelyg didele *Cx43* raiška ląstelėse [105, 119]) yra esminiai procesai, lemiantys piktybinių navikų metastazavimą, o panaudojus *miRNA* juos galima kontroliuoti ir atitaisyti [111]. Piktybiniais navikams gydyti gali būti taikomas specifinis genų slopinimas, bet įterpti egzogeninę *siRNA* į ląstelę taikinį yra didžiulė problema [20]. Žinoma, kad tarp ląstelių *miRNA* gali būti pernešama pūslelėse (egzosomose, ektosomose ir apoptozės kūneliuose), nuo pūslelių nepriklausoma forma, per sinapses ir PJ [126], tačiau tiesioginė pernaša per MTV būtų veiksmingiausias *siRNA* ar *miRNA* patekimo į nutolusią ląstelę taikinį būdas. Norint regeneruoti pažeistas ar ligos paveiktas ląsteles arba piktybiniais navikams gydyti [9, 13] kaip *siRNA* tiekimo sistemą galima naudoti mezenchimos kamienines ląsteles, nes jos nėra imunogeniškos [120], turi didelį proliferavimo potencialą, jose yra *Cx43* ir, kaip rodo mūsų tyrimai, tarp skirtingų tipų ląstelių (*HeLa* ir *LSCC* su *hMSC* ląstelėmis) susiformuoja funkcionalias PJ turintys MTV, per kuriuos reikiama *siRNA* į nutolusias ląsteles gali būti efektyviai pernešama tiesiogiai.

Tiriant Cx įtaką ląstelių gebai formuoti MTV ir judrumui, pastebėti šie svarbiausi ir visiškai nauji reiškiniai: 1) *Cx36 EGFP* skatina, o *Cx43 EGFP*, *Cx47* ir ypač *Cx45* slopina MTV formavimąsi tarp *HeLa* ląstelių, kuriose yra šių egzogeninių Cx; 2) *HeLa* ląstelės, kuriose yra *Cx36 EGFP* ar *Cx40 CFP*, yra judresnės už kitus Cx ekspresuojančias *HeLa* ar *HeLa* ląsteles be Cx.

Vienas iš ląstelių judėjimo ciklo etapų – nuo integrinų priklausomas sulipimas su substratu [140]. Mūsų tyrimuose pastebėta, kad Cx kaupiasi į lamelipodijas panašių išaugų galiukuose ir jų prisijungimo prie nutolusios ląstelės vietose. Tai gali rodyti, kad Cx gali būti susiję su sukibimo (adhezijos) ir standžiųjų jungčių baltymais, pavyzdžiui: jau žinoma, kad *Cx43* moduliuoja ląstelių migravimą, sąveikdamas su ląstelės receptoriais ir veikdamas su jais susijusį signalizavimą, ląstelės griaučių remodeliavimą ir sukeldamas dinامينius tubulino pokyčius [85]. Buvo pastebėta, kad *Cx43 EGFP*, *Cx45* ir *Cx47* mažina *HeLa* ląstelių judrumą, palyginti *HeLa* ląstelėmis be Cx. Įdomu tai, kad tarp tuos pačius Cx ekspresuojančių ląstelių susiformavo mažiau MTV, išskyrus *HeLa* ląsteles, kuriose buvo *Cx36 EGFP*, – tarp jų susiformavo daugiausiai MTV ir jos buvo judriausios. *Cx40 CFP* didino *HeLa* ląstelių judrumą, bet MTV skaičius tarp jų ar *HeLa* ląstelių be Cx nesiskyrė. Šie duomenys rodo, kad ląstelių judrumą ir MTV formavimąsi tikriausiai reguliuoja skirtingi mechanizmai, kuriuos skirtingi Cx gali veikti priešingai.

3.9. Rekomendacijos

Sąveikos tarp *LSCC* ląstelių per ilgus MTV apibūdinimas turėtų prisidėti ir paskatinti tolesnius piktybinių navikų tyrimus, atkreipiant dėmesį į šiuos dalykus: 1) sąveiką per MTV tarp piktybinio naviko ląstelių ir su piktybiniu naviku susijusių fibroblastų ar kamieninių ląstelių, įkaitant tiesioginę *siRNA* pernašą per MTV į nutolusias skirtingų tipų ląsteles ir genų raiškos moduliavimą jose; 2) regioninius MTV struktūrų bei įvairių Cx raiškos skirtumus navikų audiniuose, įskaitant jų parenchimą, strumą ir pereinamąją zonas, kuriose formuojantis piktybinio naviko metastazėms, gali būti svarbios heterotipinės PJ.

IŠVADOS

- 1) Ištirtas ir aprašytas MTV formavimasis tarp *LSCC* ląstelių ir jų savybės.
 - Nustatyti penki MTV formavimosi *in vitro* būdai.
 - Įrodyta ir aprašyta už didelių atstumų (iki 1 mm) esančių *LSCC* ląstelių geba palaikyti tiesioginį ryšį per įvairaus skersmens ir ilgio MTV, kurie gali būti atviri ar uždari arba turėti funkcionalias iš *Cx43* susidariusias PJ.
 - Tarp nutolusių *LSCC* ląstelių, kuriose yra natūralių *Cx43*, *in vitro* buvo pastebėti dviejų morfologinių tipų MTV: turintys vien F aktino bei turintys ir F aktino, ir mikrotubulių.
 - Kiekybiškai įvertintas elektrinis ryšys per MTV tarp nutolusių ląstelių: MTV1 paprastai buvo atviri vamzdeliai (t. y. neturėjo PJ), o MTV(2–5) turėjo PJ ir jų vidutinis elektrinis laidumas gerai koreliavo su MTV matmenimis bei labai priklausė nuo MTV esančių PJ funkcionalumo.
 - Kiekybiškai įvertintas MTV tarp nutolusių ląstelių pralaidumas, kuris priklausė nuo pernešamos medžiagos molekulinės masės ir krūvio bei nuo MTV esančių PJ funkcionalumo.
 - Įrodyta, kad *LSCC* ir *HeLa* ląstelės geba suformuoti MTV su žmogaus mezenchimos kamieninėmis ląstelėmis.
 - Atskleistas mitochondrijų ir genetinės medžiagos (*DAPI* žymėtų komponentų, *siRNA/AF488*) judėjimas MTV, turinčiais ir neturinčiais PJ, spindžiu bei aprašyti MTV spindyje susiformavę mitochondrijų tinklai.
 - Atskleista bei aprašyta tiesioginė genetinės medžiagos pernaša į nutolusias ląsteles per MTV, turinčius ir neturinčius PJ.
- 2) Nustatyta, kad *LSCC* audiniuose egzistuoja dviejų tipų į MTV panašios struktūros: turinčios tik F aktino bei turinčios ir F aktino, ir mikrotubulių.
- 3) MTV tarp *HeLa* ląstelių matmenys (ilgis, skersmuo) nepriklausė nuo ekspresuojamo *Cx* tipo. Nuo ekspresuojamo *Cx* tipo priklausė:
 - *HeLa* ląstelių judrumas: *HeLa* ląstelės, kuriose buvo *Cx36 EGFP* ir *Cx40*, buvo judresnės už kitus *Cx* ekspresuojančias *HeLa* ar *HeLa* ląsteles be *Cx*;
 - tarp *HeLa* ląstelių susiformavusių MTV tankis: *Cx36 EGFP* skatino, o *Cx43 EGFP*, *Cx47* ir ypač *Cx45* slopino MTV formavimąsi.

BIBLIOGRAFIJOS SĄRAŠAS

- [1] Aasen T. Connexins: junctional and non-junctional modulators of proliferation. *Cell Tissue Res* 2014;360(3):685-99.
- [2] Aasen T, Graham SV, Edward M, Hodgins MB. Reduced expression of multiple gap junction proteins is a feature of cervical dysplasia. *Mol Cancer* 2005;4(1):31.
- [3] Abounit S, Delage E, Zurzolo C. Identification and Characterization of Tunneling Nanotubes for Intercellular Trafficking. *Curr Protoc Cell Biol* 2015;67:12 0 1-21.
- [4] Abounit S, Zurzolo C. Wiring through tunneling nanotubes – from electrical signals to organelle transfer. *J Cell Sci* 2012;125(Pt 5):1089-98.
- [5] Aftab Q, Sin WC, Naus CC. Reduction in gap junction intercellular communication promotes glioma migration. *Oncotarget* 2015;6(13):11447-64.
- [6] Aggarwal A, Iemma TL, Shih I, Newsome TP, McAllery S, Cunningham AL, et al. Mobilization of HIV spread by diaphanous 2 dependent filopodia in infected dendritic cells. *PLoS Pathog* 2012;8(6):e1002762.
- [7] Agnati LF, Guidolin D, Baluska F, Leo G, Barlow PW, Carone C, et al. A new hypothesis of pathogenesis based on the divorce between mitochondria and their host cells: possible relevance for Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2010;7(4):307-22.
- [8] Ahmad T, Mukherjee S, Pattnaik B, Kumar M, Singh S, Kumar M, et al. Miro1 regulates intercellular mitochondrial transport & enhances mesenchymal stem cell rescue efficacy. *Embo J* 2014;33(9):994-1010.
- [9] Akyurekli C, Le Y, Richardson RB, Fergusson D, Tay J, Allan DS. A systematic review of preclinical studies on the therapeutic potential of mesenchymal stromal cell-derived microvesicles. *Stem Cell Rev* 2015;11(1):150-60.
- [10] Allbritton NL, Meyer T, Stryer L. Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Science* 1992;258(5089):1812-5.
- [11] Arkwright PD, Luchetti F, Tour J, Roberts C, Ayub R, Morales AP, et al. Fas stimulation of T lymphocytes promotes rapid intercellular exchange of death signals via membrane nanotubes. *Cell Res* 2010;20(1):72-88.

- [12] Austefjord MW, Gerdes HH, Wang X. Tunneling nanotubes: Diversity in morphology and structure. *Communicative & integrative biology* 2014;7(1):e27934.
- [13] Baglio SR, Pegtel DM, Baldini N. Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy. *Front Physiol* 2012;3:359.
- [14] Bar-Sagi D, Hall A. Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell* 2000;103(2):227-38.
- [15] Berridge MV, Dong L, Neuzil J. Mitochondrial DNA in Tumor Initiation, Progression, and Metastasis: Role of Horizontal mtDNA Transfer. *Cancer Res* 2015;75(16):3203-8.
- [16] Binggeli R, Cameron IL. Cellular potentials of normal and cancerous fibroblasts and hepatocytes. *Cancer Res* 1980;40(6):1830-5.
- [17] Bobrie A, Thery C. Unraveling the physiological functions of exosome secretion by tumors. *Oncoimmunology* 2013;2(1):e22565.
- [18] Bohil AB, Robertson BW, Cheney RE. Myosin-X is a molecular motor that functions in filopodia formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(33):12411-6.
- [19] Bravo-Cordero JJ, Hodgson L, Condeelis J. Directed cell invasion and migration during metastasis. *Curr Opin Cell Biol* 2012;24(2):277-83.
- [20] Brink PR, Valiunas V, Gordon C, Rosen MR, Cohen IS. Can gap junctions deliver? *Biochim Biophys Acta* 2012;1818(8):2076-81.
- [21] Brockmeyer P, Jung K, Perske C, Schliephake H, Hemmerlein B. Membrane connexin 43 acts as an independent prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2014;45(1):273-81.
- [22] Buchert M, Poon C, King JA, Baechi T, D'Abaco G, Hollande F, et al. AF6/s-afadin is a dual residency protein and localizes to a novel subnuclear compartment. *J Cell Physiol* 2007;210(1):212-23.
- [23] Bukauskas FF. Neurons and beta-cells of the pancreas express connexin36, forming gap junction channels that exhibit strong cationic selectivity. *J Membr Biol* 2012;245(5-6):243-53.
- [24] Bukauskas FF, Bukauskiene A, Bennett MV, Verselis VK. Gating properties of gap junction channels assembled from connexin43 and connexin43 fused with green fluorescent protein. *Biophys J* 2001; 81(1):137-52.
- [25] Bukoreshtliev NV, Wang X, Hodneland E, Gurke S, Barroso JF, Gerdes HH. Selective block of tunneling nanotube (TNT) formation inhibits intercellular organelle transfer between PC12 cells. *FEBS Lett* 2009;583(9):1481-8.
- [26] Burgoyne RD, Morgan A. Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev* 2003;83(2):581-632.

- [27] Burridge K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell* 2004;116(2):167-79.
- [28] Caneparo L, Pantazis P, Dempsey W, Fraser SE. Intercellular bridges in vertebrate gastrulation. *PloS one* 2011;6(5):e20230.
- [29] Castro MA, Grieneisen VA, de Almeida RM. Disruption and de novo formation of nanotubular membrane extensions in SW620 colon carcinoma cell line during cell division. *Cell Biol Int* 2005;29(11): 929-31.
- [30] Chauveau A, Aucher A, Eissmann P, Vivier E, Davis DM. Membrane nanotubes facilitate long-distance interactions between natural killer cells and target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(12):5545-50.
- [31] Chernet BT, Levin M. Transmembrane voltage potential is an essential cellular parameter for the detection and control of tumor development in a *Xenopus* model. *Dis Model Mech* 2013;6:595-607.
- [32] Chifflet S, Hernandez JA, Grasso S. A possible role for membrane depolarization in epithelial wound healing. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;288(6):C1420-30.
- [33] Chinnery HR, Pearlman E, McMenamin PG. Cutting edge: Membrane nanotubes in vivo: a feature of MHC class II⁺ cells in the mouse cornea. *J Immunol* 2008;180(9):5779-83.
- [34] Cirri P, Chiarugi P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am J Cancer Res* 2011;1(4):482-97.
- [35] Cirri P, Chiarugi P. Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 2012;31(1-2):195-208.
- [36] Costanzo M, Abounit S, Marzo L, Danckaert A, Chamoun Z, Roux P, et al. Transfer of polyglutamine aggregates in neuronal cells occurs in tunneling nanotubes. *J Cell Sci* 2013;126(Pt 16):3678-85.
- [37] Costanzo M, Zurzolo C. The cell biology of prion-like spread of protein aggregates: mechanisms and implication in neurodegeneration. *Biochem J* 2013;452(1):1-17.
- [38] Cottin S, Gould PV, Cantin L, Caruso M. Gap junctions in human glioblastomas: implications for suicide gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2011;18(9):674-81.
- [39] Crespin S, Bechberger J, Mesnil M, Naus CC, Sin WC. The carboxyterminal tail of connexin43 gap junction protein is sufficient to mediate cytoskeleton changes in human glioma cells. *Journal of cellular biochemistry* 2010;110(3):589-97.

- [40] Cronier L, Crespin S, Strale PO, Defamie N, Mesnil M. Gap junctions and cancer: new functions for an old story. *Antioxid Redox Signal* 2009;11(2):323-38.
- [41] Czyz J. The stage-specific function of gap junctions during tumourigenesis. *Cell Mol Biol Lett* 2008;13(1):92-102.
- [42] Davis DM, Sowinski S. Membrane nanotubes: dynamic long-distance connections between animal cells. *Nature reviews* 2008;9(6):431-6.
- [43] Defamie N, Chepied A, Mesnil M. Connexins, gap junctions and tissue invasion. *FEBS Lett* 2014;588(8):1331-8.
- [44] Desir S, Dickson EL, Vogel RI, Thayanithy V, Wong P, Teoh D, et al. Tunneling nanotube formation is stimulated by hypoxia in ovarian cancer cells. *Oncotarget* 2016.
- [45] Domhan S, Ma L, Tai A, Anaya Z, Beheshti A, Zeier M, et al. Intercellular communication by exchange of cytoplasmic material via tunneling nano-tube like structures in primary human renal epithelial cells. *PloS one* 2011;6(6):e21283.
- [46] Dubey GP, Ben-Yehuda S. Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell* 2011;144(4):590-600.
- [47] Elias LA, Turmaine M, Parnavelas JG, Kriegstein AR. Connexin 43 mediates the tangential to radial migratory switch in ventrally derived cortical interneurons. *J Neurosci* 2010;30(20):7072-7.
- [48] Elias LA, Wang DD, Kriegstein AR. Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature* 2007;448(7156):901-7.
- [49] Eugenin EA, Branes MC, Berman JW, Saez JC. TNF-alpha plus IFN-gamma induce connexin43 expression and formation of gap junctions between human monocytes/macrophages that enhance physiological responses. *J Immunol* 2003;170(3):1320-8.
- [50] Eugenin EA, Gaskill PJ, Berman JW. Tunneling nanotubes (TNT) are induced by HIV-infection of macrophages: a potential mechanism for intercellular HIV trafficking. *Cell Immunol* 2009;254(2):142-8.
- [51] Fevrier B, Raposo G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16(4):415-21.
- [52] Francis R, Xu X, Park H, Wei CJ, Chang S, Chatterjee B, et al. Connexin43 modulates cell polarity and directional cell migration by regulating microtubule dynamics. *PLoS* 2011;6(10):e26379. .
- [53] Friedl P, Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature reviews* 2009;10(7):445-57.
- [54] Fujimoto E, Sato H, Shirai S, Nagashima Y, Virgona N, Hagiwara K, et al. Inhibition of Src activity enhances the tumor-suppressive effect

- of the connexin 32 gene in Caki-1 renal cancer cells. *Oncol Rep* 2006;15(5):1359-65.
- [55] Gerdes HH, Bukoreshtliev NV, Barroso JF. Tunneling nanotubes: a new route for the exchange of components between animal cells. *FEBS Lett* 2007;581(11):2194-201.
 - [56] Gerdes HH, Carvalho RN. Intercellular transfer mediated by tunneling nanotubes. *Curr Opin Cell Biol* 2008;20(4):470-5.
 - [57] Gerdes HH, Rustom A, Wang X. Tunneling nanotubes, an emerging intercellular communication route in development. *Mech Dev* 2013.
 - [58] Gittes F, Mickey B, Nettleton J, Howard J. Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J Cell Biol* 1993;120(4):923-34.
 - [59] Goyal P, Behring A, Kumar A, Siess W. STK35L1 associates with nuclear actin and regulates cell cycle and migration of endothelial cells. *PloS one* 2011;6(1):e16249.
 - [60] González D, Gómez-Hernández JM, Barrio LC. Molecular basis of voltage dependence of connexin channels: an integrative appraisal. *Prog Biophys Mol Biol* 2007;94:66-106.
 - [61] Gousset K, Schiff E, Langevin C, Marijanovic Z, Caputo A, Browman DT, et al. Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread. *Nat Cell Biol* 2009;11(3):328-36.
 - [62] Gousset K, Zurzolo C. Tunnelling nanotubes: a highway for prion spreading? *Prion* 2009;3(2):94-8.
 - [63] Gurke S, Barroso JF, Hodneland E, Bukoreshtliev NV, Schlicker O, Gerdes HH. Tunneling nanotube (TNT)-like structures facilitate a constitutive, actomyosin-dependent exchange of endocytic organelles between normal rat kidney cells. *Exp Cell Res* 2008;314(20):3669-83.
 - [64] Han Y, Zhang PJ, Chen T, Yum SW, Pasha T, Furth EE. Connexin43 Expression Increases in the Epithelium and Stroma along the Colonic Neoplastic Progression Pathway: Implications for Its Oncogenic Role. *Gastroenterol Res Pract* 2011;2011:561719.
 - [65] Hase K, Kimura S, Takatsu H, Ohmae M, Kawano S, Kitamura H, et al. M-Sec promotes membrane nanotube formation by interacting with Ral and the exocyst complex. *Nat Cell Biol* 2009;11(12):1427-32.
 - [66] He K, Shi X, Zhang X, Dang S, Ma X, Liu F, et al. Long-distance intercellular connectivity between cardiomyocytes and cardiofibroblasts mediated by membrane nanotubes. *Cardiovasc Res* 2011;92(1):39-47.
 - [67] Hosoda T, Zheng H, Cabral-da-Silva M, Sanada F, Ide-Iwata N, Ogorek B, et al. Human cardiac stem cell differentiation is regulated by a mircrine mechanism. *Circulation* 2011;123(12):1287-96.

- [68] Hurtig J, Chiu DT, Onfelt B. Intercellular nanotubes: insights from imaging studies and beyond. *Wiley interdisciplinary reviews* 2010; 2(3):260-76.
- [69] Hwang JH, Smith CA, Salhia B, Rutka JT. The role of fascin in the migration and invasiveness of malignant glioma cells. *Neoplasia* 2008;10(2):149-59.
- [70] Inose T, Kato H, Kimura H, Faried A, Tanaka N, Sakai M, et al. Correlation between connexin 26 expression and poor prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2009;16(6): 1704-10.
- [71] Ionta M, Ferreira RA, Pfister SC, Machado-Santelli GM. Exogenous Cx43 expression decrease cell proliferation rate in rat hepatocarcinoma cells independently of functional gap junction. *Cancer Cell Int* 2009;9:22.
- [72] Islam MN, Das SR, Emin MT, Wei M, Sun L, Westphalen K, et al. Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nat Med* 2012; 18(5):759-65.
- [73] Yamane Y, Shiga H, Asou H, Haga H, Kawabata K, Abe K, et al. Dynamics of astrocyte adhesion as analyzed by a combination of atomic force microscopy and immuno-cytochemistry: the involvement of actin filaments and connexin 43 in the early stage of adhesion. *Arch Histol Cytol* 1999;62(4):355-61.
- [74] Yang C, Hoelzle M, Disanza A, Scita G, Svitkina T. Coordination of membrane and actin cytoskeleton dynamics during filopodia protrusion. *PloS one* 2009;4(5):e5678.
- [75] Yang H, Borg TK, Ma Z, Xu M, Wetzel G, Saraf LV, et al. Biochip-based study of unidirectional mitochondrial transfer from stem cells to myocytes via tunneling nanotubes. *Biofabrication* 2016;8(1):015012.
- [76] Yang Y, Karakhanova S, Hartwig W, D'Haese JG, Philippov PP, Werner J, et al. Mitochondria and Mitochondrial ROS in Cancer: Novel Targets for Anticancer Therapy. *J Cell Physiol* 2016;231(12): 2570-81.
- [77] Yilmaz M, Christofori G. Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Mol Cancer Res* 2010;8(5):629-42.
- [78] Jayo A, Parsons M. Fascin: a key regulator of cytoskeletal dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42(10):1614-7.
- [79] Jena BP. Role of SNAREs in membrane fusion. *Adv Exp Med Biol* 2011;713:13-32.

- [80] Jung SH, Park JY, Joo JH, Kim YM, Ha KS. Extracellular ultrathin fibers sensitive to intracellular reactive oxygen species: formation of intercellular membrane bridges. *Exp Cell Res* 2011;317(12):1763-73.
- [81] Kabaso D, Lokar M, Kralj-Iglic V, Veranic P, Iglic A. Temperature and cholera toxin B are factors that influence formation of membrane nanotubes in RT4 and T24 urothelial cancer cell lines. *Int J Nanomedicine* 2011;6:495-509.
- [82] Kadiu I, Gendelman HE. Human immunodeficiency virus type 1 endocytic trafficking through macrophage bridging conduits facilitates spread of infection. *J Neuroimmune Pharmacol* 2011;6(4):658-75.
- [83] Kadiu I, Gendelman HE. Macrophage bridging conduit trafficking of HIV-1 through the endoplasmic reticulum and Golgi network. *J Proteome Res* 2011b;10(7):3225-38.
- [84] Kalra J, Shao Q, Qin H, Thomas T, Alaoui-Jamali MA, Laird DW. Cx26 inhibits breast MDA-MB-435 cell tumorigenic properties by a gap junctional intercellular communication-independent mechanism. *Carcinogenesis* 2006;27(12):2528-37.
- [85] Kameritsch P, Pogoda K, Pohl U. Channel-independent influence of connexin 43 on cell migration. *Biochim Biophys Acta* 2012;1818(8):1993-2001.
- [86] Katakowski M, Buller B, Wang X, Rogers T, Chopp M. Functional microRNA is transferred between glioma cells. *Cancer Res* 2010;70(21):8259-63.
- [87] Kerber ML, Cheney RE. Myosin-X: a MyTH-FERM myosin at the tips of filopodia. *J Cell Sci* 2011;124(Pt 22):3733-41.
- [88] Kimura S, Hase K, Ohno H. Tunneling nanotubes: emerging view of their molecular components and formation mechanisms. *Exp Cell Res* 2012;318(14):1699-706.
- [89] Kimura S, Hase K, Ohno H. The molecular basis of induction and formation of tunneling nanotubes. *Cell Tissue Res* 2013;352(1):67-76.
- [90] Kizana E, Cingolani E, Marban E. Non-cell-autonomous effects of vector-expressed regulatory RNAs in mammalian heart cells. *Gene Ther* 2009;16(9):1163-8.
- [91] Kyo N, Yamamoto H, Takeda Y, Ezumi K, Ngan CY, Terayama M, et al. Overexpression of connexin 26 in carcinoma of the pancreas. *Oncol Rep* 2008;19(3):627-31.
- [92] Klein IK, Predescu DN, Sharma T, Knezevic I, Malik AB, Predescu S. Intersectin-2L regulates caveola endocytosis secondary to Cdc42-mediated actin polymerization. *J Biol Chem* 2009;284(38):25953-61.
- [93] Koyanagi M, Brandes RP, Haendeler J, Zeiher AM, Dimmeler S. Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac

- myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes? *Circ Res* 2005;96(10):1039-41.
- [94] Kozlov MM, Chernomordik LV. Membrane tension and membrane fusion. *Curr Opin Struct Biol* 2015;33:61-7.
 - [95] Kukat C, Wurm CA, Spahr H, Falkenberg M, Larsson NG, Jakobs S. Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(33):13534-9.
 - [96] Laird DW. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J* 2006;394(Pt 3):527-43.
 - [97] Langosch D, Hofmann M, Ungermann C. The role of transmembrane domains in membrane fusion. *Cell Mol Life Sci* 2007;64(7-8):850-64.
 - [98] Lee HK, Finniss S, Cazacu S, Bucris E, Ziv-Av A, Xiang C, et al. Mesenchymal stem cells deliver synthetic microRNA mimics to glioma cells and glioma stem cells and inhibit their cell migration and self-renewal. *Oncotarget* 2013;4(2):346-61.
 - [99] Lee JY. New and old roles of plasmodesmata in immunity and parallels to tunneling nanotubes. *Plant Sci* 2014;221-222:13-20.
 - [100] Lehmann MJ, Sherer NM, Marks CB, Pypaert M, Mothes W. Actin- and myosin-driven movement of viruses along filopodia precedes their entry into cells. *J Cell Biol* 2005;170(2):317-25.
 - [101] Levin M. Large-scale biophysics: ion flows and regeneration. *Trends in cell biology* 2007;17(6):261-70.
 - [102] Li Q, Omori Y, Nishikawa Y, Yoshioka T, Yamamoto Y, Enomoto K. Cytoplasmic accumulation of connexin32 protein enhances motility and metastatic ability of human hepatoma cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 2007;121(3):536-46.
 - [103] Lim YS, Tang BL. Intercellular organelle trafficking by membranous nanotube connections: a possible new role in cellular rejuvenation? *Cell Commun Adhes* 2012;19(3-4):39-44.
 - [104] Lim PK, Bliss SA, Patel SA, Tabora M, Dave MA, Gregory LA, et al. Gap junction-mediated import of microRNA from bone marrow stromal cells can elicit cell cycle quiescence in breast cancer cells. *Cancer Res* 2011;71(5):1550-60.
 - [105] Lin JH, Takano T, Cotrina ML, Arcuino G, Kang J, Liu S, et al. Connexin 43 enhances the adhesivity and mediates the invasion of malignant glioma cells. *J Neurosci* 2002;22(11):4302-11.
 - [106] Liu K, Ji K, Guo L, Wu W, Lu H, Shan P, et al. Mesenchymal stem cells rescue injured endothelial cells in an in vitro ischemia-reperfusion model via tunneling nanotube like structure-mediated mitochondrial transfer. *Microvasc Res* 2014.

- [107] Lokar M, Iglic A, Veranic P. Protruding membrane nanotubes: attachment of tubular protrusions to adjacent cells by several anchoring junctions. *Protoplasma* 2010;246(1-4):81-7.
- [108] Lou E. Intercellular conduits in tumours: the new social network. *Trends Cancer* 2016;2(1):3-5.
- [109] Lou E, Fujisawa S, Barlas A, Romin Y, Manova-Todorova K, Moore MA, et al. Tunneling Nanotubes: A new paradigm for studying intercellular communication and therapeutics in cancer. *Communicative & integrative biology* 2012;5(4):399-403.
- [110] Lou E, Fujisawa S, Morozov A, Barlas A, Romin Y, Dogan Y, et al. Tunneling nanotubes provide a unique conduit for intercellular transfer of cellular contents in human malignant pleural mesothelioma. *PloS one* 2012;7(3):e33093.
- [111] Lu M, Jolly MK, Levine H, Onuchic JN, Ben-Jacob E. MicroRNA-based regulation of epithelial-hybrid-mesenchymal fate determination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(45):18144-9.
- [112] Machtaler S, Dang-Lawson M, Choi K, Jang C, Naus CC, Matsuuchi L. The gap junction protein Cx43 regulates B-lymphocyte spreading and adhesion. *J Cell Sci* 2011;124(Pt 15):2611-21.
- [113] Margineantu DH, Gregory Cox W, Sundell L, Sherwood SW, Beechem JM, Capaldi RA. Cell cycle dependent morphology changes and associated mitochondrial DNA redistribution in mitochondria of human cell lines. *Mitochondrion* 2002;1(5):425-35.
- [114] Martens S, McMahon HT. Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nature reviews* 2008;9(7):543-56.
- [115] Martin P, Parkhurst SM. Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. *Development* 2004;131(13):3021-34.
- [116] Marzo L, Gousset K, Zurzolo C. Multifaceted roles of tunneling nanotubes in intercellular communication. *Front Physiol* 2012;3:72.
- [117] Masuzawa A, Black KM, Pacak CA, Ericsson M, Barnett RJ, Drumm C, et al. Transplantation of autologously derived mitochondria protects the heart from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013;304(7):H966-82.
- [118] McLachlan E, Shao Q, Laird DW. Connexins and gap junctions in mammary gland development and breast cancer progression. *J Membr Biol* 2007;218(1-3):107-21.
- [119] McLachlan E, Shao Q, Wang HL, Langlois S, Laird DW. Connexins act as tumor suppressors in three-dimensional mammary cell organoids by regulating differentiation and angiogenesis. *Cancer Res* 2006;66(20):9886-94.

- [120] McTaggart SJ, Atkinson K. Mesenchymal stem cells: immunobiology and therapeutic potential in kidney disease. *Nephrology (Carlton)* 2007;12(1):44-52.
- [121] Mesnil M, Crespín S, Avanzo JL, Zaidan-Dagli ML. Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. *Biochim Biophys Acta* 2005;1719(1-2):125-45.
- [122] Mi L, Xiong R, Zhang Y, Yang W, XChen J-Y, Wang P-N. Microscopic observation of the intercellular transport of CdTe quantum dot aggregates through tunneling-nanotubes. *J Biomat Nanobiotech* 2011;2(2):172-9.
- [123] Miyazawa K, Emmerling K, Manuelidis L. Proliferative arrest of neural cells induces prion protein synthesis, nanotube formation, and cell-to-cell contacts. *Journal of cellular biochemistry* 2010;111(1): 239-47.
- [124] Mineo M, Garfield SH, Taverna S, Flugy A, De Leo G, Alessandro R, et al. Exosomes released by K562 chronic myeloid leukemia cells promote angiogenesis in a Src-dependent fashion. *Angiogenesis* 2012; 15(1):33-45.
- [125] Minuth WW, Denk L. Cell Projections and Extracellular Matrix Cross the Interstitial Interface within the Renal Stem/Progenitor Cell Niche: Accidental, Structural or Functional Cues? *Nephron Exp Nephrol* 2013;122(3-4):131-40.
- [126] Mittelbrunn M, Sanchez-Madrid F. Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nature reviews* 2012;13(5):328-35.
- [127] Moreno AP, Rook MB, Fishman GI, Spray DC. Gap junction channels: distinct voltage-sensitive and - insensitive conductance states. *Biophys J* 1994;67:113-9.
- [128] Morris LG, Veeriah S, Chan TA. Genetic determinants at the interface of cancer and neurodegenerative disease. *Oncogene* 2010;29(24): 3453-64.
- [129] Mukerji J, Olivieri KC, Misra V, Agopian KA, Gabuzda D. Proteomic analysis of HIV-1 Nef cellular binding partners reveals a role for exocyst complex proteins in mediating enhancement of intercellular nanotube formation. *Retrovirology* 2012;9:33.
- [130] Naus CC, Laird DW. Implications and challenges of connexin connections to cancer. *Nat Rev Cancer* 2010;10(6):435-41.
- [131] Nielsen MS, Axelsen LN, Sorgen PL, Verma V, Delmar M, Holstein-Rathlou NH. Gap junctions. *Compr Physiol* 2012;2(3):1981-2035.
- [132] Nikolic DS, Lehmann M, Felts R, Garcia E, Blanchet FP, Subramaniam S, et al. HIV-1 activates Cdc42 and induces membrane

- extensions in immature dendritic cells to facilitate cell-to-cell virus propagation. *Blood* 2011;118(18):4841-52.
- [133] Nobile C, Rudnicka D, Hasan M, Aulner N, Porrot F, Machu C, et al. HIV-1 Nef inhibits ruffles, induces filopodia, and modulates migration of infected lymphocytes. *J Virol* 2010;84(5):2282-93.
 - [134] Ohno H, Hase K, Kimura S. M-Sec: Emerging secrets of tunneling nanotube formation. *Communicative & integrative biology* 2010;3(3): 231-3.
 - [135] Onfelt B, Nedvetzki S, Benninger RK, Purbhoo MA, Sowinski S, Hume AN, et al. Structurally distinct membrane nanotubes between human macrophages support long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria. *J Immunol* 2006;177(12):8476-83.
 - [136] Onfelt B, Nedvetzki S, Yanagi K, Davis DM. Cutting edge: Membrane nanotubes connect immune cells. *J Immunol* 2004;173(3): 1511-3.
 - [137] Palacios-Prado N, Bukauskas FF. Modulation of metabolic communication through gap junction channels by transjunctional voltage; synergistic and antagonistic effects of gating and ionophoresis. *Biochim Biophys Acta* 2012;1818(8):1884-94.
 - [138] Pascoal P, Kosanic D, Gjoni M, Vogel H. Membrane nanotubes drawn by optical tweezers transmit electrical signals between mammalian cells over long distances. *Lab Chip* 2010;10(17):2235-41.
 - [139] Pasquier J, Guerrouahen BS, Al Thawadi H, Ghiabi P, Maleki M, Abu-Kaoud N, et al. Preferential transfer of mitochondria from endothelial to cancer cells through tunneling nanotubes modulates chemoresistance. *J Transl Med* 2013;11:94.
 - [140] Petrie RJ, Doyle AD, Yamada KM. Random versus directionally persistent cell migration. *Nature reviews* 2009;10(8):538-49.
 - [141] Piehl M, Lehmann C, Gumpert A, Denizot JP, Segretain D, Falk MM. Internalization of large double-membrane intercellular vesicles by a clathrin-dependent endocytic process. *Mol Biol Cell* 2007;18(2):337-47.
 - [142] Plante I, Stewart MK, Barr K, Allan AL, Laird DW. Cx43 suppresses mammary tumor metastasis to the lung in a Cx43 mutant mouse model of human disease. *Oncogene* 2011;30(14):1681-92.
 - [143] Plotnikov EY, Khryapenkova TG, Galkina SI, Sukhikh GT, Zorov DB. Cytoplasm and organelle transfer between mesenchymal multipotent stromal cells and renal tubular cells in co-culture. *Exp Cell Res* 2010;316(15):2447-55.

- [144] Pontes B, Viana NB, Campanati L, Farina M, Neto VM, Nussenzveig HM. Structure and elastic properties of tunneling nanotubes. *Eur Biophys J* 2008;37(2):121-9.
- [145] Prochnow N, Dermietzel R. Connexons and cell adhesion: a romantic phase. *Histochemistry and cell biology* 2008;130(1):71-7.
- [146] Puzzo L, Caltabiano R, Parenti R, Trapasso S, Allegra E. Connexin 43 (Cx43) Expression in Laryngeal Squamous Cell Carcinomas: Preliminary Data on Its Possible Prognostic Role. *Head Neck Pathol* 2016;10(3):292-7.
- [147] Rakic P. Developmental and evolutionary adaptations of cortical radial glia. *Cereb Cortex* 2003;13(6):541-9.
- [148] Ralph SJ, Rodriguez-Enriquez S, Neuzil J, Saavedra E, Moreno-Sanchez R. The causes of cancer revisited: "mitochondrial malignancy" and ROS-induced oncogenic transformation - why mitochondria are targets for cancer therapy. *Mol Aspects Med* 2010;31(2):145-70.
- [149] Ranzinger J, Rustom A, Abel M, Leyh J, Kihm L, Witkowski M, et al. Nanotube action between human mesothelial cells reveals novel aspects of inflammatory responses. *PloS one* 2011;6(12):e29537.
- [150] Rash BG, Ackman JB, Rakic P. Bidirectional radial Ca(2+) activity regulates neurogenesis and migration during early cortical column formation. *Sci Adv* 2016;2(2):e1501733.
- [151] Ridley AJ. Life at the leading edge. *Cell* 2011;145(7):1012-22.
- [152] Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature reviews* 2008;9(5):402-12.
- [153] Rosich L, Montraveta A, Xargay-Torrent S, Lopez-Guerra M, Roldan J, Aymerich M, et al. Dual PI3K/mTOR inhibition is required to effectively impair microenvironment survival signals in mantle cell lymphoma. *Oncotarget* 2014;5(16):6788-800.
- [154] Rozentel R, Srinivas M, Gokhan S, Urban M, Dermietzel R, Kessler JA, et al. Temporal expression of neuronal connexins during hippocampal ontogeny. *Brain Res Brain Res Rev* 2000;32(1):57-71.
- [155] Rudnicka D, Feldmann J, Porrot F, Wietgreffe S, Guadagnini S, Prevost MC, et al. Simultaneous cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus to multiple targets through polysynapses. *J Virol* 2009;83(12):6234-46.
- [156] Rupp I, Sologub L, Williamson KC, Scheuermayer M, Reininger L, Doerig C, et al. Malaria parasites form filamentous cell-to-cell connections during reproduction in the mosquito midgut. *Cell Res* 2011;21(4):683-96.

- [157] Rustom A. The missing link: does tunnelling nanotube-based supercellularity provide a new understanding of chronic and lifestyle diseases? *Open Biol* 2016;6(6).
- [158] Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* 2004;303(5660):1007-10.
- [159] Saito T, Nishimura M, Kudo R, Yamasaki H. Suppressed gap junctional intercellular communication in carcinogenesis of endometrium. *Int J Cancer* 2001;93(3):317-23.
- [160] Salas-Vidal E, Lomeli H. Imaging filopodia dynamics in the mouse blastocyst. *Dev Biol* 2004;265(1):75-89.
- [161] Salter RD, Watkins SC. Dynamic properties of antigen uptake and communication between dendritic cells. *Immunol Res* 2006;36(1-3): 211-20.
- [162] Sanchez-Alvarez R, Martinez-Outschoorn UE, Lamb R, Hult J, Howell A, Gandara R, et al. Mitochondrial dysfunction in breast cancer cells prevents tumor growth: understanding chemoprevention with metformin. *Cell Cycle* 2013;12(1):172-82.
- [163] Sarma V, Wolf FW, Marks RM, Shows TB, Dixit VM. Cloning of a novel tumor necrosis factor-alpha-inducible primary response gene that is differentially expressed in development and capillary tube-like formation in vitro. *J Immunol* 1992;148(10):3302-12.
- [164] Sato H, Fukumoto K, Hada S, Hagiwara H, Fujimoto E, Negishi E, et al. Enhancing effect of connexin 32 gene on vinorelbine-induced cytotoxicity in A549 lung adenocarcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007;60(3):449-57.
- [165] Schertzer JW, Whiteley M. Microbial communication superhighways. *Cell* 2011;144(4):469-70.
- [166] Schiel JA, Childs C, Prekeris R. Endocytic transport and cytokinesis: from regulation of the cytoskeleton to midbody inheritance. *Trends in cell biology* 2013;23(7):319-27.
- [167] Schiller C, Diakopoulos KN, Rohwedder I, Kremmer E, von Toerne C, Ueffing M, et al. LST1 promotes the assembly of a molecular machinery responsible for tunneling nanotube formation. *J Cell Sci* 2013;126:767-77.
- [168] Schneider B, Teschner M, Sudermann T, Pikula B, Lautermann J. Expression of gap junction proteins (connexin 26, 30, 32, 43) in normal mucosa, hyperkeratosis and carcinoma of the human larynx. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2002;64(5):324-9.

- [169] Scholkmann F. Long range physical cell-to-cell signalling via mitochondria inside membrane nanotubes: a hypothesis. *Theor Biol Med Model* 2016;13(1):16.
- [170] Seyed-Razavi Y, Hickey MJ, Kuffova L, McMenamin PG, Chinnery HR. Membrane nanotubes in myeloid cells in the adult mouse cornea represent a novel mode of immune cell interaction. *Immunol Cell Biol* 2013;91(1):89-95.
- [171] Sherer NM, Lehmann MJ, Jimenez-Soto LF, Horensavitz C, Pypaert M, Mothes W. Retroviruses can establish filopodial bridges for efficient cell-to-cell transmission. *Nat Cell Biol* 2007;9(3):310-5.
- [172] Sherer NM, Mothes W. Cytonemes and tunneling nanotubules in cell-cell communication and viral pathogenesis. *Trends in cell biology* 2008;18(9):414-20.
- [173] Simpson I, Rose B, Loewenstein WR. Size limit of molecules permeating the junctional membrane channels. *Science* 1977;195:294-6.
- [174] Sin WC, Crespín S, Mesnil M. Opposing roles of connexin43 in glioma progression. *Biochim Biophys Acta* 2012;1818(8):2058-67.
- [175] Singh SK, Kurfurst R, Nizard C, Schnebert S, Perrier E, Tobin DJ. Melanin transfer in human skin cells is mediated by filopodia – a model for homotypic and heterotypic lysosome-related organelle transfer. *Faseb J* 2010;24(10):3756-69.
- [176] Sirnes S, Bruun J, Kolberg M, Kjenseth A, Lind GE, Svindland A, et al. Connexin43 acts as a colorectal cancer tumor suppressor and predicts disease outcome. *Int J Cancer* 2012;131(3):570-81.
- [177] Sisakhtnezhad S, Khosravi L. Emerging physiological and pathological implications of tunneling nanotubes formation between cells. *Eur J Cell Biol* 2015.
- [178] Smith IF, Shuai J, Parker I. Active generation and propagation of Ca²⁺ signals within tunneling membrane nanotubes. *Biophys J* 2011;100(8):L37-9.
- [179] Sohl G, Maxeiner S, Willecke K. Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:191-200.
- [180] Sowinski S, Alakoskela JM, Jolly C, Davis DM. Optimized methods for imaging membrane nanotubes between T cells and trafficking of HIV-1. *Methods* 2011;53(1):27-33.
- [181] Sowinski S, Jolly C, Berninghausen O, Purbhoo MA, Chauveau A, Kohler K, et al. Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. *Nat Cell Biol* 2008;10(2):211-9.

- [182] Spees JL, Olson SD, Whitney MJ, Prockop DJ. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(5):1283-8.
- [183] Sun X, Wang Y, Zhang J, Tu J, Wang XJ, Su XD, et al. Tunneling-nanotube direction determination in neurons and astrocytes. *Cell Death Dis* 2012;3:e438.
- [184] Takahashi A, Kukita A, Li YJ, Zhang JQ, Nomiyama H, Yamaza T, et al. Tunneling nanotube formation is essential for the regulation of osteoclastogenesis. *Journal of cellular biochemistry* 2013;114(6): 1238-47.
- [185] Tang BL. MIRO GTPases in Mitochondrial Transport, Homeostasis and Pathology. *Cells* 2015;5(1).
- [186] Teddy JM, Kulesa PM. In vivo evidence for short- and long-range cell communication in cranial neural crest cells. *Development* 2004; 131(24):6141-51.
- [187] Umhauer S, Ruch RJ, Fanning J. Gap junctional intercellular communication and connexin 43 expression in ovarian carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182(5):999-1000.
- [188] Valiunas V, Polosina YY, Miller H, Potapova IA, Valiuniene L, Doronin S, et al. Connexin-specific cell-to-cell transfer of short interfering RNA by gap junctions. *J Physiol* 2005;568(Pt 2):459-68.
- [189] Valiunas V, Wang HZ, Li L, Gordon C, Valiuniene L, Cohen IS, et al. A comparison of two cellular delivery mechanisms for small interfering RNA. *Physiol Rep* 2015;3(2).
- [190] Vallabhaneni KC, Haller H, Dumler I. Vascular smooth muscle cells initiate proliferation of mesenchymal stem cells by mitochondrial transfer via tunneling nanotubes. *Stem Cells Dev* 2012;21(17):3104-13.
- [191] Van Prooyen N, Gold H, Andresen V, Schwartz O, Jones K, Ruscetti F, et al. Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(48):20738-43.
- [192] Veranic P, Lokar M, Schutz GJ, Weghuber J, Wieser S, Hagerstrand H, et al. Different types of cell-to-cell connections mediated by nanotubular structures. *Biophys J* 2008;95(9):4416-25.
- [193] Vidulescu C, Clejan S, O'Connor K C. Vesicle traffic through intercellular bridges in DU 145 human prostate cancer cells. *J Cell Mol Med* 2004;8(3):388-96.
- [194] Wang H, Duan L, Zou Z, Li H, Yuan S, Chen X, et al. Activation of the PI3K/Akt/mTOR/p70S6K pathway is involved in S100A4-induced

- viability and migration in colorectal cancer cells. *Int J Med Sci* 2014;11(8):841-9.
- [195] Wang Y, Cui J, Sun X, Zhang Y. Tunneling-nanotube development in astrocytes depends on p53 activation. *Cell Death Differ* 2011;18(4):732-42.
- [196] Wang T, Xu Z, Jiang W, Ma A. Cell-to-cell contact induces mesenchymal stem cell to differentiate into cardiomyocyte and smooth muscle cell. *Int J Cardiol* 2006;109(1):74-81.
- [197] Wang X, Bukoreshtliev NV, Gerdes HH. Developing neurons form transient nanotubes facilitating electrical coupling and calcium signaling with distant astrocytes. *PloS one* 2012;7(10):e47429.
- [198] Wang X, Gerdes HH. Long-distance electrical coupling via tunneling nanotubes. *Biochim Biophys Acta* 2012.
- [199] Wang X, Gerdes HH. Transfer of mitochondria via tunneling nanotubes rescues apoptotic PC12 cells. *Cell Death Differ* 2015;22(7):1181-91.
- [200] Wang X, Veruki ML, Bukoreshtliev NV, Hartveit E, Gerdes HH. Animal cells connected by nanotubes can be electrically coupled through interposed gap-junction channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(40):17194-9.
- [201] Wang ZG, Liu SL, Tian ZQ, Zhang ZL, Tang HW, Pang DW. Myosin-driven intercellular transportation of wheat germ agglutinin mediated by membrane nanotubes between human lung cancer cells. *ACS Nano* 2012;6(11):10033-41.
- [202] Watkins SC, Salter RD. Functional connectivity between immune cells mediated by tunneling nanotubules. *Immunity* 2005;23(3):309-18.
- [203] Wilgenbus KK, Kirkpatrick CJ, Knuechel R, Willecke K, Traub O. Expression of Cx26, Cx32 and Cx43 gap junction proteins in normal and neoplastic human tissues. *Int J Cancer* 1992;51(4):522-9.
- [204] Willenberg HS, Schott M, Saeger W, Tries A, Scherbaum WA, Bornstein SR. Expression of connexins in chromaffin cells of normal human adrenals and in benign and malignant pheochromocytomas. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1073:578-83.
- [205] Wittig D, Wang X, Walter C, Gerdes HH, Funk RH, Roehlecke C. Multi-level communication of human retinal pigment epithelial cells via tunneling nanotubes. *PloS one* 2012;7(3):e33195.
- [206] Wolf FW, Sarma V, Seldin M, Drake S, Suchard SJ, Shao H, et al. B94, a primary response gene inducible by tumor necrosis factor- α , is expressed in developing hematopoietic tissues and the sperm acrosome. *J Biol Chem* 1994;269(5):3633-40.

- [207] Wolvetang EJ, Pera MF, Zuckerman KS. Gap junction mediated transport of shRNA between human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;363(3):610-5.
- [208] Wood W, Jacinto A, Grose R, Woolner S, Gale J, Wilson C, et al. Wound healing recapitulates morphogenesis in *Drosophila* embryos. *Nat Cell Biol* 2002;4(11):907-12.
- [209] Xu HT, Li QC, Zhang YX, Zhao Y, Liu Y, Yang ZQ, et al. Connexin 43 recruits E-cadherin expression and inhibits the malignant behaviour of lung cancer cells. *Folia Histochem Cytobiol* 2008;46(3):315-21.
- [210] Xu W, Santini PA, Sullivan JS, He B, Shan M, Ball SC, et al. HIV-1 evades virus-specific IgG2 and IgA responses by targeting systemic and intestinal B cells via long-range intercellular conduits. *Nat Immunol* 2009;10(9):1008-17.
- [211] Xu X, Li WE, Huang GY, Meyer R, Chen T, Luo Y, et al. Modulation of mouse neural crest cell motility by N-cadherin and connexin 43 gap junctions. *Journal of Cell Biology* 2001;154(1):217-30.
- [212] Xue G, Hemmings BA. PKB/Akt-dependent regulation of cell motility. *J Natl Cancer Inst* 2013;105(6):393-404.
- [213] Zaccard CR, Rinaldo CR, Mailliard RB. Linked in: immunologic membrane nanotube networks. *J Leukoc Biol* 2016;100(1):81-94.
- [214] Zani BG, Edelman ER. Cellular bridges: Routes for intercellular communication and cell migration. *Communicative & integrative biology* 2010;3(3):215-20.
- [215] Zani BG, Indolfi L, Edelman ER. Tubular bridges for bronchial epithelial cell migration and communication. *PloS one* 2010;5(1): 0008930.
- [216] Zhang D, Chen C, Li Y, Fu X, Xie Y, Li Y, et al. Cx31.1 acts as a tumour suppressor in non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines through inhibition of cell proliferation and metastasis. *J Cell Mol Med* 2012;16(5):1047-59.
- [217] Zhang J, Zhang Y. Membrane nanotubes: novel communication between distant cells. *Sci China Life Sci* 2013;56(11):994-9.
- [218] Zhang W, Li HG, Fan MJ, Lv ZQ, Shen XM, He XX. Expressions of connexin 32 and 26 and their correlation to prognosis of non-small cell lung cancer. *Ai Zheng* 2009;28(2):173-6.
- [219] Zhao M, Song B, Pu J, Wada T, Reid B, Tai G, et al. Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-gamma and PTEN. *Nature* 2006;442(7101):457-60.
- [220] Zhou JZ, Jiang JX. Gap junction and hemichannel-independent actions of connexins on cell and tissue functions – an update. *FEBS Lett* 2014;588(8):1186-92.

- [221] Zhu D, Tan KS, Zhang X, Sun AY, Sun GY, Lee JC. Hydrogen peroxide alters membrane and cytoskeleton properties and increases intercellular connections in astrocytes. *J Cell Sci* 2005;118(Pt 16): 3695-703.
- [222] Zhu S, Victoria GS, Marzo L, Ghosh R, Zurzolo C. Prion aggregates transfer through tunneling nanotubes in endocytic vesicles. *Prion* 2015;9(2):125-35.

MOKSLINĖS PUBLIKACIJOS

Publikacijos disertacijos tema duomenų bazėje *Thomson Reuters Web of Knowledge* referuojamuose ir citavimo rodiklį turinčiuose leidiniuose

- [223] Antanavičiūtė I, Rysevaitė K, Liutkevičius V, Marandykina A, Rimkutė L, **Sveikatiėnė R**, Ulozas V, Skeberdis VA. Long-distance communication between laryngeal carcinoma cells. *PloS one* 2014; 9(6):e99196. Prieiga per internetą:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24945745>
- [224] Rimkute L, Jotautis V, Marandykina A, **Sveikatiene R**, Antanaviciute I, Skeberdis VA. The role of neural connexins in HeLa cell mobility and intercellular communication through tunneling tubes. *BMC cell biology* 2016;17(1):3. Prieiga per internetą:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4710989/>

Kitos publikacijos duomenų bazėje *Thomson Reuters Web of Knowledge* referuojamuose ir citavimo rodiklį turinčiuose leidiniuose

1. Gumbrevičius G, Sveikata A, **Sveikatiėnė R**, Stankevičius E. Paracetamol and simvastatin: a potential interaction resulting in hepatotoxicity. *Medicina* 2012;48(7):379-381.
2. Čepulienė R, **Sveikatiėnė R**, Gutauskas K, Vanagienė V. Factors Influencing Women's Preference to Select a Combined Hormonal Contraceptive Method: A Cross-Sectional Survey in Lithuania. *Medicina* 2012;48(8):424-430.

Pranešimai mokslo konferencijose ir tezės konferencijų leidiniuose

1. Antanavičiūtė I, Rimkutė L, **Sveikatiėnė R**, Skeberdis VA. Communication of remote tumor cells through the membranous tunneling tubes. Abstracts from the Joint Meeting of the Federation of European Physiological Societies and the Baltic Physiological Societies: Kaunas, Lithuania, 26–29 August 2015. Stockholm, John Wiley & Sons Ltd. 2015;215:36–36. Prieiga per internetą:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/apha.12626/epdf/>
2. Svitojūtė E, Šilgalienė M, Simaitienė M, Nadišauskienė RJ, Stankevičius E, **Sveikatiėnė R**, Sveikata A. Dismenorėjos pasireiškimo,

rizikos veiksnių ir savigydos įvertinimas. VIII nacionalinės doktorantų mokslinės konferencijos „Mokslas – sveikatai“ konferencijos pranešimų tezės. 2015 m. balandžio 10 d., Kaunas / Lietuvos sveikatos mokslų universitetas. Kaunas, Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Leidybos namai 2015:146-147.

3. **Sveikatiėnė R**, Rimkutė L, Jotautis V, Antanavičiūtė I, Skeberdis VA. Koneksinų įtaka HeLa ląstelių judrumui ir tarpląstelinei sąveikai per membraninius tunelinius vamzdelius. VIII nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija „Mokslas – sveikatai“ konferencijos pranešimų tezės. 2015 m. balandžio 10 d., Kaunas / Lietuvos sveikatos mokslų universitetas. Kaunas, Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Leidybos namai 2015:30-31.
4. **Sveikatiėnė R**, Antanavičiūtė I, Rimkutė L, Skeberdis VA. The Role of different connexins in formation of tunneling tubes and transfer of siRNA between remote HeLa cells. Acta Physiologica, Abstracts from the Joint Meeting of the Federation of European Physiological Societies and the Baltic Physiological Societies, Kaunas, Lithuania, 26–29 August 2015, Stockholm: John Wiley & Sons Ltdiley & Sons Ltd. 2015;215:124–124. Prieiga per internetą:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/apha.12626/epdf>
5. Antanavičiūtė I, Rysevaitė-Kyguolienė K, Rimkutė L, Marandykina A, **Sveikatiėnė R**, Liutkevičius V, Ulozas V, Skeberdis V. Electrical, metabolic and genetic communication between laryngeal squamous cell carcinoma cells via membranous tunneling tubes. The FEBS journal, FEBS EMBO 2014 Conference, Paris, France, 30 August – 4 September 2014, abstract book / Federation of European Biochemical Societies, Edited by: Richard Perham. Oxford, UK: Published by Blackwell Pub. Prieiga per internetą:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/febs.12919/pdf>
6. Ulozas V, Antanavičiūtė I, Rysevaitė K, Liutkevičius V, Marandykina A, Rimkutė L, **Sveikatiėnė R**, Skeberdis VA. Membranous tunneling nanotubes – routes for communication between laryngeal carcinoma cells. 10th Congress of the European laryngological society 2nd Joint Meeting of ABEA & ALA, 9–12 April, 2014, Antalya, Turkey. Prieiga per internetą:
http://www.elsoc.org/gestor/upload/ELS%202014_ORAL%20PRESENTATION.htm/
7. **Sveikatiėnė R**, Marandykina A, Antanavičiūtė I, Rimkutė L, Jotautis V, Skeberdis VA. The Role of different connexins in formation of tunneling nanotubes and transfer of small RNAs between HeLa cells. XIIIth International Conference of Lithuanian Biochemical

- Society, June 18-20, 2014, Birštonas, Lithuania. Abstracts book of The XIIIth International Conference of Lithuanian Biochemical Society. Birštonas: Lietuvos biochemikų draugija 2014; 15:43–44.
8. **Sveikatiėnė R**, Antanavičiūtė I, Marandykina A, Rimkutė L, Ulozas V, Skeberdis VA. Membraninių tunelinių nanovamzdelių tarp gerklų naviko ląstelių savybės. VI nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija „Mokslas – sveikatai“, konferencijos pranešimų tezės, 2013 m. balandžio 05 d, Kaunas / Lietuvos sveikatos mokslų universitetas. Kaunas: Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Leidybos namai 2013;5:53–55.
 9. **Sveikatiėnė R**, Antanavičiūtė I, Marandykina A, Rimkutė L, Rysevaitė K, Liutkevičius V, Ulozas V, Skeberdis VA. Membranous Tunneling nanotubes – future anticancer drug targets? 1st Meeting of the Baltic Physiological Societies: program and abstracts: May 10-11, 2013, Kaunas, Lithuania / Lithuanian Physiological Society. Latvian Physiological Society. Estonian Physiological Society, Kaunas: Lithuanian Physiological Society 2013:18–19.
 10. Ulozas V, Antanavičiūtė I, Rysevaitė K, Liutkevičius V, Rimkutė L, Marandykina A, **Sveikatiėnė R**, Skeberdis VA. Membranous tunneling nanotubes – routes for intercellular communication among laryngeal squamous cell carcinoma cells. The 2nd Lithuanian Polish ENT Congress: September 6–8, 2013, Druskininkai, Lithuania, Programme and Abstract Book, Lithuanian Otorhinolaryngological Society. Department of Otolaryngology of Lithuanian University of Health Sciences. Medical University of Warsaw. Vilnius: Lithuanian Otorhinolaryngological Society 2013:37.
 11. Ulozas V, Antanavičiūtė I, Rysevaitė K, Liutkevičius V, Rimkutė L, Marandykina A, **Sveikatiėnė R**, Skeberdis VA. Membranous tunneling nanotubes – substructure for long distance communication among laryngeal squamous cell carcinoma cells. Aegean Conferences. 2nd International Conference on Tumor Microenvironment and Cellular Stress: Signaling, Metabolism, Imaging and Therapeutic Targets, September 27-October 2, 2013, Corfu, Greece. Oxford Optronix. Stanford University. Threshold Pharmaceuticals. University of Pennsylvania Department of Radiation Oncology. Corfu: Threshold Pharmaceuticals 2013;78:89.



Long-Distance Communication between Laryngeal Carcinoma Cells

Ieva Antanavičiūtė¹, Kristina Ryševaitė^{1,2}, Vyktas Liutkevičius^{1,3}, Alina Marandykina¹, Lina Rimkutė¹, Renata Sveikaitienė¹, Virgilijus Uloza³, Vytenis Arvydas Skeberdis^{1*}

1 Institute of Cardiology, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania, **2** Institute of Anatomy, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania, **3** Department of Otorhinolaryngology, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania

Abstract

Tunneling nanotubes and epithelial bridges are recently discovered new forms of intercellular communication between remote cells allowing their electrical synchronization, transfer of second messengers and even membrane vesicles and organelles. In the present study, we demonstrate for the first time in primary cell cultures prepared from human laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) samples that these cells communicate with each other over long distances (up to 1 mm) through membranous tunneling tubes (TTs), which can be open-ended or contain functional gap junctions formed of connexin 43. We found two types of TTs, containing F-actin alone or F-actin and α -tubulin. In the LSCC cell culture, we identified 5 modes of TT formation and performed quantitative assessment of their electrical properties and permeability to fluorescent dyes of different molecular weight and charge. We show that TTs, containing F-actin and α -tubulin, transport mitochondria and accommodate small DAPI-positive vesicles suggesting possible transfer of genetic material through TTs. We confirmed this possibility by demonstrating that even TTs, containing gap junctions, were capable of transmitting double-stranded small interfering RNA. To support the idea that the phenomenon of TTs is not only typical of cell cultures, we have examined microsections of samples obtained from human LSCC tissues and identified intercellular structures similar to those found in the primary LSCC cell culture.

Citation: Antanavičiūtė I, Ryševaitė K, Liutkevičius V, Marandykina A, Rimkutė L, et al. (2014) Long-Distance Communication between Laryngeal Carcinoma Cells. PLoS ONE 9(6): e99196. doi:10.1371/journal.pone.0099196

Editor: Eliana Scemes, Albert Einstein College of Medicine, United States of America

Received: February 17, 2014; **Accepted:** May 12, 2014; **Published:** June 19, 2014

Copyright: © 2014 Antanavičiūtė et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research was funded by a grant (No. UG-13/2012) from the Research Council of Lithuania. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: arvydas.skeberdis@smuni.lt

Introduction

Physiological and pathological processes such as homeostasis, embryogenesis, development, tumorigenesis, and cell movement depend on the synchronization of cell-to-cell communication. Intercellular communication between cells is performed by soluble molecules of endocrine and paracrine signaling systems and by direct noncytoplasmic and cytoplasmic connections. Noncytoplasmic connections include cytonemes described in *Drosophila melanogaster* and some other invertebrate cells [1,2] and filopodial bridges (viral cytonemes) found in mammalian cells [3,4]. Cytonemes extend up to 100 μ m and connect the anterior and posterior compartments of the imaginal disc in fruit flies. Similar structures have been reported in human neutrophils [5]. Filopodial bridges are shorter than 10 μ m and can transfer retrovirus infection. In both cases, these membranous tubes contact the substratum and transfer cargoes along their outer surface. Cytoplasmic connections between contiguous cells can be achieved through plasmodesmata in plants [6] and gap junctions (GJs) in animals [7,8]. Plasmodesmata are microscopic channels traversing cell walls that enable the transport of substances between cells. GJ channels are formed by 2 apposing hemichannels (aHC) (each composed of 6 connexin (Cx) subunits) and provide a direct pathway for electrical and metabolic signaling between adjacent cells. Cytoplasmic connections between remote

cells have recently been discovered in cultured rat pheochromocytoma PC12 cells [9] and designated tunneling nanotubes (TNTs) (reviewed in refs. [10,11]). These F-actin-based membranous structures, depending on the cell type, range from 20 to 800 nm in diameter and extend up to several cell diameters. They do not touch the substratum and have life times from minutes up to several hours.

The mechanism of TNT formation has not been completely elucidated yet. Two models of TNT formation have been proposed. The first model is based on the outgrowth of filopodium-like protrusions that elongate by F-actin polymerization and make physical contact with a remote cell establishing either an open-ended connection through membrane fusion or electrical coupling through GJs, or close-ended connections where the cargo has to traverse the plasma membrane boundary. LST1, a transmembrane MHC class III protein, is responsible for the formation of functional TNTs by recruiting filamin, an actin-crosslinking protein, to the plasma membrane and interacting with M-Sec, myosin and myoferlin [12]. The M-Sec protein was previously reported to be a central factor for F-actin polymerization-based TNT formation [13]. The second model is based on cell dislodgment after tight cell-cell contacts. Cells moving in opposite directions pull out the open-ended TNT that may rupture preserving tips in contact and establishing close-ended or GJ-based connections. Since their discovery in 2004, TNTs have

been described in many other cell types where they have been shown to be implicated in the intercellular electrical coupling and Ca^{2+} flux; transfer of organelles or proteins; virus, pathogenic prion, and protein transmission; cell migration; and bacteria capture (reviewed in refs. [10,11,14,15]). Interestingly, it has been shown in certain cell cultures that TTs, in addition to F-actin, contain microtubules, and while cargo transport in solely F-actin containing TTs is unidirectional, in microtubules containing TTs, it is bidirectional [16].

More recently, 2 novel long-distance tubular channels between human bronchial epithelial cell islands and A549 human alveolar basal carcinoma cells have been discovered [17,18]. Termed epithelial bridges (EPB1 and EPB2), these intercellular TTs differ structurally from TTs. They range from 1 to 20 μm in diameter and provide direct intercellular communication over the longest distances (>1 mm) reported to date. All EPBs are F-actin and microtubule composites and, similar to TTs, hover above the substratum. EPB1s, like TTs and other intercellular channels, facilitate cellular material transport. In contrast, EPB2s provide conduits for a whole cell or cell groups to move from one epithelial cell island to another, representing a completely new mechanism of cell migration.

The first evidences on the existence of TTs in tissues were presented in animals by Chimery and colleagues in the mouse corneal stroma [19] and in humans by Lou and colleagues [20] in the pleural mesothelioma and adenocarcinoma specimens. Also, one recent publication has demonstrated TT-like structures between migrating cells of the cultured explants from the metastatic nodules of ovarian cancer [21]. However, to our knowledge, there are no data in the literature about the presence of TTs in other types of malignant tumors, including squamous cell carcinoma of the head and neck region.

In this study, we found that laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) cells in the culture performed electrical and metabolic communication via membranous TTs of nano- and microscale, similar to TTs and EPBs, respectively. The thickest and longest intercellular tubes formed during cytokinesis provide open-ended connections, capable of transmitting at least 3-kDa molecules and transporting mitochondria. The TTs formed by the filopodium or lamellipodium outgrowth mechanism establish intercellular connections through Cx43-based GJ formation with consequent voltage gating properties and permeability for smaller molecules (<1.2 kDa). Moreover, we show for the first time that open-ended and even GJ-containing TTs can transfer the genetic material, such as siRNA. Finally, we demonstrate that TTs, containing F-actin alone and together with α -tubulin, exist in the LSCC tissues.

Materials and Methods

Human Laryngeal Carcinoma Cells and Tissues

Our investigations were performed in accordance with the principles outlined in the Declaration of Helsinki and approved by Kaunas Regional Bioethics Committee (BE-2-34, 2007). Histologically confirmed LSCC tissue samples were collected in accordance with the protocol approved by the Institutional Review Board, Lithuanian University of Health Sciences (LUHS). Informed written consent was obtained before surgery, and patient identifiers were removed to ensure anonymity.

LSCC tissue samples were obtained from the Department of Otorhinolaryngology, LUHS. The primary culture of LSCC cells was prepared from part of the tumor tissue sample taken from a 56-year-old male patient with T1a Nx Ro G2 LSCC during hemilaryngectomy surgery. The second part of the sample was used for a histological and immunohistochemical examination.

LSCC staging, T (tumor) and N (node) categories were assigned according to the Union for International Cancer Control classification. The diagnosis was pathohistologically confirmed at the Department of Pathology, LUHS. The moderate differentiation grade (G2) of carcinoma was determined according to the Union for International Cancer Control classification. In addition, the specimens from 5 other patients with LSCC diagnosis were examined histologically and immunohistochemically.

The carcinoma tissue sample ($\sim 0.5 \text{ cm}^3$) was cut with scissors into smaller pieces, treated with 1-mg/mL collagenase (type V) and 0.125% trypsin in PBS, and shaken at 37°C for 2 h at 350 rpm. After washing with DMEM, the LSCC cells were seeded into flasks with a growth medium (DMEM, 10% FBS, penicillin 100 U/mL and streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 . After 24 h, all dead and unattached cells were removed. The growth medium was changed every day until the adherent cells reached 90% confluence, and then they were re-seeded in new culture flasks. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

Time-lapse Imaging

Time-lapse imaging of LSCC cell motility and TT formation in the culture medium was performed at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 using an incubation system INUBG2E-ONICS (Tokai Hit, Shizuoka-ken, Japan) with an incubator, mounted on the stage of the motorized Olympus IX81 microscope (Olympus Europe holding GmbH, Hamburg, Germany) equipped with UPLFLN 4x/0.13, UPLFLN 10x/0.3, UPLSapo 20x/0.85 OI, or PlanApo N 60x/1.42 OI lens, the Orca-R² cooled digital camera (Hamamatsu Photonics K.K., Japan) and the fluorescence imaging system XCELLIGENCE (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, München, Germany). Differential interference contrast (DIC) or phase-contrast images were taken in addition to time-lapse imaging.

Electrophysiological Measurements

For simultaneous electrophysiological and fluorescence recordings, the cells grown onto glass coverslips were transferred to an experimental chamber with constant flow-through perfusion mounted on the stage of the inverted microscope Olympus IX81 equipped with the Orca-R² cooled digital camera, fluorescence excitation system MT10 (Olympus Life Science Europa GmbH, Hamburg, Germany), and fluorescence imaging system XCELLIGENCE. The UPLSapo 20x/0.85 OI lens and appropriate excitation and emission filters (Chroma Technology, Brattleboro, VT, USA) (all used filters are specified in Table S1) were used to image (molecular mass of the fluorescent ion; valence) Alexa Fluor-350 (AF350; 326; -1), Lucifer Yellow (LY; 443; -2), DAPI (279; $+2$), Alexa Fluor-488/3000 dextran (AF488/3000; 3000; -1), and siRNA conjugated with AF488 (siRNA/AF488; ~ 15000 ; n.d.). Junctional conductance g_T between the cells connected by the TT was measured using the dual whole-cell patch-clamp technique. Cell-1 and cell-2 of a cell pair were voltage clamped independently with the patch-clamp amplifier MultiClamp 700B (Molecular Devices, Inc., USA) at the same holding potential, $V_1 = V_2$. Voltages and currents were digitized using the Digidata 1440A data acquisition system (Molecular Devices, Inc., USA) and acquired and analyzed using pClamp 10 software (Molecular Devices, Inc., USA). By stepping the voltage in the cell-1 (ΔV_1) and keeping the other constant, junctional current was measured as the change in current in the unstepped cell-2, $I_T = \Delta I_2$. Thus, g_T was obtained from the ratio $-I_T/\Delta V_1$, where ΔV_1 is equal to transjunctional voltage (V_T), and a negative sign indicates that the junctional current measured in the cell-2 is oppositely oriented to

the one measured in the cell-1. To minimize the effect of series resistance on the measurements of g_T [22], we maintained pipette resistances below 3 MΩ. Patch pipettes were pulled from borosilicate glass capillary tubes with filaments. Experiments were performed at room temperature in a modified Krebs-Ringer solution (in mM): NaCl, 140; KCl, 4; CaCl₂, 2; MgCl₂, 1; glucose, 5; pyruvate, 2; HEPES, 5 (pH 7.4). Patch pipettes were filled with saline containing (in mM): KCl, 130; Na aspartate, 10; MgATP, 3; MgCl₂, 1; CaCl₂, 0.2; EGTA, 2; HEPES, 5 (pH = 7.3). AF350 and AF488/3000 were purchased from Invitrogen; AllStars negative control siRNA/AF488 was obtained from Qiagen. All other chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich Corp.

Fluorescence Imaging and Dye Transfer Studies

Fluorescence signals were acquired using the Olympus IX81 microscope with UPlanApo 20x/0.85 OI lens, Orca-R² digital camera, fluorescence excitation system MT10, and XCELENCE software. For dye transfer studies, a given dye was introduced into the cell-1 of a pair through a patch pipette in the whole-cell voltage-clamp mode. Typically, this resulted in the rapid loading of the cell-1, followed by dye transfer via the TT to the neighboring cell-2. A whole-cell recording in the dye recipient cell (cell-2) was established ~10–30 min after opening the patch in the cell-1. This allowed measurement of g_T and avoided dye leakage into the pipette-2 during the measurements of dye permeability. Evaluation of G_j permeability to dyes from changes in fluorescence intensity in both cells was previously described elsewhere [23–25]. In brief, the cell-to-cell flux (J_T) of the dye in the absence of transjunctional voltage ($V_T=0$ mV) can be determined from the changes of dye concentration in the cell-2 (ΔC_2) over the time interval (Δt) as follows:

$$J_T = \frac{vol_2 \cdot \Delta C_2}{\Delta t} \quad (1)$$

where vol_2 is the volume of cell-2. Then, according to the modified [26] Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) equation [27], the total junctional permeability (P_T) can be described in consequence:

$$P_T = \frac{J_T}{C_1 - C_2} = \frac{vol_2 \cdot \Delta C_2}{\Delta t \cdot (C_1 - C_2)} \quad (2)$$

where C_1 and C_2 are dye concentrations in the cell-1 (dye donor) and the cell-2 (dye recipient), respectively. Cell volume was approximated as a section of a sphere and calculated from the formula $vol_2 = (1/6) \cdot \pi \cdot h \cdot (3a^2 + h^2)$. The diameter of the base (a) was determined by averaging the longest and shortest diameters of the cell; the section height (h) was measured by XCELENCE software changing a focus from the base to the top of the cell. On average, the volume of examined LSCC cells was ~68,000 μm^3 . Assuming that the dye concentration is directly proportional to fluorescence intensity ($C = k \cdot FI$), the equation 2 can be modified as follows:

$$P_T = \frac{vol_2 \cdot \Delta FI_2}{\Delta t \cdot (FI_1 - FI_2)} \quad (3)$$

where $\Delta FI_2 = FI_{2,n+1} - FI_{2,n}$ is the change in FI in the cell-2 over time, $\Delta t = (t_{n+1} - t_n)$; n is the n th time point in the recording. Most of the fluorescent dyes and reagents were purchased from Invitrogen (Eugene, OR, USA). To minimize dye bleaching, studies were performed using time-lapse imaging, which exposed cells to low-intensity light for ~0.5 s every 1 min. We also used

dyes at low concentrations in the pipette solution, typically 0.1 mM and below, which minimized phototoxicity but still provided satisfactory fluorescence intensities.

Histology

For a histological visualization, part of each freshly dissected tissue sample was fixed for 3 days at 4°C in a 4% paraformaldehyde solution in 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4), routinely embedded in paraffin, and sectioned in 4–5 μm thick slices employing a rotatory microtome Microm HM350S (Germany). Tissue sections were stuck on microscope slides by electrostatic attraction (SuperFrost Ultra Plus, Thermo Scientific, Braunschweig, Germany) and dried up to 12 h at 50°C. Staining with Masson's trichrome (Sigma-Aldrich, Germany) and hematoxylin-eosin (Sigma-Aldrich, Germany) was used to characterize LSCC. The preparations were examined with the fluorescent microscope AxioImage M1 (Zeiss, Göttingen, Germany). Bright field images were taken using EC Plan-Neofluar 10x/0.3, Plan-Apochromat 20x/0.8, EC Plan-Neofluar 40x/0.75, or Plan-Apochromat 63x/1.40 OI lens and the high-resolution color camera AxioCam HRC (Zeiss, Göttingen, Germany).

Immunohistochemistry of Cells and Tissues

Cell culture. Cells were grown in 24-well plates with glass coverslips on the bottom, fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min, and permeabilized with 0.2% Triton X-100/PBS for 3 min. Coverslips were incubated for 1 h with the following primary antibodies: mouse anti- α -tubulin (T5168, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), rabbit anti-Cx43 (710700, Invitrogen, USA), mouse anti-Cx43 (610061, Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA), rabbit anti-Cx26 (71-0500, Invitrogen, USA), rabbit anti-Cx30 (HPA014846, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), then rinsed with 1% BSA/PBS and incubated with secondary goat anti-mouse IgG H&L (Cy5) (ab5563, Abcam Cambridge, UK) or with donkey anti-rabbit IgG (FITC) (sc-2090, Santa Cruz, CA, USA) for 30 min. The F-actin network was visualized using Alexa Fluor 594 phalloidin (Invitrogen, USA); coverslips were incubated with the dye for 30 min at 37°C. Coverglasses were attached using Vectashield Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories, CA, USA) and sealed with clear nail polish. MitoTracker Green (Invitrogen, USA) was used to stain mitochondria in live cells following the manufacturer's instructions. Analysis was performed using the Olympus IX81 microscope with UPlanApo 20x/0.85 OI or PlanApo N 60x/1.42 OI lens and the Orca-R² digital camera with the fluorescence excitation system MT10 and XCELENCE software.

Tissues. Freshly dissected tissues were immersed in 4% paraformaldehyde in PBS for 24 hours at 4°C, then transferred to 20% sucrose in PBS for 24 h at 4°C, and frozen on specimen plates by using a TBS tissue freezing medium (Triangle Biomedical Sciences, Durham, NC, USA). Tissue samples were sectioned at a thickness of 25 μm in a microtome cryostat (Microm HM560M, Germany) at -20°C. Sections were collected on SuperFrost slides and air dried for 30 min at room temperature. Slide-mounted tissue sections were washed in PBS, permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS containing 0.5% BSA, and blocked for 1 h in PBS containing 5% normal donkey serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). Tissues were then incubated for 1 h with mouse anti- α -tubulin (T5168, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) or rabbit anti-Cx43 (710700, Invitrogen, USA), rabbit anti-Cx26 (71-0500, Invitrogen, USA), and rabbit anti-Cx30 (HPA014846, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) primary antibodies for 18–20 hours at 4°C in a humid chamber. Tissues were then washed with PBS and

incubated for 2 h with species-specific donkey anti-mouse or donkey anti-rabbit secondary antibody conjugated with FITC (AP192F or AP182F, respectively, Chemicon, California, USA). After washing in PBS, the actin network was visualized using Alexa Fluor 594 phalloidin (Invitrogen, USA). Mitochondria were stained with an anti-mitochondria [MTC02] antibody (ab3298, Abcam, Cambridge, UK) and a donkey anti-mouse secondary antibody conjugated with FITC (AP192F, Chemicon, California, USA). Coverglasses were attached using Vectashield Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories, CA, USA) and sealed with clear nail polish. Both positive and negative controls were used. The preparations were examined by the fluorescent microscope AxioImage Z1 fitted with Apotome and fluorescence filter sets No. 38HE, 43HE, and 49 (Karl Zeiss, Gottingen, Germany), and with Plan-Apochromat 20x/0.8, EC Plan-Neofluar 40x/0.75, and Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil lenses (Karl Zeiss, Gottingen, Germany). Fluorescent images were taken using the monochrome camera AxioCam MRm (Zeiss, Gottingen, Germany). The optically sectioned stacks of images were projected into the final image using a special extended focus module available in AxioVision (v. 4.8.2, Karl Zeiss, Gottingen, Germany) software. When necessary, the same preparations were additionally analyzed and photographed employing the laser scanning microscope LSM 700 (Zeiss, Jena, Germany) with its ZEN 2010 software (Zeiss, Jena, Germany).

Data Analysis and Statistics

The analysis was performed using SigmaPlot software (Systat, Richmond, CA, USA), and averaged data are reported as means $\pm$ SEM.

Results

General Properties of LSCC Tissue and Primary Cell Culture

The primary culture of LSCC cells was prepared from part of the tumor tissue sample, while the second part was used for a histological examination, which revealed the typical properties of LSCC (Figs. 1A and 1a) described in the figure legend. LSCC cells were used in experiments between passages 5 to 15 (Fig. 1B) when they manifested high proliferative properties (Fig. 1C) and mobility ($19.4 \pm 2.8 \mu\text{m}/\text{h}$; $n = 20$), and low membrane potential ($-13.7 \pm 1.2 \text{ mV}$; $n = 40$). We found that LSCC cells in the culture formed numerous intercellular tunneling tubes of various width and length (Fig. 1B). The thickest (up to $5 \mu\text{m}$ at the most narrow site) and the longest (up to 1 mm) TTs that could be seen under low magnification (indicated by yellow arrows in Fig. 1B) resemble EPBs described by Zani [18]. Due to their microscale width, it is more correct to designate them not TNTs but simply TTs (according to the International Organization of Standardization, definition for “nanoscale” is the size ranging from approximately 1 to 100 nm and for “nano-object” is a material with one, two, or three external dimensions at the nanoscale). LSCC cells also form much thinner ($<1 \mu\text{m}$) and shorter (up to $100 \mu\text{m}$) TTs resembling those first characterized by Ruston and colleagues [9].

It has previously been demonstrated that F-actin and α -tubulin are involved in the formation of TNTs or epithelial bridges (reviewed in refs. [10,17]). Indeed, the preincubation of LSCC cells possessing the already developed network of TTs for 24 h with colchicine ($10 \mu\text{M}$), an inhibitor of microtubule polymerization, resulted in a complete loss of TTs (Fig. 1D). The inhibitors of actin polymerization, such as cytochalasin B, inhibit TNT formation but weakly affect the already existing TNTs [28].

Similar results we obtained in freshly seeded LSCC cells, which had not developed the network of TTs yet, preincubated with latrunculin A (20 nM), an inhibitor of actin polymerization (not shown).

A specific property of EPBs and TNTs is that they do not attach to the substratum [11,17]. We demonstrated that TTs formed by LSCC cells were unattached to the substratum by applying positive or negative pressure to the specific TT through a broken patch electrode (Figs. 1E–1G). However, the leading edges of lamellipodium extensions were usually attached to the substratum and participated in cell motility and TT formation.

Modes of TT Formation between LSCC Cells *In vitro*

The analysis of time-lapse imaging allowed us to distinguish the following modes of TT formation: 1) TTs formed during cell division and subsequent dislodgment (TT1); 2) TTs formed by the extensions of rear lamellipodia attached to the remote cell (TT2); 3) TTs formed by the extensions of secondary lamellipodia outgrowing from leading or rear lamellipodia (TT3); 4) TTs formed by the intersection of rear or secondary lamellipodia (TT4); 5) TTs formed by filopodium-like extensions or protrusions (TT5). Thus, for simplification in this paper, TTs will be indexed from 1 to 5 depending on the mode of their formation. We examined the incidence of TT1–5s on the 1.2-cm diameter coverslip that contained 3564 fixed immunostained LSCC cells (~ 3200 cells per cm^2) and identified 136 different TTs, among which the incidence of TT1, TT2, TT3, TT4, and TT5 was 18%, 29%, 14%, 11% and 27%, respectively. Similar results were obtained from other 2 coverslips.

TT1. The typical steps of TT1 formation are shown in Fig. 2A–2D. A mature LSCC cell rounded up (A) entering mitosis (B) and divided into 2 cells (C), preserving the cell-to-cell communication during their dislodgment. TT1s were the longest and thickest TTs, up to 1 mm in length and $5 \mu\text{m}$ in width (D). It has been shown that epithelial bridges contain both F-actin and microtubules [18], while TNTs contain either only F-actin [9] or both F-actin and microtubules [29]. Figs. 2E–2G display that TT1s contained both F-actin and microtubules, which were stained with phalloidin and anti- α -tubulin, respectively, suggesting that these TTs might participate in the bidirectional transport of materials [30].

TT2. The formation of TT2 is shown in Fig. 3A. The cell-1 had 2 rear lamellipodia (red arrows), and one of them formed the TT2 with the cell-2. Like TT1s, TT2s contained both F-actin and α -tubulin (Figs. 3B–3D). The crawling endings lamellipodia (yellow arrows in Figs. 3A and 3B), which we call “paws,” in addition to F-actin and α -tubulin threads usually contained Cx43 hemichannel clusters (Fig. 3E), which can be utilized to form GJs when the “paw” comes into contact with a remote cell. The Z-X reconstruction showed that TT2s were often raised above the substratum when stretched during cell movement in opposite directions or when cell(s) round up before division (Figs. 3F and 3G). The formation of the TT2 is demonstrated in Movie S1, where a large rear lamellipodium reached the remote cell, established the TT2 connection with it, and later retracted preserving the connection through newly formed TTs.

TT3. The rear or leading lamellipodia often grew the secondary lamellipodia, which formed the TT3 with the remote cells (Fig. 4A, red arrow). TT3s also contained both F-actin and α -tubulin (Figs. 4B–4D) and could be seen raised above the substratum (Figs. 4E and 4F). The length of TT2s and TT3s measured up to $500 \mu\text{m}$ and $300 \mu\text{m}$, respectively, while their diameter at the most narrow site was about $1\text{--}3 \mu\text{m}$ and $0.5\text{--}2 \mu\text{m}$, respectively (summary is presented in Table 1).

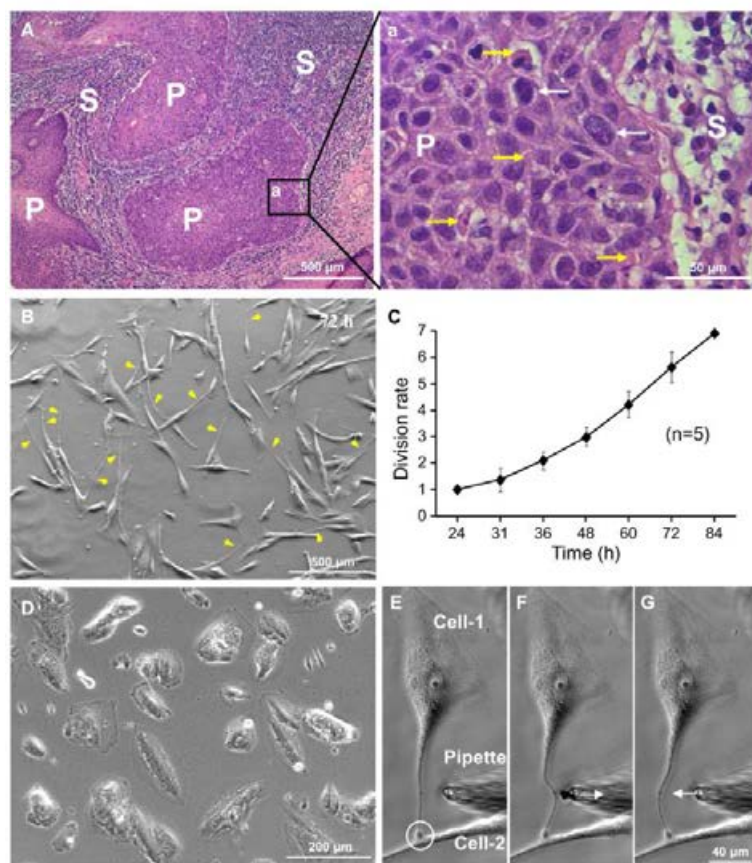


Figure 1. Characterization of LSCC cells. (A and a) Moderately differentiated squamous cell carcinoma of the larynx. The parenchyma (P) of the tumor consists of atypical epithelial cells with numerous hyperchromatic giant nuclei and atypical mitoses (white arrows). Several keratinizing cells are shown by yellow arrows. The surrounding stroma (S) is composed of the connective tissue with lymphocyte infiltration (hematoxylin and eosin staining). (B) LSCC cells after 3 days *in vitro* (TTs are indicated by yellow arrows). (C) Division rate of LSCC cells at the eighth passage (n = 5). No major differences in the division rate were observed between passages 5 to 15. (D) Preincubation of LSCC cells with colchicine (10 μ M), an inhibitor of microtubule polymerization, for 24 h resulted in a complete loss of TTs. (E–G) TTs are not attached to the substratum as confirmed by applying negative or positive pressure through a broken patch pipette. The TT2 was formed by the rear lamellipodium of the cell-1 attached to the rear lamellipodium of cell-2 (encircled). doi:10.1371/journal.pone.0099196.g001

TT4. Due to high mobility of LSCC cells, their rear or secondary lamellipodia extensions can intersect forming TT4s (Fig. 4G) and establishing functional Cx43 GJs (arrow in the inset) as confirmed by patch-clamp measurements. Such connections can also be established when one of these spindling extensions reach and anchor with its crawling “paw” to the lamellipodium of the second cell.

TT5. The thinnest and shortest TTs, i.e. TT5s, formed between LSCC cells when cells first came into contact and then moved apart (Fig. 5A–5C) or when filopodium-like protrusions (single or multiple) from one cell connected to another cell (Fig. 5D) presumably by forming anchoring junctions containing

N-cadherin and β -catenin [31]. Interestingly, two protrusions from the opposing cells can also find each other and form TT5s establishing functional GJs between their tips, where Cx43 accumulation can be seen (Fig. 5E). TT5s were also identified as not touching the substratum (Figs. 5F and 5G).

TT5s differed structurally from TT1–4s in that they did not contain microtubules (Figs. 5A–5C). In most cases, TT5s formed Cx43 GJs at the cell border (green dots indicated by white arrows in Fig. 5A), and their functionality was confirmed by a dual whole-cell patch-clamp measurement of voltage gating typical of GJs. In addition, cytoplasmic or membranous Cx43 hemichannel

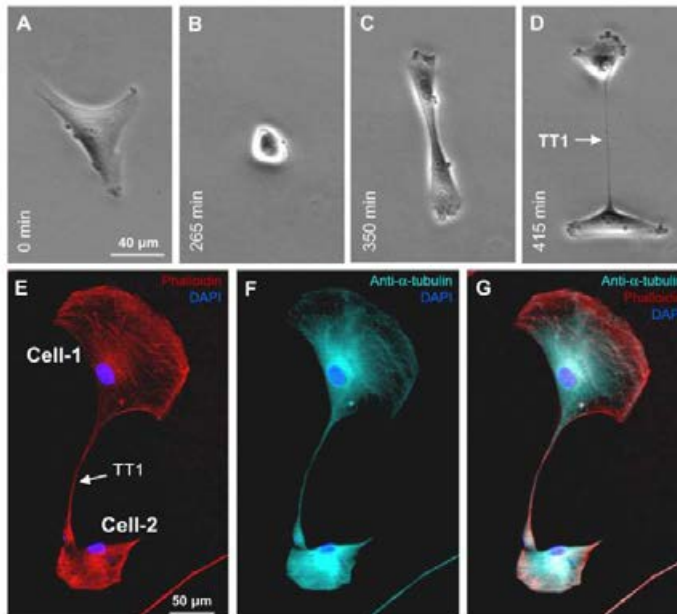


Figure 2. Formation of TT1s between LSCC cells. (A–D) TT1s form in the process of cell division and successive dislodgment. (E–G) TT1s contain both F-actin and α -tubulin.
doi:10.1371/journal.pone.0099196.g002

clusters can be seen on the surface of both cells and in the middle of TT5.

In our experiments, about 20% (6 out of 32) of TT5s did not couple the cells electrically for 3 possible reasons: 1) TT5s were close-ended, probably involved only in cargo transport on the surface or in the active transport of intracellular materials; 2) GJ-dependent electrical coupling was not established yet in the process of *de novo* formation of TT; 3) GJ-dependent electrical coupling was already lost due to cell separation.

The total conductance of a TT depends on its geometry and the presence or absence of GJs at the contact of a TT with the remote cell. TT length and external diameter can be measured quite precisely; however, the limiting factor of TT conductance is not its external but internal diameter, which can be difficult to estimate.

Cx43, Cx30, and Cx26 have been identified in the laryngeal epithelium and showed no alteration in expression during carcinogenesis [32]. Staining with specific antibodies revealed that indeed LSCC cells in culture (Figs. S1A–S1C) and in tissue (Figs. S1D–S1F) expressed Cx43, Cx30, and Cx26; however, while in the cell culture, Cx43 GJs could be seen between 2 abutted cells (~1 μm green dots between cell-2 and cell-3 in Fig. S1A), Cx26 and Cx30 could be found rather as membranous and/or intracellular clusters of hemichannels (Figs. S1B and S1C). To determine whether these 3 types of Cxs participate in TT-mediated intercellular communication between LSCC cells, we measured specific single channel conductances using the patch-clamp technique (see below).

Permeability and Electrical Properties of TTs

One of the goals of this study was to determine the permeability of TTs formed by different modes to dyes that differ in molecular mass and charge. To measure TT permeability, the pipette-1 filled with the dye was attached to the cell-1 and the pipette without the dye was attached to the cell-2 (Fig. 6A). After opening patch-1, the dye diffused to the cell-1 followed by dye transfer through the TT to the cell-2. Depending on TT length, there was a delay for the dye to reach the cell-2 caused by dye spread along the TT. Typically, fluorescence intensity in the cell-1 reached steady state during ~10–20 min, but this time was longer for the cell-2 (Fig. 6B). The total TT permeability, P_T , was evaluated using equation 3, which accounted for changes in fluorescence intensity in the cell-1 (FI1) and the cell-2 (FI2). It has previously been reported that GJs allow the passage of molecules smaller than 1.2 kDa [33]. We checked if TTs not containing GJs permitted the passage of larger molecules. Indeed, TTs were permeable to at least 3-kDa molecules, such as AF488/3000. All TT(1–5)s were permeable to other used dyes of lower molecular weight (AF350, LY, and DAPI), and permeability strongly depended on the net charge of the dye. For instance, there was only a 3-fold difference in the permeability of the TT1 to LY (valence -2) and AF488/3000 (valence -1), while their molecular mass differed by 7 fold, 443 and ~3000, respectively. Moreover, although the molecular mass of AF350 (valence -1) and LY was comparable, their permeability magnitudes in TT(1–5)s differed several times. The permeability properties of TTs formed by different modes are summarized in Table 1. Since positively charged dyes bind to

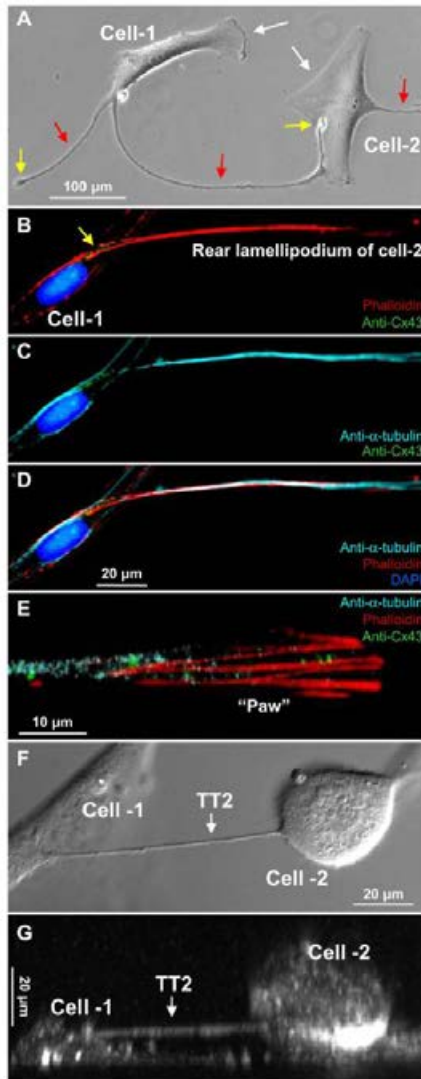


Figure 3. Formation of TT2s between LSCC cells. (A) The leading lamellipodia of cell-1 and cell-2 indicated by white arrows are involved in cell movement. Rear lamellipodia are indicated by red arrows, and one of them outgrowing from the cell-1 forms the TT2 with the cell-2. (B-D) TT2s contain both F-actin and α -tubulin. (E) Crawling endings ("paws", indicated by yellow arrows in A and B) of the rear and secondary lamellipodia, in addition to F-actin and α -tubulin, contain Cx43 hemichannel clusters. (F-G) Top view (DIC image) and Z-X reconstruction showing the TT2 raised above the substratum. doi:10.1371/journal.pone.0099196.g003

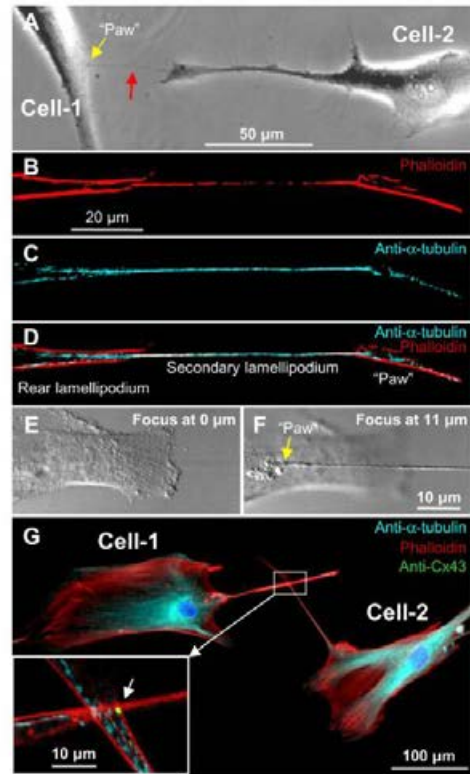


Figure 4. Formation of TT3s between LSCC cells. (A) The secondary lamellipodium (red arrow) outgrowing from the rear lamellipodium of the cell-2 forms TT3 with the cell-1. (B-D) TT3s contain both F-actin and α -tubulin. (E-F) The TT3 between the cell-1 and the cell-2 was found raised 11 μ m above the substratum (DIC image). (G) TT4s form between the intersecting rear or secondary lamellipodia establishing functional Cx43 GJs (the arrow in the inset) as confirmed by patch-clamp measurements. doi:10.1371/journal.pone.0099196.g004

nucleotides, DAPI was not quantitatively assessed, and **Table 1** only indicates that all TT[1–5]s were permeable to it.

At the end of the dye transfer measurement, if satisfactory conditions of voltage clamping in the cell-1 persisted, the patch in the cell-2 was opened to measure electrical conductance of the TT, g_T , in a dual whole-cell voltage-clamp mode. Additional experiments were carried out to quantify only the electrical properties of TT[1–5]s without the measurement of dyes transfer. TTs typically were open-ended, i.e. they did not possess the properties of voltage gating characteristic of GJs. This was demonstrated by measuring the g_T/V_T dependence of the TT and/or by application of octanol, a GJ blocker (not shown). **Fig. 6E** (upper panel) displays the g_T/V_T plot obtained by measuring the I_T response (**Fig. 6C**, lower panel) to the voltage ramp of negative polarity from 0 to -120 mV (**Fig. 6C**, upper panel) with its symmetric counterpart. The absence of voltage

Table 1. Summary of TT ultrastructural, electrical, and permeability properties.

Mode	Presence of GJs	L (μm)	d _{min} (μm)	g _T (nS)	P _f × 10 ⁻¹¹ (cm ³ /s)	AF350	AF488/1000	LY	DAPI	siRNA/AF488	Transport of mitochondria	Specific marker
TT1	-	380 ± 54 (23)	2.4 ± 0.2 (23)	5.3 ± 1.0 (23)	6.04 ± 1.91 (7)	0.73 ± 0.41 (4)	2.52 ± 1.37 (7)	0.34 ± 0.07 (4)	+	+	+	F-actin, α-tubulin
TT2	Cx43	174 ± 12 (27)	2.1 ± 0.2 (27)	6.8 ± 0.9 (27)	0.85 ± 0.24 (7)	-	0.16 ± 0.06 (6)	0.05 ± 0.01 (6)	+	+	+	F-actin, α-tubulin
TT3	Cx43	125 ± 20* (15)	1.2 ± 0.1 (15)	2.6 ± 0.5 (15)	0.24 ± 0.11 (5)	-	0.047 ± 0.015 (5)	nd	+	+	+	F-actin, α-tubulin
TT4	Cx43	321 ± 46* (11)	1.9 ± 0.2 (11)	3.2 ± 0.7 (11)	0.37 ± 0.16 (4)	-	0.11 ± 0.04 (4)	nd	+	+	+	F-actin, α-tubulin
TT5	Cx43	44 ± 6 (14)	< 0.3* (12)	0.56 ± 0.06 (12)	0.09 ± 0.03 (5)	-	0.027 ± 0.007 (8)	nd	+	+	-	F-actin

nd - no data. *Indicates presence/permeable - absence; †sum of two TT lengths measured from the cell body to intersection; ‡if the secondary lamellipodium was outgrowing from the rear lamellipodium, L was indicated as the length of a secondary one; §diameter of the thinnest TTs could not be measured precisely by conventional optical microscopy; number of experiments is indicated in parenthesis; nd - no data.

gating suggests that the TT did not contain the GJ. TTs containing GJs demonstrated voltage-gating properties. Such a typical g_T/V_T plot (Fig. 6E, lower panel) was obtained by the same procedure, and the I_T response to the voltage ramp is shown in Fig. 6D.

TT conductances correlated with their geometry assuming that g_T depends directly on TT width and inversely on TT length. In case of TT1, the correlation was moderate ($r=0.65$) and we believe that the correlation would improve if an internal diameter of TTs were estimated instead of external one (Fig. 6F; data are taken from Table 1). The mean conductances of TT2-5s correlated well with their geometry (Fig. 6G); however, it is necessary to note that in single experiments, in the TTs containing GJs, g_T was unrelated to TT geometry because neither TT length nor width and nor size of a "paw" determine the size of junctional plaque (JP) as well as the total number of channels and number of functional channels in it, the same as in case of abutted cells, the larger contact area does not guarantee a larger size or number of JPs, and higher intercellular conductance. On the other hand, the mean permeabilities of TT2-5s to fluorescent dyes such as AF350 and LY correlated well with their mean conductances (Fig. 6H). In contrast, the conductance of TTs corresponded to higher permeability pointing to that GJs provided a higher selectivity filter than TTs themselves.

Fig. S1 depicts that LSCC cells may express Cx26, Cx30, and Cx43; however, the expression of these Cxs does not mean that they all form GJs. It is known from other studies that single-channel conductances (open state/residual state) of human Cx26, Cx30, and Cx43 are 115–150/30, 160/27, and 90–110/30 pS, respectively [34,35]. To check if all these conductances can be detected in TT(2–5)-mediated junctions, we employed the dual whole-cell patch-clamp technique. Since junctions usually contained multiple functional channels (mean conductance between abutted cells was 33.6 ± 6.2 nS ($n=15$), and g_T between cells connected through TT(1–5)s is shown in Table 1), to measure single-channel conductances, we used 0.5 mM octanol, which strongly reduced electrical coupling between cells and allowed to record single-channel openings. In all experiments in which we succeeded to record single-channel openings at $V_j = -80$ mV (Fig. 6I, upper panel), voltage which closes both fast and slow gates of the channels [8], we detected only single-channel currents (Fig. 6I, lower panel) and conductances (Fig. 6J) typical of Cx43 GJs. The mean single-channel conductances of open and residual states, respectively, were 94 ± 6 pS and 32 ± 3 pS ($n=11$) for abutted cells and 93 ± 6 pS and 33 ± 3 pS ($n=9$) for cells connected through TTs containing GJs.

Cargo Transport through the TTs

The striking feature of TTs is that they can transfer not only small molecules such as Ca^{2+} , IP₃, glutamate, glutathione, ADP, and ATP but also lysosomal and intracellular vesicles (early endosomes, endoplasmic reticulum, Golgi) and even cellular organelles, such as mitochondria (reviewed in ref. [11]). To examine whether LSCC cells contain and are capable of transferring mitochondria, we used MitoTracker Green, a dye specific to mitochondria. Fig. 7A shows a ~200 μm TT1 passing above 3 other cells and connecting the cell-1 and the cell-2, as well as a shorter TT2 connecting the cell-3 and the cell-4. All cell bodies in Fig. 7B demonstrate a dense network of mitochondria, which are also present and can move inside TTs (see insets b1 and b2 of Fig. 7B, and Movie S3). Smaller TTs, such as TT2s or TT3s, also contain mitochondria, which can be seen under higher magnification (not shown); however, we failed to detect mitochondria in TT5s.

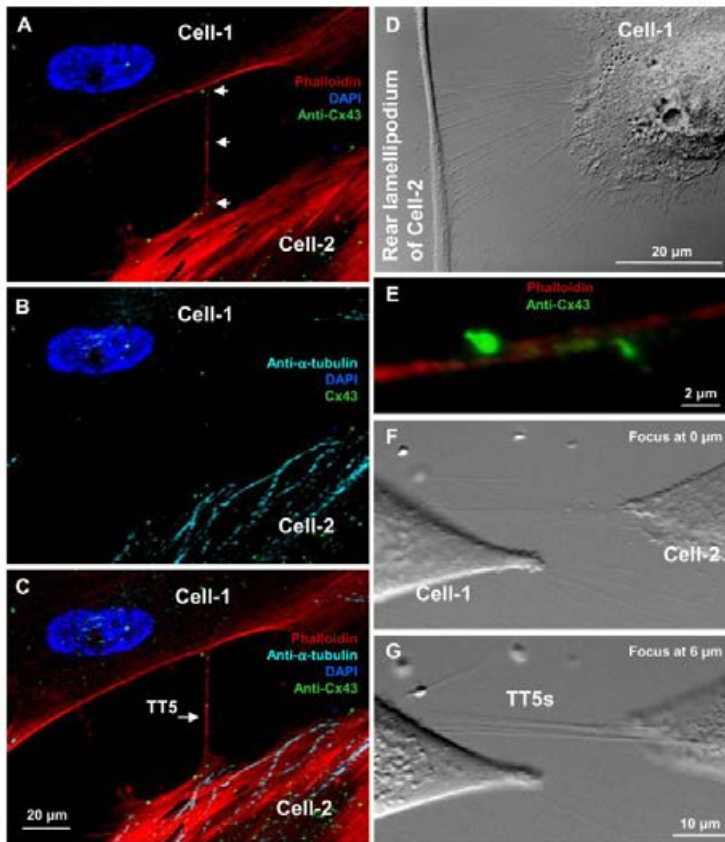


Figure 5. Formation of TT5s between LSCC cells. (A–C) TT5s contain F-actin but not α -tubulin. Cx43 hemichannel clusters, which can be seen inside and/or on the TT5 surface, form functional GJs at the cell border. (D) The multiple TT5s are formed between the cell-1 and the rear lamellipodium of the cell-2 (DIC image). (E) TT5s can be formed by protrusions from apposing cells, which come into contact and form functional Cx43 GJs (green). (F and G) Several TT5s between the cell-1 and the cell-2 were found raised $\sim 6 \mu$ m above the substratum (DIC image). doi:10.1371/journal.pone.0099196.g005

TTs can be involved in other cargo transport (white arrows in Fig. 7C, 7c and Movie S2) by a mechanism presumably involving actin-binding motor myosin-Va, which has been shown to partially co-localize with endocytic organelles [36]. We observed cargo movement either inside the TTs (Fig. 7c) or along their outer surface (Fig. 7E, red arrow).

Interestingly, in TT1–4s, we observed extremely small, 1–2 μ m in diameter, DAPI-stained vesicles (Fig. 7D), the fluorescence of which clearly differed from background autofluorescence of intracellular components such as aromatic amino acids, lipopigments, and pyridine and flavin coenzymes [37]. These vesicles resemble DAPI-stained mitochondrial DNA detected in human osteosarcoma cell bodies [38]; however, the diameter of nucleoids in which mitochondrial DNA is localized in the tubular mitochondria is ~ 99 nm [39], i.e., much smaller than that of vesicles shown in Fig. 7D. Even agglomerates of several nucleoids

do not exceed 300 nm in diameter. We assume that these vesicles may contain miRNA or siRNA, suggesting a possible transfer of nuclear materials through TTs. To verify if double-stranded siRNA can be transported from cell to cell via TTs containing and not containing GJs, we performed fluorescence imaging experiments using control double-stranded siRNA conjugated with Alexa Fluor-488 (siRNA/AF488). Fig. 8A demonstrates a bright field image of 2 LSCC cells connected with the TT2. siRNA/AF488 (2 μ M) added into the patch pipette, after the patch opening, entered the cell-1, diffused along the TT2 to its “paw” and then slowly accumulated in the cell-2 (Fig. 8B–8D and Movie S4). The kinetics of dye accumulation in the cells is shown in Fig. 8E. To confirm that siRNA/AF488 is able to permeate through TTs, containing GJs, we performed similar experiments where octanol (0.5 mM; 15 min) was applied to close GJ channels during the process of dye accumulation in the cell-2. Under such

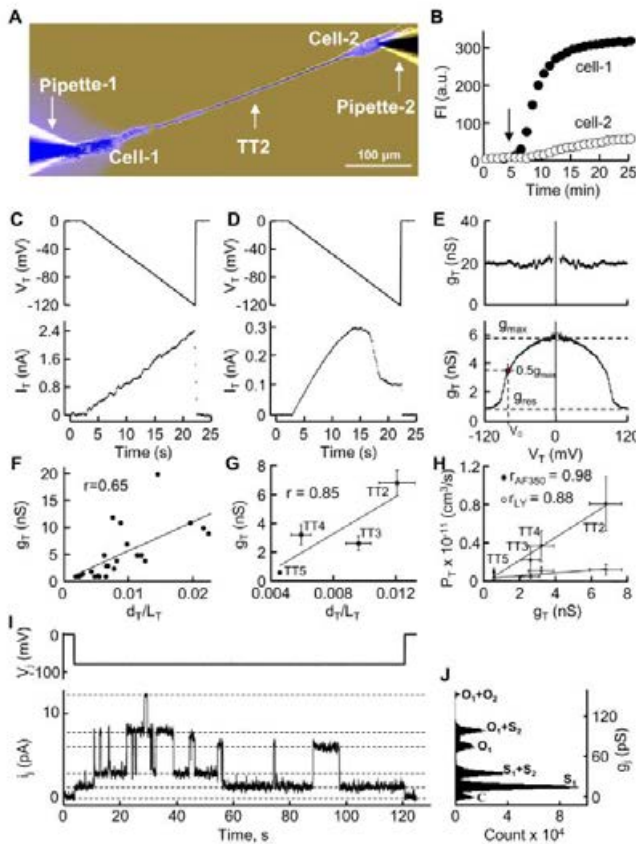


Figure 6. Permeability and electrical properties of TTs. (A) AF350 dye introduced into the cell-1 through the patch pipette-1 diffuses via the TT to the cell-2. (B) Kinetics of dye accumulation in the cell-1 and the cell-2 after opening of patch-1 (indicated by arrow). (C–D) Electrical properties of TT were measured by opening patch-2 at the end of the experiment, applying the voltage ramp of negative polarity from 0 to -120 mV (upper panels), and measuring junctional current in the cell-1 (lower panels). I_T responses in (C) and (D) are typical of TTs without and with GJs, respectively. (E) g_T/V_T dependence is calculated from I_T response to V_T ramp (shown in C and D) and presented with its symmetric counterpart. The absence or presence of V_T gating indicates that the TT does not contain or contains GJs (upper and lower panel, respectively). (F) Correlation between TT1 conductance and geometry. (G) Correlation between TT2–5 conductance and geometry. TT5s thinner than 200 nm, the diameter of which cannot be measured by conventional microscopy, were not included into statistical analysis. (H) Correlation between TT permeability and electrical conductance. (I) Recording of single-channel current I_s (lower trace) in response to 2-min -80 mV voltage pulse V_T (upper panel). (J) Single channel substate (S₁) and open state (O) conductance g_T was estimated by an all-point histogram fitted by the Gaussian function (pClamp 10 software). Two functioning channels can be recognized with respective substates and open states typical of Cx43 channels (more details are provided in the main text). doi:10.1371/journal.pone.0099196.g006

conditions, octanol arrested siRNA/AF488 accumulation in the cell-2, which was reinitiated after the washout of octanol (Fig. 8F). Due to high molecular weight and net negative charge, the accumulation of siRNA/AF488 was much slower than that of other fluorescent dyes used. P_T of TT1 and TT2 was $3.4 \pm 0.7 \times 10^{-12}$ cm³/s (n = 4) and $5.0 \pm 1.1 \times 10^{-13}$ cm³/s (n = 6), respectively (see summary in Table 1).

TTs in the LSCC Tissue

To date, only few publications on TNT existence in tissues have been published. TTs were identified in the mouse corneal stroma [19], neonatal rabbit during nephron induction between mesenchymal and epithelial stem cells [40], specimens of human pleural mesothelioma and adenocarcinoma [20], and between migrating cells of human ovarian cancer explant cultures [21]. To determine whether TTs exist not only between LSCC cells in the culture but also in solid tumors, we microsectioned and analyzed samples taken from 6 patients with LSCC (from one of these samples, a

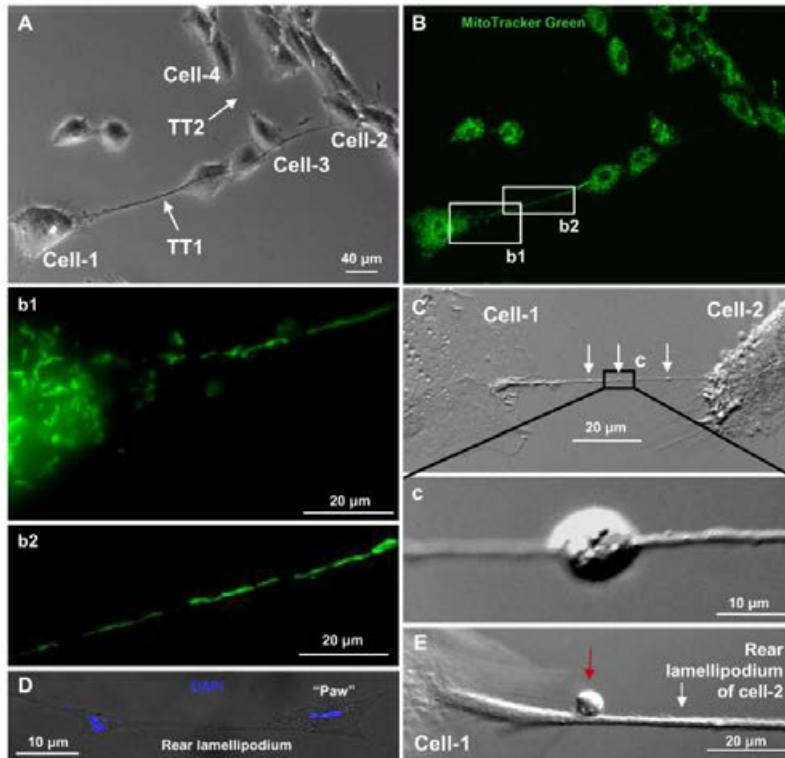


Figure 7. TTs between live LSCC cells in the culture contain mitochondria. (A) A phase-contrast image shows the TT1 connecting the cell-1 and the cell-2, and the TT2 connecting the cell-3 and the cell-4 (arrows). (B) A dense network of mitochondria stained with MitoTracker Green is present in all cell bodies and also in the TT1 and the TT2 (insets b1 and b2). (C and c) TTs can be involved in cargo transport (DIC image). (D) The TT2 contains small DAPI-positive vesicles. (E) Cargoes can be transported along an outer surface of TTs (red arrow) (DIC image). doi:10.1371/journal.pone.0099196.g007

primary cell culture was developed and characterized, as shown above). Since there are no other specific markers of TTs, the sections were stained with phalloidin and anti- α -tubulin. As in the cell culture, we identified 2 types of TTs. The TTs of the first type were up to 1 μ m in width and up to ~100 μ m in length with solely F-actin threads spanning the entire length of TTs (Fig. 9 and Movie S5). Such TTs could be attributed to TT5s found in the cell culture.

The TTs of the second type were longer (up to 300 μ m) and thicker (~2–3 μ m) with co-localizing both cytoskeleton components, F-actin and α -tubulin (Figs. 10A–10D). Moreover, in these TTs, mitochondria could be seen co-localizing with F-actin (Fig. 10E). Such TTs could be attributed to TT(1–4)s found in the cell culture. Unfortunately, in both cases, it was problematic to quantitatively assess the geometry of TTs as we did in the cell culture because 25- μ m tissue sections rarely contained entire not damaged TTs.

Discussion

In the current study, we have demonstrated for the first time in the primary cell culture prepared from human LSCC samples that LSCC cells were able to communicate with each other over long distances through membranous TTs. To support the idea that the phenomenon of TTs is typical not only of cells *in vitro*, we have examined the microsections of LSCC tissue samples and identified intercellular structures similar to those found in the cell culture. We have not only identified 5 modes of TT formation in the culture but also provided the quantitative assessment of TT electrical properties and permeability to fluorescent dyes of different molecular weight and charge (Table 1). Also, we have shown that mitochondria residing inside the TTs containing α -tubulin are mobile and presumably can transit through TTs from one LSCC cell to another as it has been demonstrated in other cell types [21,41]. TTs but not TT(2–5)s containing GJs are possible candidates for such transition. TTs form during mitotic cell division, which ends in daughter cell separation, known as cytokinesis. This mechanism involves the formation of a TT1-like intercellular bridge, and the final step of cytokinesis is

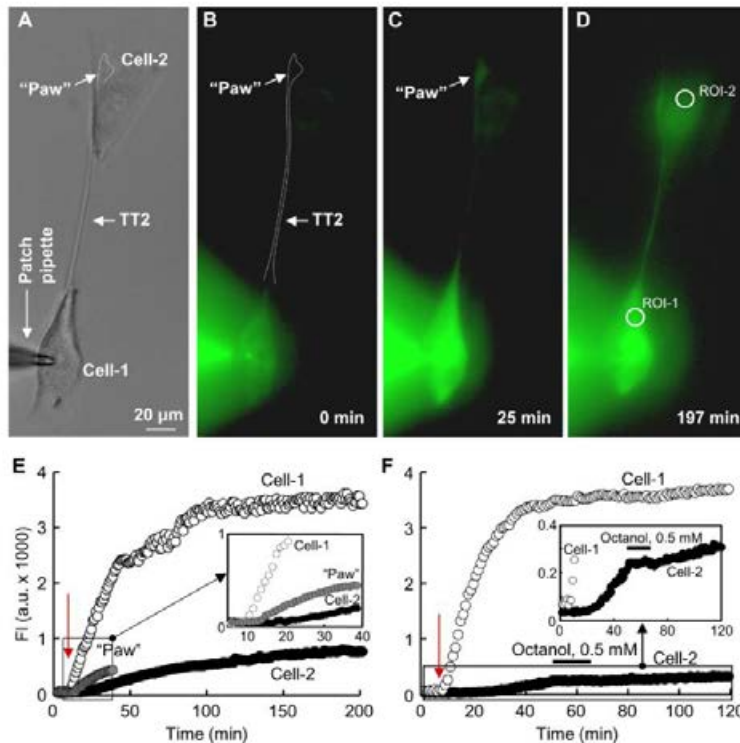


Figure 8. Permeability of TTs between LSCC cells to siRNA/AF488 in the culture. (A) A phase-contrast image shows the TT2 connecting the cell-1 and the cell-2. siRNA/AF488 (2 μ M) introduced into the patch pipette enters the cell-1 after patch opening (B), rapidly diffuses along the TT2 to the "paw," and then slowly accumulates through the GJ in the cell-2 (C). (E and inset) Kinetics of siRNA/AF488 accumulation in the cell-1, "paw," and cell-2. (F and inset) siRNA transfer through the TT2 containing GJs was confirmed by application of octanol (0.5 mM), which reversibly arrested siRNA/AF488 accumulation in the cell-2. A red arrow indicates the patch opening time in the cell-1. doi:10.1371/journal.pone.0099196.g008

abscission. Intercellular bridges are relatively short structures from several microns to several tens of microns in length and 1–3 μ m in thickness depending on the cell type [42], while in our study, we have identified extremely long, up to 1 mm TTs pointing to that cancer cell separation might be abnormal, and preservation of such long connections, which allow fast trafficking of mitochondria, could facilitate cancer cell invasion and progression.

It has been shown before that the laryngeal epithelium in addition to Cx43 expresses Cx26 and Cx30 with no alteration in expression during carcinogenesis [32]. Our immunofluorescence measurements confirmed the expression of these 3 types of Cxs in the LSCC tissue and the cell culture; however, we identified only functional Cx43 GJ channels by the patch-clamp technique either between the cells abutted or connected through TT[2–5], thus far. Therefore, the role of Cx26 and Cx30 remains to be elucidated. These Cxs may play an important role in the transfer of materials because their single-channel conductances (and presumably pore sizes) are even larger than those of Cx43 channels. Moreover, heterotypic Cx43/Cx26 and Cx43/Cx30 junctions (at least Cx43

and Cx30 have been shown to be compatible [43]) can be important in directed transport because fast gates of Cx26 and Cx30 hemichannels exhibit positive polarity, while Cx43, negative. Due to opposite gating polarities of apposed hemichannels (aHCs) in the GJ, one V_j polarity tends to open and the opposite V_j polarity tends to close both aHCs, determining the sigmoidal g_T/V_T dependence of heterotypic GJ channels instead of the symmetric bell-shaped one of homotypic junctions (see Fig. S2). In many cases, cancerous cells have been shown to have significantly lower resting potential than normal cells or fibroblasts [44]; therefore, for instance, heterotypic Cx43/Cx30 junctions between cancer cells and cancer-associated fibroblasts (CAFs) could be tuned by changes in membrane potential which, in turn, is determined by membranous ion channels and transporters. Reduced membrane potential may be functionally related to mechanisms by which oncogene-bearing cells switch from normal morphogenesis to form tumors, and the modulation of membrane potential has recently been suggested as a novel strategy for tumor normalization [45]. The asymmetry of electrical signal transfer,

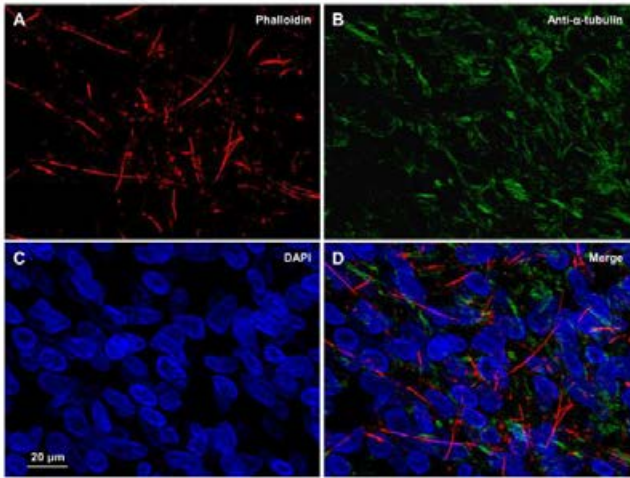


Figure 9. TTS-like tunneling tubes in the LSCC tissue samples. (A–D) TTs containing F-actin but not α -tubulin. doi:10.1371/journal.pone.0099196.g009

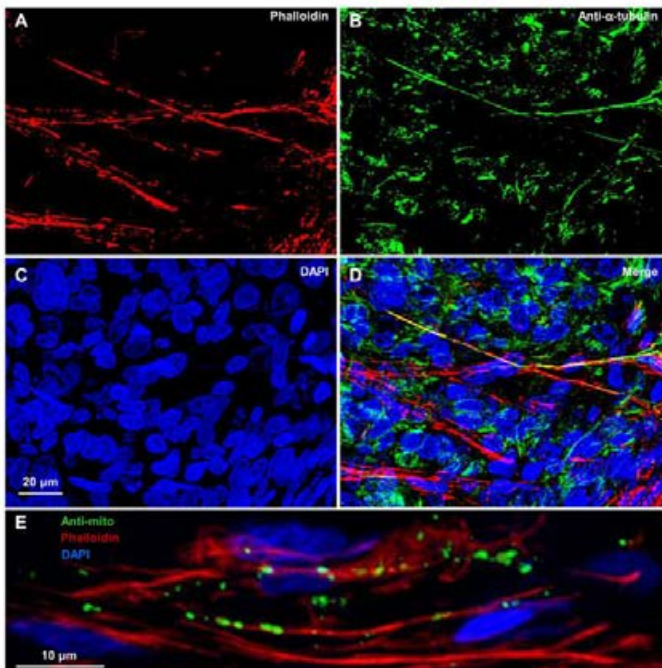


Figure 10. TT(1–4)-like tunneling tubes in the LSCC tissue samples. (A–D) TTs containing F-actin and α -tubulin. (E) TTs containing mitochondria co-localizing with F-actin. doi:10.1371/journal.pone.0099196.g010

which can be modulated from unidirectional to bidirectional by small changes of V_m in one of the cells, was demonstrated in other heterotypic junctions (reviewed in ref. [43]).

In carcinogenesis, a very important role is played by fibroblasts, which having been transformed to CAFs by paracrine signaling from carcinoma cells, in turn, induce an epithelial-to-mesenchymal transition of carcinoma cells together with which secrete several extracellular matrix-degrading enzymes opening pathways for a tumor cell invasion [46,47]. In these processes, signaling via TTs may be more effective than paracrine one, in particular if TTs form between cancer cells and fibroblasts or stem cells. Communication between cells via TTs should mainly maintain homeostasis, while communication between cancer cells and CAFs by TT[2–4]s may fuel cancer cells with high-energy nutrients and even mitochondria (Fig. 7 and Movie S3). This idea is consistent with the recent publication that has demonstrated the preferential transfer of mitochondria from endothelial to cancer cells resulting in chemoresistance [21]. Mitochondria play an important role in tumor progression; however, their role in CAFs and cancer cells is different. A recent finding of Sanchez-Alvarez and colleagues [48] suggests that mitochondrial dysfunction in CAFs promotes tumor growth via ketone production, while their dysfunction in epithelial cancer cells has an opposite effect and inhibits tumor growth.

Tumor microenvironment includes CAFs, macrophages, endothelial cells, etc. interacting not only by soluble cytokines and growth factors but also by the release of cargo-vesicles, such as exosomes or oncosomes, which can carry ATP, proteins, or miRNAs [49]. Vesicular transport through TTs containing F-actin and α -tubulin was shown to be energy-dependent and to require microtubule molecular motors such as kinesins [30]. Our finding that TTs contain DAPI-stained vesicles and can deliver siRNA/AF488 to the remote cells suggests the existence of a direct pathway for miRNA or siRNA transport between cells, which might be much faster and efficient than pinocytotic/exosomal routes. In this pathway, GJs should not be a limiting factor. Several studies suggested that GJs might be permeable to miRNAs and siRNAs [50–53] despite their high molecular mass but due to rod shape morphology allowing their passage through GJs with larger pores [53]. For instance, Valiunas et al. have demonstrated that siRNA can be transported through GJs composed of Cx43 but not Cx26 or Cx32 [51]. Specific gene silencing has therapeutic potential; however, the delivery of exogenous siRNA to the interior of target cells is problematic. This problem could be resolved by using the human mesenchymal stem cell (hMSC)-based siRNA delivery system [53]. These cells are not immunoreactive, exhibit high proliferative potential, and express Cx43.

Having provided the first characterization of long-distance communication between LSCC cells through TTs, we believe that these findings allow a better understanding of cancer cell biology and deserve further investigations focusing on the following: 1) TT-mediated communication between CAFs, hMSCs, and LSCC cells, including siRNA transfer and manipulation of gene expression, and 2) regional differences in the structure of TTs and Cx26, Cx30, and Cx43 expression in LSCC tissues involving tumor parenchyma, stroma, and transitional zone, where the formation of heterotypic GJs may be important for cancer metastasis.

Supporting Information

Figure S1 Immunostaining of Cx43, Cx30, and Cx26 in the LSCC cell culture (A–C) and tissue (D–F), respectively. Connexins are shown in green, F-actin in red, and nucleus in blue pseudo colors. (TIFF)

Figure S2 Simulation of homotypic and heterotypic gap junction g_j/V_j relationships by the S4SM model [54]. (A) Two hemichannels forming a homotypic gap junction are composed of Cx43⁺ with negative gating polarity. (B) Two hemichannels forming a heterotypic gap junction are composed of Cx26⁺ and Cx30⁺, respectively, both gating at positive voltages. (C) Two hemichannels forming a heterotypic gap junction are composed of Cx26⁺ and Cx43⁺, respectively, the first gating at positive and the second at negative voltages. (D) Two hemichannels forming heterotypic gap junction are composed of Cx43⁺ and Cx30⁺, respectively, the first gating at negative and the second at positive voltages. Parameters τ_{open} , $\tau_{residual}$, V_0 , and Λ of Cx26, Cx30, and Cx43 GJs are taken from a review article by Gonzalez et al. [34]. “+” and “-” indicate gating polarity of Cxs. (TIFF)

Table S1 List of filters used for the visualization of an appropriate fluorescent marker. (DOC)

Movie S1 Formation of TT2 and TT5 between LSCC cells in the culture. (AVI)

Movie S2 Cargo transport along TT2 between LSCC cells in the culture. (AVI)

Movie S3 Movement of mitochondria inside the TT2 between LSCC cells in the culture. Mitochondria in live cells were labeled with MitoTracker Green. (AVI)

Movie S4 siRNA/AF488 transport through the TT2 between LSCC cells in the culture. siRNA/AF488 (2 μ M) was loaded into the cell-1 through the patch pipette, diffused along the TT2 to its ending situated on the cell-2, and then slowly accumulated in the cell-2. (AVI)

Movie S5 3D picture of the 25- μ m LSCC tissue section. F-actin is stained with phalloidin (red color) and nucleus with DAPI (blue color). While short F-actin fibers may represent an intracellular F-actin network, long ones should be attributed to the intercellular TTs. (AVI)

Acknowledgments

We thank Dr. D. H. Pauza (Institute of Anatomy, LUHS) and Dr. V. Saraskas (Department of Pathology, LUHS) for valuable discussions.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: VAS IA VU. Performed the experiments: VAS IA KR VL AM LR RS. Analyzed the data: VAS IA KR VL AM LR RS. Contributed reagents/materials/analysis tools: VL VU. Wrote the paper: VAS IA VU. Prepared primary cell culture: IA.

References

- Ramirez-Weber FA, Kornberg TB (1999) Cytosomes: cellular processes that project to the principal signaling center in *Drosophila* imaginal discs. *Cell* 97: 599–607.
- Roy S, Huang F, Kornberg TB (2011) Specificity of *Drosophila* cytosomes for distinct signaling pathways. *Science* 332: 354–358.
- Sherer NM, Mothes W (2008) Cytosomes and tunneling nanotubes in cell-cell communication and viral pathogenesis. *Trends in cell biology* 18: 414–420.
- Sherer NM, Lehmann MJ, Jancsó-Soto LF, Horváth Z, Pappert M, et al. (2007) Retroviruses can establish filopodial bridges for efficient cell-to-cell transmission. *Nat Cell Biol* 9: 310–315.
- Galkina M, Romanova JM, Bragina EE, Tiganova IG, Stadnichuk VI, et al. (2010) Membrane tubules attach *Salmonella* Typhimurium to eukaryotic cells and bacteria. *FEMS immunology and medical microbiology* 61: 114–124.
- Lucas WJ, Ham BK, Kim JV (2009) Plasmodesmata – bridging the gap between neighboring plant cells. *Trends in cell biology* 19: 495–503.
- Rackauskas M, Nevelevskaya V, Skerbinis VA (2010) Diversity and properties of connexin gap junction channels. *Medicina (Kaunas)* 46: 1–12.
- Bukauskas FF, Verselis VK (2004) Gap junction channel gating. *Biochim Biophys Acta* 1662: 42–60.
- Runtom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH (2004) Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* 303: 1007–1010.
- Absolom S, Zurzolo G (2012) Wiring through tunneling nanotubes: from electrical signals to organelle transfer. *J Cell Sci* 125: 1089–1098.
- Kimura S, Hase K, Ohno H (2012) Tunneling nanotubes: emerging view of their molecular components and formation mechanisms. *Exp Cell Res* 318: 1699–1706.
- Schiller C, Diakopoulos KN, Rohwedder I, Kremmer E, von Toerne C, et al. (2012) LST1 promotes the assembly of a molecular machinery responsible for tunneling nanotube formation. *J Cell Sci* 126: 767–777.
- Ohno H, Hase K, Kimura S (2010) M-Sec: Emerging secrets of tunneling nanotube formation. *Communicative & integrative biology* 3: 231–233.
- Gurke S, Barroso JF, Gerdes HH (2008) The art of cellular communication: tunneling nanotubes bridge the divide. *Histochemistry and cell biology* 129: 539–550.
- Hurtig J, Chiu DT, Onfelt B (2010) Intercellular nanotubes: insights from imaging studies and beyond. *Wiley interdisciplinary reviews* 2: 260–276.
- Gerdes HH, Carvalho RN (2008) Intercellular transfer mediated by tunneling nanotubes. *Curr Opin Cell Biol* 20: 470–475.
- Zani BG, Edelman ER (2010) Cellular bridges: Routes for intercellular communication and cell migration. *Communicative & integrative biology* 3: 215–220.
- Zani BG, Indolfi L, Edelman ER (2010) Tubular bridges for bronchial epithelial cell migration and communication. *PLoS one* 5: e10930.
- Chiniyee HR, Pearlman E, McMenamin PG (2008) Cutting edge: Membrane nanotubes in vivo: a feature of MHC class II+ cells in the mouse cornea. *J Immunol* 180: 5779–5783.
- Lou E, Fujiwara S, Morozov A, Barlas A, Romin V, et al. (2012) Tunneling nanotubes provide a unique conduit for intercellular transfer of cellular contents in human malignant pleural mesothelioma. *PLoS One* 7: e33093.
- Pasquier J, Guersrouchen BS, Al Thawadi H, Ghali P, Maleki M, et al. (2013) Preferential transfer of mitochondria from endothelial to cancer cells through tunneling nanotubes modulates chemoresistance. *J Transl Med* 11: 94.
- Wilders R, Jonagana HJ (1992) Limitations of the dual voltage clamp method in assaying conductance and kinetics of gap junction channels. *Biophys J* 63: 942–953.
- Rackauskas M, Verselis VK, Bukauskas FF (2007) Permeability of homotypic and heterotypic gap junction channels formed of cardiac connexins mCx30.2, Cx40, Cx43, and Cx45. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H1729–H1736.
- Palacios-Prado N, Sonntag S, Skerbinis VA, Willecke K, Bukauskas F (2009) Gating, permselectivity and pH-dependent modulation of channels formed by connexin57, a major connexin of horizontal cells in the mouse retina. *J Physiol* 587: 3251–3269.
- Palacios-Prado N, Briggs SW, Skerbinis VA, Pranevicius M, Bennett MV, et al. (2010) pH-dependent modulation of voltage gating in connexin45 homotypic and connexin45/connexin43 heterotypic gap junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 9897–9902.
- Verselis V, White RL, Spray DC, Bennett MV (1996) Gap junctional conductance and permeability are linearly related. *Science* 231: 461–464.
- Hille B (2001) Ionic channels of excitable membranes. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Bukoreshtly NV, Wang X, Hodneland E, Gurke S, Barroso JF, et al. (2009) Selective block of tunneling nanotube (TNT) formation inhibits intercellular organelle transfer between PC12 cells. *FEBS Lett* 583: 1481–1488.
- Chauveau A, Acher A, Eismann P, Vivier E, Davis DM (2010) Membrane nanotubes facilitate long-distance interactions between natural killer cells and target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 5545–5550.
- Onfelt B, Nedvezki S, Benninger RK, Puthoo MA, Sowinski S, et al. (2006) Structurally distinct membrane nanotubes between human macrophages support long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria. *J Immunol* 177: 8476–8483.
- Lokar M, Iglic A, Veranic P (2010) Protruding membrane nanotubes: attachment of tubular protrusions to adjacent cells by several anchoring junctions. *Protoplasma* 246: 81–87.
- Schneider B, Teschner M, Sudermann T, Pikula B, Lautermann J (2002) Expression of gap junction proteins (connexin 26, 30, 32, 43) in normal mucosa, hyperkeratosis and carcinoma of the human larynx. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 64: 324–329.
- Simpson I, Rose B, Loewenstein WR (1977) Size limit of molecules permeating the junctional membrane channels. *Science* 195: 294–296.
- González D, Gómez-Hernández JM, Barrio LC (2007) Molecular basis of voltage dependence of connexin channels: an integrative appraisal. *Prog Biophys Mol Biol* 94: 66–106.
- Oh S, Rubin JB, Bennett MV, Verselis VK, Bargiello TA (1999) Molecular determinants of electrical rectification of single channel conductance in gap junctions formed by connexins 26 and 32. *J Gen Physiol* 114: 339–364.
- Gerdes HH, Bukoreshtly NV, Barroso JF (2007) Tunneling nanotubes: a new route for the exchange of components between animal cells. *FEBS Lett* 581: 2194–2201.
- Monici M (2005) Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol Annu Rev* 11: 227–256.
- Margineanu DH, Gregory Cox W, Sundell L, Sherwood SW, Beechem JM, et al. (2002) Cell cycle dependent morphology changes and associated mitochondrial DNA redistribution in mitochondria of human cell lines. *Mitochondrion* 1: 425–435.
- Kukat C, Wurm CA, Spahr H, Falkenberg M, Larsson NG, et al. (2011) Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 13534–13539.
- Minuth WW, Denk L (2013) Cell Projections and Extracellular Matrix Cross the Intercellular Interface within the Neural Stem/Progenitor Cell Niche: Accidental, Structural or Functional Cues? *Nephron Exp Nephrol* 122: 131–140.
- Koyanagi M, Brandes RP, Haendeler J, Zeher AM, Dimmeler S (2003) 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.
- Schiel JA, Childs C, Prekeris R (2013) Endocytic transport and cytokinesis: from regulation of the cytoskeleton to midbody inheritance. *Trends in cell biology* 23: 319–327.
- Palacios-Prado N, Bukauskas FF (2012) Modulation of metabolic communication through gap junction channels by transjunctional voltage; synergistic and antagonistic effects of gating and ionophoresis. *Biochim Biophys Acta* 1818: 1884–1894.
- Biingeli R, Cameron IL (1990) Cellular potentials of normal and cancerous fibroblasts and hepatocytes. *Cancer Res* 40: 1830–1835.
- Chernett BT, Levin M (2013) Transmembrane voltage potential is an essential cellular parameter for the detection and control of tumor development in a *Xenopus* model. *Dis Model Mech* 6: 595–607.
- Cirri P, Chiarugi P (2011) Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am J Cancer Res* 1: 482–497.
- Cirri P, Chiarugi P (2012) Cancer-associated fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 31: 195–208.
- Sanchez-Alvarez R, Martinez-Outschoorn UE, Lamb R, Hult J, Howell A, et al. (2013) Mitochondrial dysfunction in breast cancer cells prevents tumor growth: understanding chemoprevention with metformin. *Cell Cycle* 12: 172–182.
- Bohrer A, Thery C (2013) Unraveling the physiological functions of exosome secretion by tumors. *Oncotarget* 4: e22565.
- Lim PK, Bliss SA, Patel SA, Tabor M, Dave MA, et al. (2011) Gap junction-mediated import of microRNA from bone marrow stromal cells can elicit cell cycle quiescence in breast cancer cells. *Cancer Res* 71: 1550–1560.
- Vallinas V, Polosina YY, Miller H, Potapova IA, Valiuniene L, et al. (2005) Connexin-specific cell-to-cell transfer of short interfering RNA by gap junctions. *J Physiol* 568: 459–468.
- Wolvetang EJ, Pera MF, Zuckerman KS (2007) Gap junction mediated transport of siRNA between human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 363: 610–615.
- Brink PR, Vallinas V, Gordon C, Rosen MR, Cohen IS (2012) Can gap junctions deliver? *Biochim Biophys Acta* 1818: 2076–2081.
- Paulauskas N, Pranevicius M, Pranevicius H, Bukauskas FF (2009) A stochastic four-state model of contingent gating of gap junction channels containing two “fast” gates sensitive to transjunctional voltage. *Biophys J* 96: 3936–3948.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



The role of neural connexins in HeLa cell mobility and intercellular communication through tunneling tubes

Lina Rimkutė, Vaidas Jotautis, Alina Marandykina, Renata Sveikaitienė, Ieva Antanavičiūtė and Vytenis Arvydas Skeberdis*

Abstract

Background: Membranous tunneling tubes (TTs) are a recently discovered new form of communication between remote cells allowing their electrical synchronization, migration, and transfer of cellular materials. TTs have been identified in the brain and share similarities with neuronal processes. TTs can be open-ended, close-ended or contain functional gap junctions at the membrane interface. Gap junctions are formed of two unapposed hemichannels composed of six connexin (Cx) subunits. There are evidences that Cxs also play channel-independent role in cell adhesion, migration, division, differentiation, formation of neuronal networks and tumorigenicity. These properties of Cxs and TTs may synergetically determine the cellular and intercellular processes. Therefore, we examined the impact of Cxs expressed in the nervous system (Cx36, Cx40, Cx43, Cx45, and Cx47) on: 1) cell mobility; 2) formation and properties of TTs; and 3) transfer of siRNA between remote cells through TTs.

Results: We have identified two types of TTs between HeLa cells: F-actin rich only and containing F-actin and α -tubulin. The morphology of TTs was not influenced by expression of examined connexins; however, Cx36-EGFP-expressing cells formed more TTs while cells expressing Cx43-EGFP, Cx45, and Cx47 formed fewer TTs between each other compared with *wt* and Cx40-CFP-expressing cells. Also, Cx36-EGFP and Cx40-CFP-expressing HeLa cells were more mobile compared with *wt* and other Cxs-expressing cells. TTs containing Cx40-CFP, Cx43-EGFP, or Cx47 gap junctions were capable of transmitting double-stranded small interfering RNA; however, Cx36-EGFP and Cx45 were not permeable to it. In addition, we show that Cx43-EGFP-expressing HeLa cells and laryngeal squamous cell carcinoma cells can couple to the mesenchymal stem cells through TTs.

Conclusions: Different Cxs may modulate the mobility of cells and formation of TTs in an opposite manner; siRNA transfer through the GJ-containing TTs is Cx isoform-dependent.

Keywords: Tunneling tubes, Connexins, Gap junction channels, Cell mobility, siRNA transport

Background

Directed cell migration is a pivotal process for normal development and morphogenesis of most animals, wound healing, tissue renewal, immune responses, angiogenesis, and tumor metastasis [1, 2]. During these processes, cells are subjected to stress and increased energy demands. A growing body of evidence suggests that a newly discovered form of intercellular

communication referred to as "intercellular bridges" or "tunneling nanotubes" and "tunneling tubes" (TTs) contributes to cell movement [3–5] and provides means for energy supply to the remote cells by transporting ATP and even mitochondria [5–7]. Basically, TTs form when filopodial or lamellipodial protrusions from one cell attach to the target cell or during dislodgement of abutted cells [8]. In these ways, remote cells can establish open-ended, close-ended, or gap junction (GJ)-based communication. TTs have been shown to be implicated in the intercellular

* Correspondence: arvydas.skeberdis@ismuni.lt
Institute of Cardiology, Lithuanian University of Health Sciences, 17 Sukileliu Ave., 50009 Kaunas, Lithuania



© 2016 Rimkutė et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

electrical coupling and Ca^{2+} flux; transfer of organelles or proteins; virus, pathogenic prion, and protein transmission; cell migration; and bacteria capture (reviewed in refs. [8–11]).

Recently, it has been proposed that connexins (Cx), in addition to their canonical function of composing GJs, play a channel-independent role in cell adhesion, migration, division, differentiation, and tumorigenicity (reviewed in refs. [12–14]). Among 21 isoforms of Cxs found in the human genome, the role of only Cx26, Cx31.1, Cx32, and Cx43 in these processes has been described in the scientific literature so far [14]. It has been shown that Cx26 inhibits cell migration by altering the distribution of actin filaments; Cx31.1 decreases cell proliferation, delays the cell cycle at the G1 phase, and decreases migration and invasion of lung cancer cells; Cx32 increases cell proliferation, migration, and invasion; Cx43 increases cell migration, induces actin cytoskeleton reorganization, and reduces cell proliferation. Cxs interacting with cytoskeletal and tight junction proteins [12, 15] contribute to the regulation of cell migration, directed outgrowing of filopodial and lamellipodial protrusions [12, 16–18], and intercellular communication through TTs [5].

Eleven isoforms of Cxs have been identified in the nervous system where they can play an important role in the directed migration of cells, formation of neural processes, and progression of brain tumors [19]. Astrocytes express high levels of Cxs and can couple to neurons and oligodendrocytes. Astrocyte dysfunction may cause neuroautoimmune diseases, neoplasms, and epilepsy [20]. Neuronal processes share structural and functional similarities with TTs, and the directed formation of TTs between developing neurons and astrocytes has been demonstrated [21]. Cx43 accumulation at the tips of filopodium-like structures of astrocytes [22] may cause more frequent filopodium formation [23], stabilization of the leading edge protrusions in neuronal cells [24], and biological molecule transmission via TT-like structures [25]. Thus, TTs and GJs in the brain are likely to facilitate the intercellular exchange of materials and possibly genetic information. The last may be of particular importance in determining the stem cell differentiation, cancer invasion, and metastasis. The role of Cxs in cancer is controversial as well as tissue- and cancer stage-specific. Reduced Cx expression, or redistribution from the membrane to the cytoplasm, has been documented in a variety of cancers, including colon, lung, ovarian, breast, endometrial, and renal cell carcinomas and sarcomas, gliomas as well as in pre-cancerous tissues such as that of cervix. Up-regulated Cx expression has also been frequently described, and examples include breast cancer, skin cancers and various squamous cell carcinomas, colon cancer, and pancreatic cancer. Even within the same tumor type,

both increased and decreased Cx expression can be found (reviewed in ref. [26]). In gliomas, a decrease in Cx43 expression is associated with increasing proliferation and a higher tumor grade, but low-grade gliomas (for example Grade II) show increased levels of Cx43 (reviewed in ref. [27]). GJ intercellular communication between glioma cells and endothelial cells is also thought to play a critical role in glioma invasion. Up-regulation of Cx43 in micro-metastases of breast cancer appears to facilitate their attachment to the pulmonary endothelium [27]. Thus, it looks like that Cx down-regulation facilitates cancer cell escape from solid tumors, while up-regulation promotes the formation of metastasis.

Valiūnas and colleagues [28] have demonstrated that small RNAs may be delivered through GJs composed of Cx43 but not of Cx26 or Cx32 in HeLa, Mβ16tsA (*wt*), and human mesenchymal stem cells. Also, GJ-dependent transfer of si/miRNAs has been shown to occur between primary cardiac myocytes [29]; human cardiac stem cells and postmitotic myocytes [30]; bone marrow stromal and breast cancer cells [31]; glioma cells [32]; glioma stem cells and MSCs [33]. It is assumed that transfer of small RNAs with high molecular weight via GJs is possible due to rod-shaped morphology of siRNAs, a diameter of which allows their passage through GJs with larger pores [34, 35]. However, the transfer of siRNAs between abutted cells through GJs is under debate so far due to experimental difficulties to reject the pinocytotic pathway of transfer [34]. Our previous study was the first that demonstrated the transfer of double stranded siRNA between remote human laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) cells through open-ended and even through Cx43 GJ-containing TTs [5].

In the present study, we used the HeLa cell model to examine the impact of neural Cxs (Cx36, Cx40, Cx43, Cx45, and Cx47) on the following: 1) cell mobility; 2) formation and properties of TTs; and 3) transfer of siRNA between remote cells through TTs.

Results

General properties of TTs between HeLa cells

To examine the impact of different Cx expression on TT morphology, HeLa cells were stably transfected with Cx36-EGFP, Cx40-CFP, Cx43-EGFP, Cx45, or Cx47. Non-transfected HeLa *wt* cells were used as control. We found that HeLa cells, either *wt* or expressing different Cxs, in the culture formed intercellular TTs of various width (ranging from < 200 nm to > 2 μm) and length (up to 70 μm; only TTs longer than 10 μm were taken into account). Time-lapse imaging revealed highly dynamic formation of filopodium-like TTs that were identified as not touching the substratum (Fig. 1a-c). The diameter of the thinnest TTs (<200 nm) could not be measured precisely by conventional optical microscopy as well as

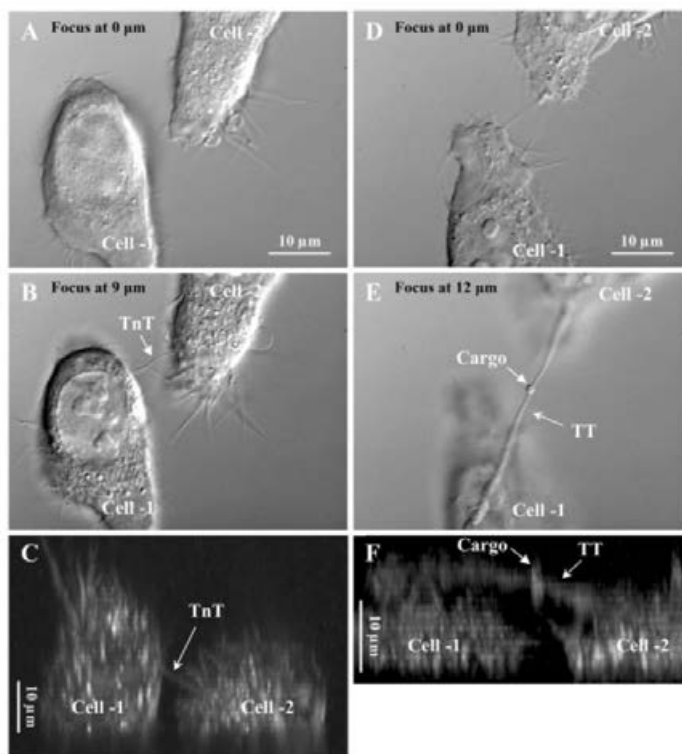


Fig. 1 Formation of TJs between HeLa cells. **a-c** TJs formed by the filopodium outgrowth mechanism. **d-f** TJs formed in the process of cell division and successive dislodgment or by the lamellipodium outgrowth mechanism. In both the cases, the pictures represent the top view of cells at a different focus **a** and **b**; **d** and **e** and Z-X reconstruction showing TJs raised above the substratum (**c** and **f**)

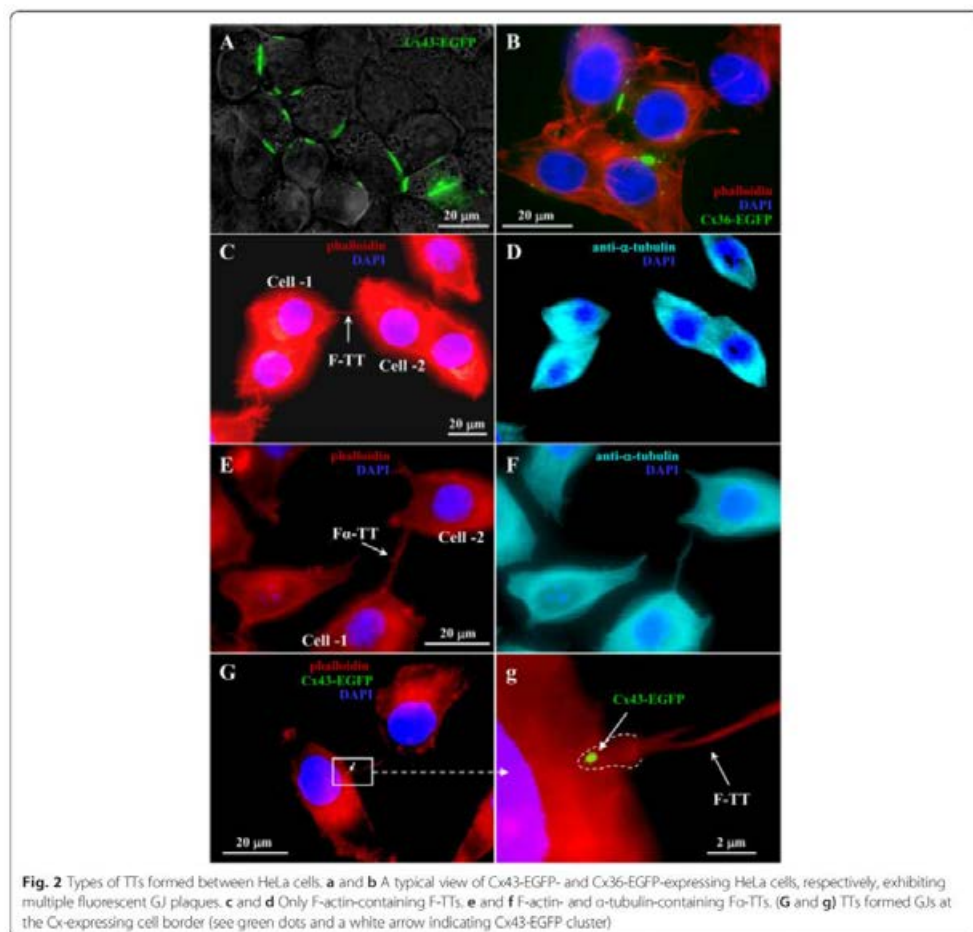
their electrical and permeability properties could not be examined due to a short lifetime (tens of seconds).

Much thicker TTs (>300 μm) formed during cell division and subsequent dislodgment or by the lamellipodium outgrowth mechanism. These TTs also were found raised above the substratum (Fig. 1d-f) and were involved in cargo transport either inside the TTs or along their outer surface (indicated by arrows in Fig. 1e and f). However, the leading edges of lamellipodium extensions were usually attached to the substratum and participated in cell motility and TT formation. The lifetime of these TTs lasted tens of minutes and even hours and allowed to use the dual whole-cell patch-clamp technique and fluorescence microscopy for characterization of their formation and properties.

HeLa cells grown to confluence on the glass coverslips formed numerous GJ plaques that can be visible due to

chimeric fluorescent proteins (Fig. 2a and b). As it was demonstrated before, abutted HeLa cells expressing Cxs used in the current study formed functional GJs permeable to fluorescent dyes of different molecular weight and net charge [36–38]. In contrast, abutted HeLa *wt* cells did not exhibit any electrical coupling or dye transfer between cells.

However, in this study, the cells were grown at relatively low density and fluorescently tagged proteins helped us confirm the presence and site of GJ plaques in the TT in addition to electrical measurements. We identified two types of TTs between *wt* or different Cx-expressing HeLa cells: TTs containing only F-actin (F-TTs) (Fig. 2c and d) and those containing F-actin and α -tubulin (Fa-TTs) (Fig. 2e and f). The cells were labeled with phalloidin and anti- α -tubulin to visualize the actin network and microtubules, respectively. HeLa cells on average formed 17 and



83 % of F-TJs and Fo-TJs, respectively, and this proportion was not affected by Cxs expression. Cells expressing different Cxs formed TJs with clusters of respective Cxs at the membrane interface with the remote cell (Fig. 2G and g).

The impact of different Cxs on formation and electrical properties of TJs

The properties of TJs between *wt* and Cx-expressing HeLa cells are presented in Table 1. None of these connexins affected the geometry of TJs; however, the number of TJs calculated per 1 mm^2 or per 100 cells was significantly higher between cells expressing Cx36-EGFP and lower between cells expressing Cx43-EGFP, Cx45, and Cx47 compared with HeLa *wt* cells (Fig. 3).

The electrical properties of TJs were examined by the dual whole-cell patch-clamp technique (Fig. 4a). HeLa cells formed functional GJ-containing TJs independent on the isoform of expressed Cx as confirmed by the measurement of voltage gating typical of GJs. Electrical coupling and voltage gating were estimated by applying 30-s voltage ramps from 0 to -120 mV in the cell-1 (Fig. 4b, upper panel) and measuring the current response in the cell-2 (Fig. 4b, middle panel demonstrates the typical I_T response of open-ended TJs, and lower panel, of GJ-containing TJs). g_T - V_T dependences (Fig. 4c) were calculated from I_T responses to the V_T ramps shown in Fig. 4b. Fig. 4d and Table 1 show that g_T strongly depended on the single channel conductance

Table 1 Summary of properties of open-ended and GJ-containing TTs

Cx isoform	L (μm)	Number of TTs per mm^2 /per 100 cells ^c	g_T (nS)	siRNA/AF488 permeability ($\times 10^{-14} \text{ cm}^2/\text{s}$)
TT/(-)GJ(HeLa wt)	16.3 ± 0.4 ($n = 214$)	$51 \pm 8/9.5 \pm 1.3$	6.0 ± 1.1^b ($n = 17$)	65 ± 38 ($n = 5$)
TT/Cx36-EGFP	17.0 ± 0.4 ($n = 330$)	$79 \pm 9^*/30 \pm 7.1^*$	0.8 ± 0.2 ($n = 16$)	$-^b$ ($n = 5$)
TT/Cx40-CFP	15.9 ± 0.5 ($n = 126$)	$46 \pm 6^*/9.7 \pm 1.8$	16.5 ± 2.8 ($n = 20$)	4.4 ± 2.0 ($n = 6$)
TT/Cx43-EGFP	17.0 ± 1.1 ($n = 96$)	$23 \pm 4^*/4.7 \pm 0.7^*$	8.8 ± 3.4 ($n = 7$)	32 ± 17 ($n = 4$)
TT/Cx45	14.3 ± 1.0 ($n = 68$)	$5.7 \pm 1.6^*/1.4 \pm 0.3^*$	4.1 ± 0.5 ($n = 41$)	$-^b$ ($n = 8$)
TT/Cx47	15.1 ± 0.5 ($n = 112$)	$27 \pm 3^*/5.0 \pm 0.9^*$	3.0 ± 0.6 ($n = 15$)	4.3 ± 1.9 ($n = 6$)

^a—nonpermeable; the number of experiments is indicated in parentheses; the diameter of TTs did not depend on the isoform of expressed Cxs and it was $0.9 \mu\text{m}$ on average ($n = 210$; varied from 0.4 to $2.4 \mu\text{m}$)

^b $p < 0.05$ compared with HeLa wt cells

^cthe majority of junctions were close-ended (53 out of 70); ^bCx36-EGFP and Cx45 GJs were impermeable to siRNA/AF488; however, they were permeable to AF488 ($6.3 \pm 1.9 \times 10^{-14} \text{ cm}^2/\text{s}$ ($n = 5$) and $6.4 \pm 4.9 \times 10^{-14} \text{ cm}^2/\text{s}$ ($n = 4$), respectively); ^cCell densities measured 36 h after seeding were 81 ± 5 ; 75 ± 6 ; 78 ± 3 ; 73 ± 7 ; 70 ± 3 ; and 79 ± 5 cells per region for wt; Cx36-EGFP; Cx40-CFP; Cx43-EGFP; Cx45; and Cx47-expressing HeLa cells, respectively

of the expressed Cx (presented in the Discussion). Interestingly, g_T of open-ended TTs between HeLa wt cells was smaller than that between particular Cx-expressing cells. These TTs did not distinguish as having the highest conductance presumably because during cell dislodgment in the process of cytokinesis, open-ended TTs rapidly turn into close-ended ones ($\sim 76\%$ of TTs between HeLa wt cells were close-ended) before they rupture. This observation supports the significance of GJs in determining the strength of communication between cells. In Cx-transfected cells, the ratio of close-ended, open-ended, and GJ-containing TTs did not depend on the Cx type

and was $\sim 1:2:4$ ($n = 94$). In rare cases, TTs between Cx-expressing HeLa cells did not couple the cells electrically for 3 possible reasons: 1) TTs were close-ended; 2) GJ-dependent electrical coupling was not established yet in the process of *de novo* formation of TT; and 3) GJ-dependent electrical coupling was already lost due to cell separation.

In general, g_T should at least in part depend directly on TT width (d_T) and inversely on TT length (L_T); however, in our experiments g_T only moderately correlated with TT geometry suggesting that the total conductance of TTs is more complex. For instance, g_T

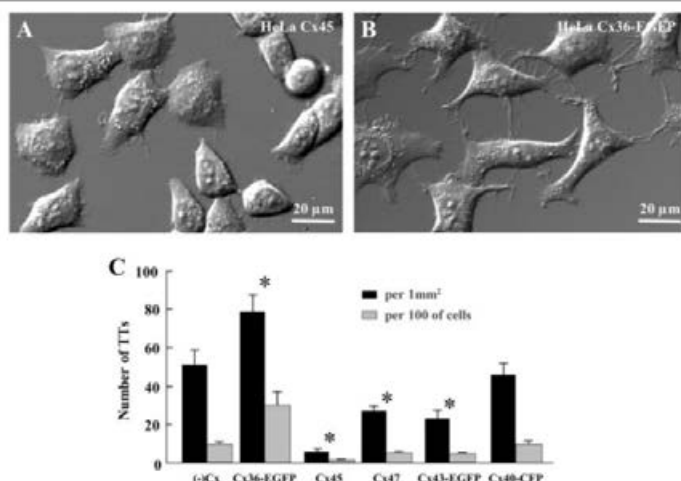
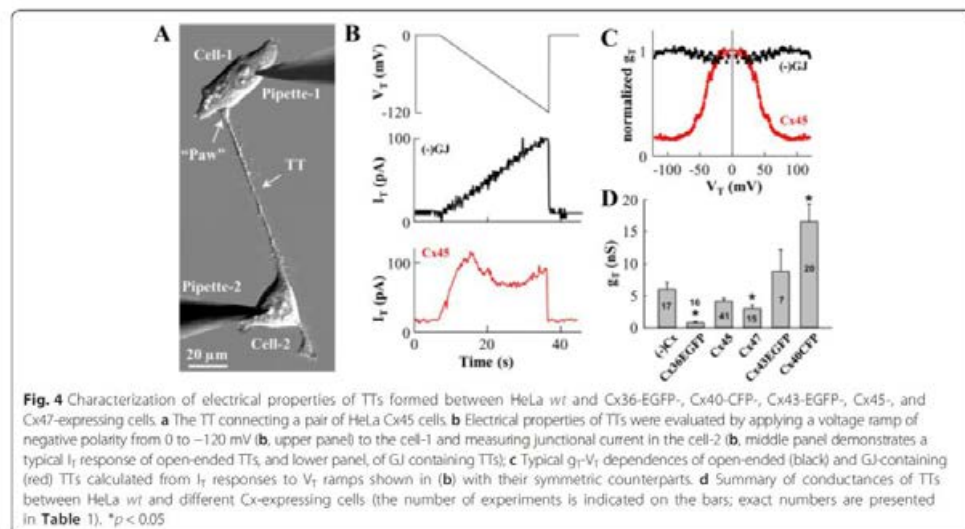


Fig. 3 Comparison of TT formation capabilities of HeLa cells expressing different Cxs. A typical view of TT formation between HeLa Cx45 (a) and Cx36-EGFP cells (b). c Wt and each Cx-expressing HeLa cells were seeded in 24-well plates with glass coverslips on the bottom at equal densities (3×10^4 in each well) and 36 h later were examined using differential interference contrast microscopy with $\times 20$ lens. The experiments were repeated in 2 passages. The number of TTs was counted in 15 randomly selected regions per coverslip and presented as the average values per 1 mm^2 or per 100 cells ($n = 2 \times 15 = 30$) (see Table 1). $^*p < 0.05$



strongly depends on the number of functional GJ channels that are not related to TT geometry and size of GJ plaques [37, 39, 40]. Also, not the external diameter of the TT, but the internal one, is a g_T -limiting factor, and unfortunately, there are no means for estimation of its dimensions.

The impact of different connexins on the mobility of HeLa cells

The mobility properties of different Cx-expressing HeLa cells were examined by the wound healing assay (Fig. 5). Occupation of the scraped area by Cx36-EGFP- and Cx40-CFP-expressing cells was faster compared with wt or Cx43-EGFP-, Cx45-, and Cx47-expressing cells. The percentage of the occupied scraped area after 12 h was as follows: in HeLa wt, 42.8 ± 6.0 %; HeLa Cx36-EGFP, 69.6 ± 5.4 %; HeLa Cx40-CFP, 68.3 ± 6.7 %; HeLa Cx43-EGFP, 29.7 ± 1.1 %; HeLa Cx45, 29.0 ± 2.4 %; and in HeLa Cx47 cells, 35.3 ± 3.3 %.

Cx isoform-specific permeability of TJs to siRNA

Previously, we have reported that small RNAs (siRNA/AF488, negative control double stranded siRNA conjugated with AF488) were capable of transiting between LSCC cells through open-ended and Cx43 GJ-containing TJs. In this study, we examined whether TJs containing GJs composed of different neural Cxs were permeable to siRNA using the same approach as described previously

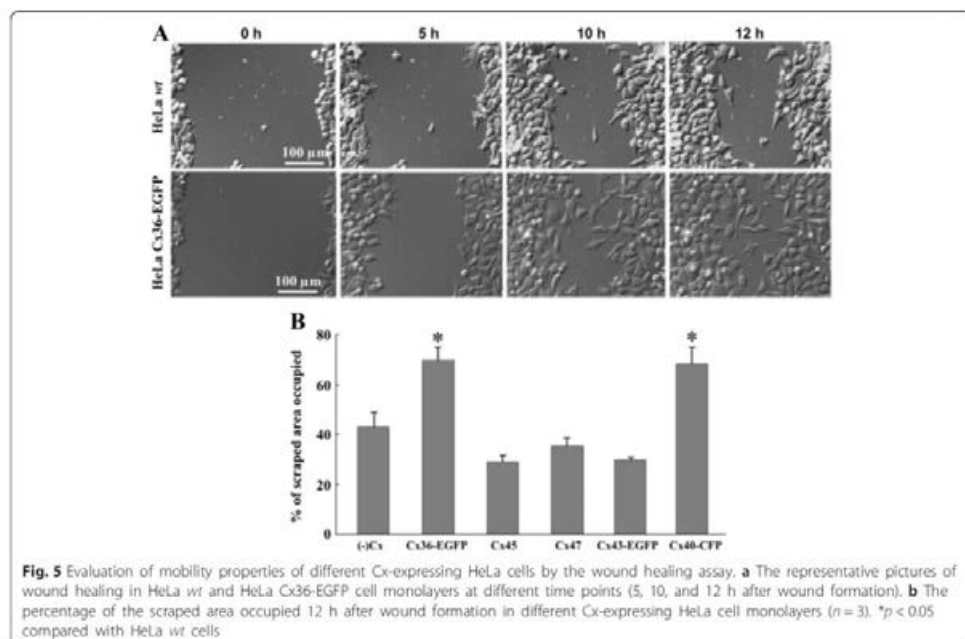
[5]. To measure TT permeability, the pipette-1 containing siRNA/AF488 (2 μ M) was attached to the cell-1 (Fig. 6a) and after opening the patch, siRNA diffused to the cell-1 followed by its transfer or not through the TT to the cell-2 (Fig. 6b). Typically, accumulation of siRNA/AF488 in the cell-2 started after ~10 min delay compared with cell-1. The total permeability of TT, P_T , was evaluated using equation 3, which accounted for changes in fluorescence intensity in the cell-1 (F_1 , Fig. 6c) and the cell-2 (F_2 , Fig. 6d). At the end of siRNA transfer measurement, the patch in the cell-2 was opened to measure g_T and g_T - V_T .

As it is demonstrated in Figs. 6a-d, TJs between HeLa cells expressing Cx45 and Cx36-EGFP were impermeable to siRNA/AF488 even though they exhibited substantial electrical coupling and permeability to AF488 (Figs. 6e and f). However, TJs containing Cx40-CFP, Cx43-EGFP, and Cx47 GJs as well as open-ended TJs between non-transfected HeLa wt cells were permeable to siRNA/AF488 (Figs. 6g-j; Table 1).

Additional file 1: Figure S1 demonstrates that in the monolayer of HeLa wt cells, AF488 injected into the single cell does not spread to the adjacent cells (A-E), and there is no electrical coupling between the abutted HeLa wt cells (F and G).

Discussion

Agnati and his colleagues in their elegant review divided the intercellular communication in the brain into two main modes: wiring transmission (neuronal processes



and TTs with their electrical and chemical synapses) and volume transmission (extracellular vesicles) [41]. However, both these modes can be encompassed by TTs that connect cells over long distances by establishing open-ended (direct cell-to-cell channels), close-ended (synaptic transmission and/or active transport), or GJ-based connections. In such a way, TTs are implicated in intercellular electrical and metabolic coupling as well as transfer of vesicles, proteins, organelles, and even genetic material. All these processes are involved not only in the normal functioning of the brain but also in the development and progression of neurodegenerative diseases and brain tumors. Our recent study has demonstrated that TTs containing Cx43 GJs were capable of transferring siRNA/AF488 [5] and raised a question whether TTs containing GJs composed of other neural Cxs are permeable to it. In parallel, we evaluated a GJ channel- and hemichannel-independent impact of the same Cxs on HeLa cell migration and development of TTs.

The novelty and main findings of the current study are the following: 1) Cx36-EGFP promotes while Cx43-EGFP, Cx47, and especially Cx45 inhibit the formation of TTs between HeLa cells; 2) Cx36-EGFP- and Cx40-CFP-expressing HeLa cells demonstrate better mobility properties; 3) TTs containing Cx40-CFP, Cx43-EGFP, and Cx47 are permeable while containing Cx36-EGFP and Cx45 are not permeable to siRNAs.

As it is seen from Table 1, the conductance of GJ-containing TTs depended on the type of the expressed Cx, i.e. Cxs with higher single channel conductance (single channel conductances of Cx36, Cx45, Cx47, Cx43, and Cx40 are ~10, 30, 55, 100, and 170 pS, respectively (reviewed in ref. [19])) determined the higher conductance of the TT assuming that the number of channels in the GJ plaque-containing TTs was alike in all cases since TT geometry was not affected by the type of the expressed Cx. Open-ended TTs of HeLa wt cells did not distinguish by the highest conductance, presumably because open-ended TTs rapidly turn into close-ended during cell dislodgment in the process of cytokinesis (~76 % of the TTs between HeLa wt cells were close-ended). This observation supports the role of GJs in determining the strength of communication between remote cells connected through TTs.

One of the steps in the cell motility cycle is integrin-dependent adhesion to the substrate [42]. Our observation that Cxs localize on the tips of lamellipodium-like protrusions and at their contact with the remote cell suggests that Cxs may interact with cellular adhesion and tight junctional proteins of other cells. For instance, Cx43 has been shown to exert effects on migration by interfering with receptor signaling, cytoskeleton remodeling, and tubulin dynamics [15]; in the developing brain, Cx43

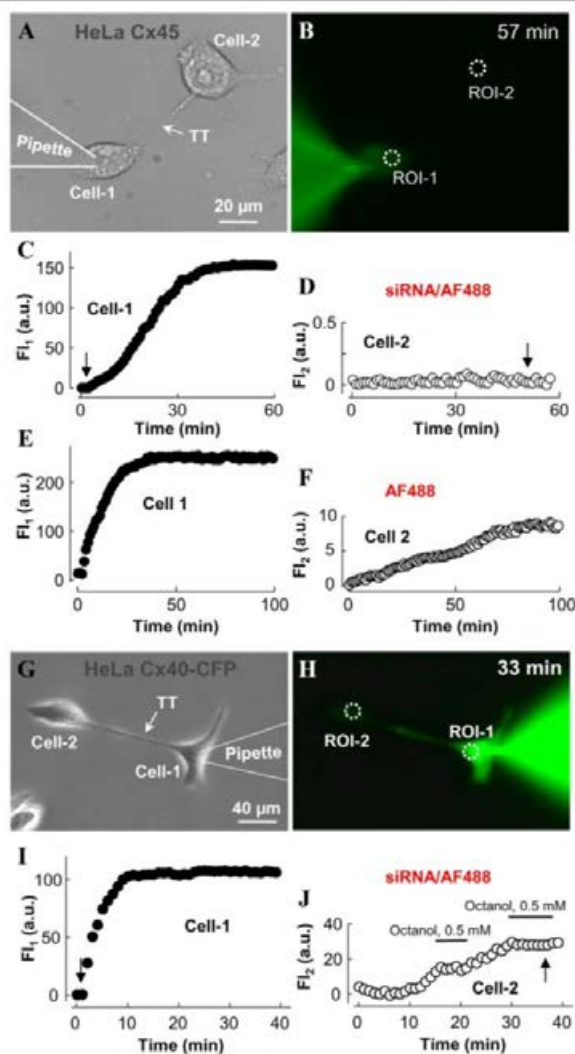


Fig. 6 siRNA transfer through TJs between different Cx-expressing HeLa cells. **a** A pair of Cx45-expressing HeLa cells connected through the TT. **b** siRNA/AF488 (2 μM) introduced into the patch pipette entered the cell-1 after patch opening, spread along the TT but did not enter the remote cell-2. **c** and **d** Kinetics of siRNA/AF488 accumulation in the cell-1 and the cell-2, respectively. g_T measured at the end of the experiment was 2.6 nS. Arrows point to the moments of patch opening in the cell-1 and the cell-2. **e** and **f** Kinetics of AF488 accumulation in the cell-1 and the cell-2, respectively. **g** A pair of Cx40-CFP-expressing HeLa cells connected through the TT. **h** After the patch was opened in the cell-1, siRNA/AF488 entered the cell-1, spread along the TT, and accumulated in the cell-2. **i** and **j** Kinetics of siRNA/AF488 accumulation in the cell-1 and the cell-2, respectively. siRNA/AF488 accumulation in the cell-2 was arrested by octanol (0.5 mM), a GJ blocker. g_T measured at the end of the experiment was 10 nS

adhesion-promoting properties facilitate the migration of pyramidal cell precursors from the ventricular zone toward the ventricular plate [43, 44]. Also, the expression of Cx43 inversely correlated with the migration rate in the culture of canine brain tumor cells [45]. Similarly, in our study, Cx43-EGFP- as well as Cx45- and Cx47-expressing HeLa cells demonstrated tendency to reduced mobility compared with HeLa *wt* cells (Fig. 5b). Interestingly, cells expressing the same Cxs exhibited reduced formation of TTs while Cx36-EGFP-expressing cells formed the largest number of TTs and demonstrated the highest mobility (Fig. 3c); Cx40-CFP increased cell mobility but TT formation did not differ from that in HeLa *wt* cells. These observations suggest that cell mobility and TT formation may be regulated through different mechanisms that may be controlled by different Cxs in an opposite manner.

The Cx isoform-specific permeability of TTs to siRNA/AF488 suggests that GJs may play an important role in forming the limiting barrier of genetic material transfer through homotypic and heterotypic homocellular and heterocellular connections. TTs containing GJs composed of Cxs with the lowest single channel conductances (Cx36-EGFP and Cx45) were impermeable to siRNA/AF488; however, they both were permeable to AF488 (Fig. 6). The differences in permeability could be determined by different diameters of GJ pores and by distribution of fixed charge sites in the pore. The main factor that can facilitate the effective permeability of genetic material is rod-shaped morphology of a siRNA molecule [34, 35]. Also, it is worth noting that siRNA transfer is not a simple process of diffusion but rather energy-dependent, motor protein-involving transportation. For instance, kinesin and dynein have been shown to be motor proteins associated with microtubule transport [46] that can be blocked by azide, an inhibitor of ATP synthesis [47, 48]. This assumption stays in line with our observation that G_T and P_T of siRNA did not correlate either among Cxs with different single channel conductances (see Table 1) or in the single Cx series of experiments.

Epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions play crucial roles in cancer metastasis, and these processes can be controlled and reversed by miRNAs [49]. The known pathways of miRNA transfer between cells are the following: extracellular vesicles (exosomes, ectosomes, and apoptotic bodies); circulating RNA in a vesicle-independent form; synapses; GJs and TTs [50]. The last pathway would be the most swift and efficient; however, it still is not definitely proven. A general view that Cxs are down-regulated in cancer cells needs to be revised because many studies including our own [5] have demonstrate the presence of Cxs and GJs in tumor tissues. Even though epithelial-to-mesenchymal transition is associated with Cx down-regulation or loss of communication through GJs between

cells that communicate normally (this process is related to the onset of neoplasia and tumorigenesis), mesenchymal-to-epithelial transition is related to the up-regulation of Cx expression and acquisition of novel GJ-based communication between cell types that do not communicate in healthy tissue (these processes are related to angiogenesis, invasion, and metastasis) (reviewed in refs. [12, 51]). For instance, in glioma cell populations, the over-expression of Cxs and GJs between tumor and non-tumor glia cells facilitates the invasion of glioma cells [52]. The expression of Cx43 in the glioma core is very heterogeneous: Cx expression is restricted to minor populations of cells endowed with invasive and cancer stem cell-like properties and able to migrate, but other cells non-expressing Cx43 are able to proliferate [27]. Migrating glioma cells expressing Cx43 may then be able to induce the development of secondary or recurrent gliomas with GJs [13]. Cx43 expression is increased in breast cancer cells predestined to spread to the brain [53]. Disseminating breast cancer or melanoma cells migrate along the luminal surface searching for suitable sites to extravasate and form functional GJs (Cx43, Cx26) with brain endothelial and/or glial cells to initiate brain metastasis, and first lesions develop in Cx-rich vasculature and stroma of the brain [54]. Recent studies have suggested the involvement of miRNA in coordination of the gene expression program determining tumor metastasis [55]. Delivery of miRNA to remote cells can be facilitated by open-ended or GJ-containing TTs. The first evidence of the effectiveness of GJ-dependent pathway was provided by Valiunas and colleagues, who demonstrated that siRNA delivered through GJs down-regulated a reporter gene in the recipient cell [35].

Conclusions

Our data demonstrate a new modulatory effect of different neural Cxs on cell migration, TT formation, and permeability to siRNA. These results may contribute to the knowledge about mechanisms of cancer invasion and metastasis.

Methods

Cell lines and culture conditions

Experiments were performed on HeLa (human cervix carcinoma, ATCC CCL-2, Manassas, VA, USA) cells stably transfected with Cxs tagged with green or cyan fluorescent proteins (Cx36-EGFP, Cx43-EGFP and Cx40-CFP) or untagged Cx45 and Cx47. Stable HeLa cell lines expressing Cxs used in this study were obtained in collaboration with the laboratory of Dr. F. Bukauskas (Albert Einstein College of Medicine, New York, USA). Briefly, vectors were transfected into HeLa cells using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA) and following the transfection protocol of manufacturer. Cell lines expressing Cx36-EGFP and

Cx43-EGFP were selected using 500 µg/ml G418/geneticin (Sigma-Aldrich Co.), whereas 1 µg/ml puromycin (Invitrogen, USA) was used for selection of HeLa Cx40-CFP, Cx45, and Cx47 cell lines. The construction protocols of vectors are described elsewhere [56, 57]. Cells were grown in DMEM medium containing 10 % fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin mix (100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin; Gibco Laboratories). Typically, the cells were analyzed on the second day after passage. LSCC cells were prepared as described elsewhere [5].

Time lapse imaging

Time lapse imaging of HeLa cell mobility and TT formation in the culture medium was performed at 37 °C in the humidified atmosphere of 5 % CO₂ using an incubation system INUBG2E-ONICS (Tokai Hit, Shizuoka-ken, Japan) with an incubator mounted on the stage of motorized Olympus IX81 microscope (Olympus Europe holding GmbH, Hamburg, Germany) with Orca-R² cooled digital camera (Hamamatsu Photonics K.K., Japan), fluorescence excitation system MT10 (Olympus Life Science Europa GmbH, Hamburg, Germany), and XCELLENCE software (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, München, Germany).

Wound healing assay

Cell migration analysis was performed by the wound healing assay. Cells were grown to confluence on the glass coverslips. Then the monolayer was scraped with a sterile surgical blade. The cells were washed with fresh growth medium to remove cell debris. Wound healing was evaluated by measuring the cell-free area remaining in the wound [58] after 5, 10, or 12 h.

Electrophysiological measurements

For simultaneous electrophysiological and fluorescence recording, cells grown onto glass coverslips were transferred to an experimental chamber with constant flow-through perfusion mounted on the stage of the inverted microscope Olympus IX8. Junctional conductance g_T between the cells connected by the TT was measured using the dual whole-cell patch-clamp technique. Cell-1 and cell-2 of a cell pair were voltage clamped independently with a patch-clamp amplifier MultiClamp 700B (Molecular Devices, Inc., USA) at the same holding potential, $V_1 = V_2$. Voltages and currents were digitized using a Digidata 1440A data acquisition system (Molecular Devices, Inc., USA) and acquired and analyzed using pClamp 10 software (Molecular Devices, Inc., USA). By stepping the voltage in the cell-1 (ΔV_1) and keeping the other constant, junctional current was measured as the change in current in the unstepped cell-2, $I_T = \Delta I_2$. Thus, g_T was obtained from the ratio $-I_T/\Delta V_1$, where ΔV_1 is equal to

transjunctional voltage (V_T) and negative sign indicates that the junctional current measured in cell-2 is oppositely oriented to the one measured in cell-1. To minimize the effect of series resistance on the measurements of g_T [59], we maintained pipette resistances below 3 MOhms. Patch pipettes were pulled from borosilicate glass capillary tubes with filaments. Experiments were performed at room temperature in modified Krebs-Ringer solution (in mM): NaCl, 140; KCl, 4; CaCl₂, 2; MgCl₂, 1; glucose, 5; pyruvate, 2; HEPES, 5 (pH 7.4). Patch pipettes were filled with saline containing (in mM): KCl, 130; Na aspartate, 10; MgATP, 3; MgCl₂, 1; CaCl₂, 0.2; EGTA, 2; HEPES, 5 (pH = 7.3).

Fluorescence Imaging and siRNA Transfer Studies

Fluorescence signals were acquired using the Olympus IX81 microscope with Orca-R² digital camera, fluorescence excitation system MT10, and XCELLENCE software. For siRNA transfer studies, siRNA conjugated with Alexa Fluor-488 fluorescent dye (siRNA/AF488, QIAGEN, Venlo, Netherlands) or Alexa Fluor-488 hydrazide (AF488, Life Technologies) was introduced into cell-1 of a pair through a patch pipette in whole-cell voltage-clamp mode. Typically, this resulted in loading of the cell-1, followed by siRNA/AF488 or AF488 transfer via the TT to the neighboring cell-2. At the end of siRNA/AF488 or AF488 transfer measurement, the patch in the cell-2 was opened to measure g_T in dual whole-cell patch-clamp mode. The presence or absence of GJ in the TT was checked by measuring g_T-V_T . Evaluation of GJ permeability to fluorescent dyes from changes in fluorescence intensity in both cells was previously described elsewhere [36, 39, 40]. In brief, the cell-to-cell flux (J_T) of the dye in the absence of transjunctional voltage ($V_T = 0$ mV) can be determined from changes of dye concentration in the cell-2 (ΔC_2) over the time interval (Δt) as follows:

$$J_T = \frac{vol_2 \cdot \Delta C_2}{\Delta t} \quad (1)$$

where vol_2 is the volume of cell-2. Then, according to the modified [60] Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) equation [61], the total junctional permeability (P_T) can be described in consequence:

$$P_T = \frac{J_T}{C_1 - C_2} = \frac{vol_2 \cdot \Delta C_2}{\Delta t \cdot (C_1 - C_2)} \quad (2)$$

where C_1 and C_2 are dye concentrations in the cell-1 (dye donor) and the cell-2 (dye recipient), respectively. Cell volume was approximated as a hemisphere. The diameter of a hemisphere was determined by averaging the longest and the shortest diameters of the cell; the volume of examined HeLa cells was $\sim 1800 \mu\text{m}^3$ on average. Assuming that the dye concentration is directly

proportional to fluorescence intensity ($C = k \cdot FI$), equation 2 can be modified as follows:

$$P_T = \frac{vol_2 \cdot \Delta FI_2}{\Delta t \cdot (FI_1 - FI_2)} \quad (3)$$

where $\Delta FI_2 = FI_{2,n+1} - FI_{2,n}$ is the change in FI in cell-2 over time, $\Delta t = (t_{n+1} - t_n)$; n is the n th time point in the recording. To minimize siRNA/AF488 bleaching, studies were performed using time-lapse imaging, which exposed cells to low-intensity light for ~0.5 s every 1 min.

Immunocytochemistry of cells

Cells were grown in 24-well plates with glass coverslips on the bottom, fixed with 4 % paraformaldehyde for 15 min, and permeabilized with 0.2 % Triton X-100/PBS for 3 min. Coverslips were incubated for 1 h with mouse anti- α -tubulin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) primary antibody, then rinsed with 1 % BSA/PBS and incubated for 30 min with goat anti-mouse IgG H&L (Cy5) (Abcam Cambridge, UK) secondary antibody. The F-actin network was visualized using Alexa Fluor 594 phalloidin (Invitrogen, USA), coverslips were incubated with the dye for 30 min at 37 °C. Analysis was performed with the Olympus IX81 microscope equipped with Orca-R² digital camera, fluorescence excitation system MT10, and XCELLENCE software.

Data analysis and statistics

The analysis was performed using SigmaPlot software (Systat, Richmond, CA, USA), and averaged data are reported as means $\pm$ SEM. For statistical evaluation, the Student's t test was used, and a difference was considered statistically significant when $p < 0.05$.

Additional file

Additional file 1: Figure S1. Dye permeability and electrical coupling between HeLa wt cells. (A-C) AF488 was introduced into a single cell (ROI-1) of the HeLa wt cell monolayer, and the time-lapse imaging of fluorescence intensity was monitored in the surrounding cells (ROI-2 – ROI-6). (D and E) Kinetics of AF488 accumulation in the injected cell and neighboring cells, respectively (background fluorescence subtracted) ($n = 6$). The arrow indicates the moment of patch opening. Circles filled with different colors in E represent FI from ROI-2 – ROI-6. (F-G) Electrical coupling of abutted HeLa wt cells was evaluated by applying voltage ramp (V_j) of negative polarity from 0 to -120 mV (G_j upper panel) to the cell-1 and measuring junctional current (I_j) (G_j lower panel) in the cell-2 ($n = 17$). (TIF 1708 kb)

Abbreviations

TT: tunneling tube; F-TT: tunneling tube containing only F-actin; Fa-TT: tunneling tube containing F-actin and α -tubulin; C: concentration of the dye; Cx: connexin; FI: fluorescence intensity of the dye; G_j : gap junction; g_j : junctional conductance of abutted cells; g_j : conductance of the TT; I_j : current through the TT; J_c : cell-to-cell flux of the dye; P_c : permeability of the TT; siRNA: small interfering RNA; V_j : transjunctional voltage of abutted cells; V_j : voltage across the TT; LSCC: human laryngeal squamous cell carcinoma.

Competing interests

The authors declare no financial and non-financial competing interests.

Authors' contributions

V.A.S. designed research; V.A.S., L.R., A.M., V.J., and R.S. performed patch-clamp, dye transfer and time-lapse experiments; I.A. prepared Cx-transfected HeLa cells and performed immunocytochemistry experiments; V.A.S., I.A., L.R., and A.M. analyzed data and wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This research was funded by a grant (No. UG-13/2012) from the Research Council of Lithuania.

Received: 19 May 2015 Accepted: 8 January 2016

Published online: 13 January 2016

References

- Bravo-Cordero JJ, Hodgson L, Condeelis JS. Directed cell invasion and migration during metastasis. *Curr Opin Cell Biol*. 2012;24(2):277–83.
- Friedl P, Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature Reviews*. 2009;10(7):445–57.
- Chauveau A, Aucher A, Eissmann P, Vivier E, Davis DM. Membrane nanotubes facilitate long-distance interactions between natural killer cells and target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(12):5545–50.
- Zani BG, Edelman ER. Cellular bridges: Routes for intercellular communication and cell migration. *Commun Integr Biol*. 2010;3(3):215–20.
- Antanaviciute L, Rysevaitė K, Liutkevicius V, Marandytė A, Rimkutė L, Sveikienė R, et al. Long-distance communication between laryngeal carcinoma cells. *PLoS One*. 2014;9(6):e99196.
- Koyanagi M, Brandes RP, Haendeler J, Zelher AM, Dimmeler S. Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes? *Circ Res*. 2005;96(10):1039–41.
- Pasquier J, Guerrouahen BS, Al Thawadi H, Ghiabi P, Maleki M, Abu-Kaoud N, et al. Preferential transfer of mitochondria from endothelial to cancer cells through tunneling nanotubes modulates chemoresistance. *J Transl Med*. 2013;11:54.
- Abounit S, Zurzolo C. Wiring through tunneling nanotubes - from electrical signals to organelle transfer. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 5):1089–98.
- Kimura S, Hase K, Ohno H. Tunneling nanotubes: emerging view of their molecular components and formation mechanisms. *Exp Cell Res*. 2012;318(14):1699–708.
- Austefjord MW, Gerdes HH, Wang X. Tunneling nanotubes: Diversity in morphology and structure. *Commun Integr Biol*. 2014;7(1):e27934.
- Hurtig J, Chiu DT, Orfeli B. Intercellular nanotubes: insights from imaging studies and beyond. *Wiley Interdiscip Reviews*. 2010;2(3):260–76.
- Defamie N, Chepied A, Mesnil M. Connexins, gap junctions and tissue invasion. *FEBS Lett*. 2014;588(8):1331–8.
- Naus CC, Laird DW. Implications and challenges of connexin connections to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(6):435–41.
- Zhou JZ, Jiang JX. Gap junction and hemichannel-independent actions of connexins on cell and tissue functions - an update. *FEBS Lett*. 2014;588(8):1186–92.
- Kameritsch P, Pogoda K, Pohl U. Channel-independent influence of connexin 43 on cell migration. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1818(8):1993–2001.
- Xu X, Li WE, Huang GY, Meyer R, Chen T, Luo Y, et al. Modulation of mouse neural crest cell motility by N-cadherin and connexin 43 gap junctions. *J Cell Biol*. 2001;154(1):217–30.
- Francis R, Xu X, Park H, Wei CJ, Chang S, Chatterjee B, et al. Connexin43 modulates cell polarity and directional cell migration by regulating microtubule dynamics. *PLoS*. 2011;6(10):e26379.
- Machtaler S, Dang-Lawson M, Choi K, Jang C, Naus CC, Matsuuchi L. The gap junction protein Cx43 regulates B-lymphocyte spreading and adhesion. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 15):2611–21.
- Rackauskas M, Neverauskas V, Skeberdis VA. Diversity and properties of connexin gap junction channels. *Medicina*. 2010;46(1):1–12.
- Moinfar Z, Dambach H, Faustmann PM. Influence of drugs on gap junctions in glioma cell lines and primary astrocytes in vitro. *Front Physiol*. 2014;5:186.
- Wang X, Bukoreshtiel NV, Gerdes HH. Developing neurons form transient nanotubes facilitating electrical coupling and calcium signaling with distant astrocytes. *PLoS One*. 2012;7(10):e47429.

SUMMARY

Abbreviations

Cx or Cxs –	connexin or connexins, respectively;
EPB –	epithelial bridge;
FBS –	foetal bovine serum;
GJ or GJs –	gap junction or gap junctions, respectively;
HeLa cells –	cells derived from cervical carcinoma samples of Henrietta Lacks in 1951. They were the first human cells that could grow indefinitely <i>in vitro</i> ;
LSCC –	laryngeal squamous cell carcinoma;
LUHS –	Lithuanian University of Health Sciences;
hMSCs –	human mesenchymal stem cells;
mRNA –	messenger RNA;
miRNA –	microRNA;
siRNA –	short interfering RNA;
TT or TTs –	tunnelling tube or tunnelling tubes, respectively.

INTRODUCTION

Tissues of living organisms are well-organized systems of communicating cells. Synchronization of intercellular communication is essential for physiological processes in multi-cellular organisms, for example, it is critical during development, embryogenesis, tissue regeneration, cellular differentiation, cell survival, reprogramming, and migration, as well as for immune response or maintaining of vital functions and homeostasis. Moreover, direct cell-to-cell interaction is important for initiation and progression of pathological processes such as carcinogenesis, viral and bacterial infections as well as neurodegenerative and autoimmune diseases [157, 177]. Importance of intercellular communication by transferring long-term and short-term information and diversity of mechanisms increases with the complexity of the organisms.

Information, nutrients, organelles or pathogens are transferred between cells in different ways. Direct cell-to-cell interaction is necessary for most of these signalling processes. It was thought until the end of the last century that all possible mechanisms of cell-to-cell communication are already discovered [99]. However, in 2004, the two major breakthroughs in this field were announced. First of all, a small vesicles of 30 to 90 nm in diameter, so called exosomes, containing instructive molecules that are

stored and transported inside, were described [51]. At nearly the same time, thin actin-based membrane structures formed between remote cells, i.e. rat pheochromocytoma cells, human embryonic kidney cells or normal rat kidney cells were discovered *in vitro* and named tunnelling nanotubes due to their nano-scale size [158] as well as transient networks of membranous tunnelling tubes (TTs) between immune cells were observed and described by another independent research group [136]. These structures allow selective direct transfer of membranous vesicles and organelles from one cell to the connected one through TT [136, 158]. Subsequent studies revealed the presence of TTs between different cell types *in vitro*, including epithelial and immune cells [42, 56, 135, 136, 181], stem cells [139] and neurons [195, 222]. Cells of different types may also communicate with each other through membranous TT's, i. e. heterocellular TT's may connect cardiofibroblasts with cardiomyocytes [66], progenitor stem cells or endothelial cells with remote tumor cells [139]. Studies revealed a significant heterogeneity of membranous TTs morphology and functional features; in addition, they have been shown to support transfer of various components between cells over long distances and it may not only be small molecules such as glucose, glutathione, glutamate, cAMP, IP₃, and ATP or ions like sodium (Na⁺), potassium (K⁺) and calcium (Ca²⁺) [4, 178, 202], but also lysosomal and intracellular vesicles with different small organelles such as early endosomes, endoplasmic reticulum, and Golgi complex [82, 83, 88, 178, 195, 198] or even relatively large organelles such as mitochondria [57, 88, 93, 116, 139]. Primary spread mechanisms in host organism for various pathogens including intercellular transfer of bacteria [135], most viruses, including human immunodeficiency virus (HIV) [82, 83, 171, 181] and human T-cell lymphotropic virus (HTLV) [191], as well as prions [61, 62, 123, 195, 222] and other pathogenic proteins such as HIV 1 *Nef* protein [210], β -amyloid [61, 195], and pathological Huntington protein [36] are all associated with membranous TTs. Cellular migration and bacterial recognition are also associated with formation of membranous TTs between remote cells (reviewed in refs. [4, 12, 68, 88]). Thus, accumulating number of evidence over last decade not only indicates vital role of membranous TTs in development, cell reprogramming and tissues regeneration processes, but also their association with a variety of pathologies. It is noted that there is a wide range of functions performed by different types of membranous TTs, nevertheless some consistent patterns associated with pathogenesis of diseases, such as neurodegenerative diseases or cancer, are also emerging. Therefore, there is a well recognized need to further investigate the formation mechanisms and functions of different membranous TTs in order to understand pathogenesis, prevention and new treatment possibilities of

incurable or difficult to treat diseases such as various tumors, including glioblastomas, or neurodegenerative diseases; however, mechanisms of formation and functions of different TTs has not been completely elucidated yet. In 2012, when we started to collect data for our research, there was very small amount of published data about presence of TTs in tissues and no available information in the literature about the presence of these structures in humans and their role in carcinogenesis. To our knowledge, at the time of publication of our research data, there was only one publication available about the presence of TTs in human malignant tumors [110] and no data in the scientific literature could be found on TTs in other malignant tumors, including squamous cell carcinoma of the head and neck region. There was a lack of knowledge about presence of transfer of higher molecular weight materials through TTs and its mechanisms. Furthermore, there was no notion nor evidence of direct genetic transmission through TTs to remote cells.

Recently, it has been proposed that connexins (Cxs), in addition to their canonical function of composing gap junctions (GJs), play a channel-independent role in cell adhesion, migration, division, differentiation, and tumorigenicity (reviewed in ref. [130]); however, the role of different Cxs on the ability of cells to form membranous TTs and on intercellular communication through TTs between remote cells as well association of TTs with ability of cell to move was not described.

The aim of the study

The aim of this research was to investigate the formation mechanisms of membranous TTs between human laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) cells and to describe their features as well as the role of Cxs in HeLa cell mobility and intercellular communication through membranous TTs.

Objectives of the study

- 1) To investigate the properties of membranous TTs between remote LSCC cells:
 - formation mechanisms of TTs, their geometry and morphology;
 - electrical properties of TTs;
 - permeability of TTs to substances of different molecular mass and charge;
 - to investigate possibility of LSCC and HeLa cells to form heterocellular TTs with human mesenchymal stem cells (hMSCs);

- 2) to investigate the existence of TT-like structures in LSCC tissue;
- 3) to examine the impact of exogenous Cx36, Cx40, Cx43, Cx45 and Cx47 on mobility of model HeLa cells and formation of membranous TTs between them.

Relevance of the research and its scientific novelty

Various studies have shown different ways of formation of membranous TTs between remote cells and there is large diversity of their geometry, morphology, and survival as well as functions in physiological and pathological processes. Initially, description of membranous TTs *in vitro* in 2004 triggered a broad discussion regarding ability of cells to form membranous TTs *in vivo*. At first, it was claimed that this property exists only in cells *in vitro*.

Before starting to collect data for this research, including my dissertation, there was only limited information in literature about relevance of membranous TTs in carcinogenesis. Only few publications with data of *in vitro* studies using adrenal gland [158], prostate [193], colon [29] and glioma cells [144] are found and no data on membranous TTs in tumors *in vivo* or *ex vivo*, including data about TTs in laryngeal squamous cell cancer tissues are found. The first reports about membranous TT-like structures in tissues, i. e. mouse cornea and human pleural mesothelioma or adenocarcinoma tissues, were reported during my doctoral studies [110, 139, 170]; however, we have described for the first time two types of membranous TTs containing F-actin alone or both F-actin and microtubules in LSCC culture and TT-like structures in tissues *ex vivo* as well as 5 formation modes of membranous TTs between remote LSCC cells *in vitro*. We have also discovered and described for the first time mitochondrial network inside membranous TTs between remote LSCC cells.

The electrical coupling and cargo transfer through membranous TTs between remote cells are not completely explored until now; therefore, we investigated and quantified the permeability of membranous TTs formed by different modes between remote LSCC or between HeLa cells expressing different exogenous Cxs. We have also described for the first time impact of different Cxs on formation of membranous TTs between remote model HeLa cells *in vitro* as well as impact of different Cxs in HeLa cells mobility. Furthermore, our group is the first one and for time being the only one to describe the possibility of direct siRNA transfer through membranous TTs between remote LSCC containing GJs formed by Cx43 or between remote HeLa cells expressing different transfected Cxs.

International interest on our publication with data of LSCC study show

the relevance and significance of these data
(<https://globalmedicaldiscovery.com/key-scientific-articles/long-distance-communication-laryngeal-carcinoma-cells/>).

MATERIALS

Our investigations with LSCC cells were performed in accordance with the principles outlined in the Declaration of Helsinki and approved by Kaunas Regional Bioethics Committee (BE-2-34, 2007). Histologically confirmed LSCC tissue samples were collected in accordance with the protocol approved by the Institutional Review Board, Lithuanian University of Health Sciences (LUHS). The primary LSCC cell culture was prepared from part of the tumor tissue sample as described in our publication [223], while the second part was used for a histological examination, which revealed the typical properties of LSCC (Fig. 1A with insertion [223]). Experiments were performed on LSCC cells, which have had a natural expression of Cx43 and were prepared as described in our publication [223] and on HeLa (human cervical carcinoma, ATCC CCL-2, Manassas, VA, USA) cells stably transfected with Cxs fused with green or cyan fluorescent proteins, i. e. Cx36-EGFP, Cx40-CFP and Cx43-EGFP) or Cxs without fluorescent marker (Cx45 and Cx47). Stable HeLa cell lines expressing Cxs used in this research study were obtained in collaboration with the laboratory of Dr. F. Bukauskas (Albert Einstein College of Medicine, New York, USA). Human mesenchymal cells (hMSCs) were purchased from Lonza (Walkersville, MD, USA).

Cells for experiments were grown in DMEM medium containing 10 percent foetal bovine serum (FBS), penicillin/ streptomycin mix (100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin; Gibco Laboratories). Typically, the cells *in vitro* were analyzed on the second day after passage [223, 224], after that, glass coverslips were transferred to an experimental chamber with constant flow-through perfusion mounted on the stage of the inverted microscope Olympus IX81 equipped with the Orca-R² cooled digital camera, fluorescence excitation system MT10 (Olympus Life Science Europa GmbH, Hamburg, Germany), and fluorescence imaging system XCELLENCE. Experiments were performed at room temperature in modified Krebs-Ringer solution (all solutions used are described in our publications [223, 224]).

METHODS

Electrical coupling between LSCC cells was investigated using the dual whole-cell patch-clamp technique. Electrophysiological and fluorescence recordings were performed simultaneously for visualization of materials permeability through TTs, including mitochondria, DAPI stained materials and siRNA transfer. Time-lapse imaging was performed for investigation of LSCC cells or HeLa cells mobility and TTs formation between them as well as for wound healing assay in the culture medium. Electrophysiological and fluorescence recordings as well as time-lapse imaging were most often combined and performed simultaneously. Cell migration analysis was performed by wound healing assay. Morphology of membranous TTs between LSCC cells or HeLa cells and expression of Cxs in LSCC cell culture were investigated using immunocytochemistry and fluorescence methods. All methods used for this research study are described in our publications [223, 224]. The analysis was performed using SigmaPlot software (Systat, Richmond, CA, USA), and averaged data are reported as means $\pm$ SEM. For statistical evaluation, the Student's test was used and a difference was considered statistically significant when p was < 0.05 .

RESULTS AND DISCUSSION

Properties of membranous TTs between LSCC cells *in vitro*

Experiments were performed on endogenous Cx43 expressing LSCC cells between 5 to 15 passages, when they manifested high proliferation rates *in vitro* (Fig. 1C [223]) and mobility (19.4 ± 2.8 mm/h; $n = 20$), and low membrane potential (-13.7 ± 1.2 mV; $n = 40$). No significant differences in the division rate were observed between 5 to 15 passages. We have identified the possibility of remote LSCC cells to communicate directly with each other over long distances, up to 1 mm, through membranous TTs *in vitro*, we described their geometry and morphology as well as identified and described 5 formation modes of membranous TTs between remote LSCC cells *in vitro*. The incidence of membranous TTs formation was determined by counting TTs between remote LSCC cells on the 1.2 cm diameter coverslip with 3,564 cells (about 3,200 cells per cm^2). We counted 136 membranous TTs formed in different ways (modes of formation of these TTs are described below). The thickest (up to 5 μm at the most narrow site) and the longest (up to 1 mm) membranous TTs *in vitro* that could be seen under low magnification were resembled epithelial bridges, EPBs, described by Zani [215]. They are indicated by yellow

arrows in Fig. 1B [223]. LSCC cells formed also much thinner ($< 1\ \mu\text{m}$) and shorter (up to $100\ \mu\text{m}$) membranous TTs (table 1 [223]) resembling those first characterized by Rustom and colleagues [158].

F-actin and α -tubulin are essential in the formation of membranous TTs or epithelial bridges (EPBs) [4, 214]. F-actin is considered to be a marker of tunnelling nanotubes [116, 158]. Two types of membranous TTs connecting LSCC cells *in vitro* were identified by subsequent staining with phalloidin for identification of F-actin and anti- α -tubulin for identification of microtubules as described in our publication [223]: 1) type of only F-actin based TTs (27 percent; $n = 136$); and 2) type of TTs containing both F-actin and α -tubulin (73 percent). It is known that inhibitors of actin polymerization, such as cytochalasin B or D, disrupt the formation of membranous TTs, but they have a limited effect on already existing TTs [25, 177]. We have observed no network of TTs in culture of freshly seeded LSCC cells preincubated with latrunculin A (20 nM), another inhibitor of actin polymerization. Preincubation of LSCC cells possessing the already developed TTs network for 24 hours with colchicine (10 mM), an inhibitor of microtubule polymerization, resulted in a complete loss of membranous TTs (Fig. 1D [223]). This finding support the hypothesis that F-actin is important only in the initial event of TTs formation, but it is not the requisite in later stages of TT elongation or stabilization [197]. It is argued that the actin filaments even can not directly drive the protrusion, but only stabilize the spine generated by the membrane deformation [74]. Microtubules are several times more flexible than actin filaments [58]; therefore, it is suggested that microtubules containing membranous TTs are more resistant to environmental influences and have a longer lifetime [12].

Membranous TTs connecting LSCC cells *in vitro* did not contact the substrate (Figs. 1E–G [223]) like other membranous TTs [4, 158] or EPBs [214, 215] described by other researchers; however, the leading edge of growing lamellipodium-like extensions was usually attached to the substrate. Migrating cells can easily slide under the membranous TTs in LSCC cell culture (Fig. 7A [223]). We demonstrated that membranous TTs formed between LSCC cells in culture were not attached to the substrate by applying positive or negative pressure to the selected TT through a broken patch pipette (Figs. 1E–G [223]) and measuring the rise of TTs over the substrate (Figs. 3F, 3G, 4E, 4F, 5F and 5G [223]).

Modes of the membranous TTs formation

The analysis of time-lapse imaging allowed us to distinguish the following formation modes of membranous TTs connecting remote LSCC

cells *in vitro*: 1) TT1s were formed during cell division and subsequent dislodgment; 2) TT2s were formed by the extensions of rear lamellipodium attached to the remote cell; 3) TT3s were formed by secondary lamellipodium outgrowing from leading or rear lamellipodium; 4) TT4s were formed by the intersection of rear or secondary lamellipodium; 5) TT5s were formed by filopodium-like extensions or protrusions.

The typical steps of TT1 formation are shown in Figs. 2A–D [223]. A mature LSCC cell round up entering mitosis and divide into 2 cells preserving the cell-to-cell contact through membranous TT1 during their dislodgement. TT1s were the longest and thickest TTs, up to 1 mm in length and 5 μm in diameter and they were raised above substrate. TT1s contained both F-actin and microtubules suggesting that these TTs might participate in the bidirectional transport of cargoes [11, 30, 135].

TT2s were formed by the extensions of rear lamellipodium and subsequent attachment of the protrusion to the remote LSCC cell (Figs. 3A–G [223]). The length of TT2s was up to 500 μm and their diameter at the most narrow site was about 1–3 μm (table 1 [223]) and they were raised above substrate too. In addition to F-actin and α -tubulin, the crawling endings of lamellipodium usually contained also Cx43 hemichannel clusters, which can be utilized to form functional GJs when the membrane of growing protrusion comes into contact with a membrane of remote cell as confirmed by patch-clamp measurements (described below).

TT3s were formed by the extensions of secondary lamellipodium outgrowing from leading or rear lamellipodium (Figs. 4A–F [223]). TT3s also contained both F-actin and α -tubulin and they were raised above substrate. The length of TT3s was up to 300 μm , while their diameter at the most narrow site was about 0.5–2 μm (table 1 [223]). TT3s also contained functional Cx43 GJs as confirmed by patch-clamp measurements (described below).

Due to high mobility of LSCC cells *in vitro*, their rear or secondary lamellipodium extensions can intersect forming TT4s and establishing functional Cx43 GJs (Fig. 4G [223]) as confirmed by patch-clamp measurements (described below). This finding belongs exclusively to our research group, since this possibility of TT4s formation mode was reported till now exclusively by our group. Such connections can also be established when one of these spindling extensions reach and anchor with its crawling edge to the lamellipodium of the second cell.

TT5s were the thinnest and shortest membranous TTs (table 1 [223]) formed between LSCC cells *in vitro* when cells first came into contact and, thereafter, moved apart or when filopodium-like protrusions (single or multiple) from one cell connected to the remote cell presumably by forming

anchoring junctions containing N-cadherin and β -catenin as identified by Lokar and colleges [107]. Two protrusions from the opposing remote cells can also find each other and form TT5s establishing functional GJs between their tips, where Cx43 accumulation can be seen (Fig. 4G [223]). TT5s were raised above substrate too, but they have had different structure than TT(1–4)s because they were without microtubules. In most cases, TT5s are formed Cx43 GJs at the cell border, and their functionality was confirmed by a dual whole-cell patch-clamp measurement of voltage gating typical for GJs (described below).

Electrical properties of TTs between LSCC cells *in vitro*

Based on literature, Cx43, Cx30, and Cx26 have been identified in the laryngeal epithelial cancers without alterations in their expression during carcinogenesis [168]. Staining with specific antibodies revealed that indeed Cx43, Cx30, and Cx26 are expressed in LSCC cell culture and in tissues (Fig. 3.4.1.1 in page 46 of this dissertation); however, electrophysiological measurements have shown that only Cx43 could form functional GJs *in vitro*, while Cx26 and Cx30 could be found rather as membranous and/or intracellular clusters of hemichannels.

Based on literature, single-channel conductance (open state / residual state) of human Cx26, Cx30, and Cx43 are 115–150/30, 160/27, and 90–110/30 pS, respectively [24, 60, 127]. To check whether this also applies to TT(2–5)s-mediated GJs, we registered single-channel currents using the dual whole-cell patch-clamp technique and applying octanol 0.5 mM, a GJs blocker, which strongly reduced electrical coupling between cells and allowed to record single-channel openings. We detected only single-channel currents and conductances typical for Cx43 GJs (Figs. 6I and 6J [223]). The mean single-channel conductance of open and residual states were 94 ± 6 pS and 32 ± 3 pS ($n = 11$) for abutted cells, respectively, and 93 ± 6 pS and 33 ± 3 pS ($n = 9$) for remote LSCC cells connected through TTs containing GJs, respectively.

Every GJ contain usually multiple functional channels. The mean conductance between abutted cells was 33.6 ± 6.2 nS ($n = 15$), and g_T between remote cells connected through TT(1–5)s is shown in table 1 [223]. The mean conductance of TT(2–5)s correlated well with their geometry (Fig. 6G [223]) as have been also described by other researchers [200], assuming that g_T depends directly on TT width and depends inversely on TT length as well as on existence of GJ at their contact sites [198]. The correlation was moderate in case of TT1s ($r = 0.65$) (Fig. 6F, where data are taken from table 1 [223]) and we believe that the correlation would improve

if an internal diameter of TT1s were estimated instead of external one. It is necessary to note that g_T was unrelated to geometry of membranous TT(2–5)s containing GJs in some experiments too, because neither TT length nor diameter as well nor protrusion ending size determine the size of junctional plaque as well as the total number of GJ channels or number of functional GJ channels in it like in case of abutted cells.

TT1s were typically open-ended, i. e. they did not possessed voltage gating characteristic of GJs (Figs. 6C and 6E upper panel [223]). TT(2–5)s containing GJs demonstrated voltage-gating properties (Figs. 6D and 6E lower panel [223]). In our experiments, about 20 percent (6 out of 32) of TT5s did not couple the cells electrically as it was carried out by other authors [200]. That may be associated with one of 3 possible reasons: 1) TTs were close-ended, probably involved only in cargo transport on the membrane or in the active vesicular transport, or pinocytosis of intracellular materials inside TTs; 2) GJ-dependent electrical coupling was not established yet in the process of *de novo* formation of TTs, because some maturation time is required for functionality of membranous TTs [63]; 3) GJ-dependent electrical coupling was already lost due to cell separation.

Permeability of TTs between LSCC cells *in vitro*

One of the goals of this study was to determine the permeability of membranous TTs formed by different modes to dyes that differ in molecular mass and charge. Various components were transferred between remote LSCC cells *in vitro* through TTs lumen and on TTs surface (Figs. 7C–E [223]). Based on literature, GJs allow the passage of molecules smaller than 1.2 kDa [131, 173]. We checked if membranous TTs between LSCC cells not containing GJs permitted the passage of larger molecules. Indeed, TT1s were permeable to at least 3 kDa molecules, such as AF488/3000. All TT(1–5)s were permeable to other used dyes of lower molecular weight (AF350, LY, and DAPI), and permeability strongly depended on the net charge of the dye (summary of the TTs permeability properties is presented in table 1 [223]). Mean permeability of TT(2–5)s to fluorescent dyes correlated with their mean electrical conductance.

Mechanisms of cargo transfer through TTs are yet not full established. Based on literature, luminal transfer mechanism is associated with actin binding motor protein myosin Va [55]. Organelles and vesicles are transported it this way. We observed not only individual mitochondrias inside TT(1–4)s, but even a dense mitochondrial network (Fig. 7B [223]). However, we failed to detect mitochondria in TT5s. Our finding contributes to data of other researchers and may indicate that mitochondrial transfer

through TTs between remote LSCC cells is associated with microtubules and may be bidirectional. Based on literature, bidirectional mitochondrial transfer could be detected only within thick, but not in thin (nano scale size) membranous TTs [45, 110, 135] including heterocellular TTs [143]. Our pioneering finding about mitochondrial networks inside membranous TTs is very important because it shows possible mechanisms of physical energy and direct signal transmission between remote cells [169] and this may be another new possible treatment option [15, 76, 117, 148].

We observed extremely small, 1 to 2 μm in diameter, DAPI-stained vesicles in TT(1–4)s between remote LSCC cells (Fig. 7D [223]). These vesicles resemble DAPI-stained mitochondrial DNA detected in human osteosarcoma cell bodies [113]; however, the diameter of nucleoids with mitochondrial DNA is about 99 nm, i. e., much smaller than that of vesicles shown in Fig. 7D [223]. Even agglomerates of several nucleoids do not exceed 300 nm in diameter [95]. We assume that these microvesicles may contain mRNA or miRNA, suggesting a possible direct transfer of nuclear materials through membranous TTs between remote cells.

We performed fluorescence imaging experiments using control siRNA conjugated with Alexa Fluor-488 (siRNA/AF488) to verify if siRNA can be directly transported between remote LSCC cell via TTs containing or not containing GJs. Evidence of siRNA/AF488 transfer through TT2 is demonstrated in Figs. 8A–F [223]. In addition, we performed similar experiments using octanol (0.5 mM; 15 min), GJs blocker, to confirm possible siRNA/AF488 transfer through TTs containing GJs during the process of dye accumulation in the cell-2. Octanol arrested siRNA/AF488 accumulation in the cell-2, which was reinitiated after the washout of GJs blocker (Fig. 8F [223]). Due to high molecular weight and net negative charge, the accumulation of siRNA/AF488 in the target cell was much slower than that of other fluorescent dyes used. In cases of TT1, P_T was $3.4 \pm 0.7 \times 10^{-12} \text{ cm}^3/\text{s}$ ($n = 4$) and, in case of TT2, $5.0 \pm 1.1 \times 10^{-13} \text{ cm}^3/\text{s}$ ($n = 6$) (summary of permeability properties is presented in table 1 [223]). Subsequent experiments with HeLa cells confirmed the possibility of siRNA/AF488 transfer through membranous TTs containing GJs and showed that the transfer of siRNA/AF488 depends on Cx expression (see our publication [224]).

Permeability of Cx43 GJ channels to siRNA and miRNA transfer between adjacent cells have been described by many investigators [20, 86, 90, 104, 188, 207]; however, the transfer of siRNA through membranous TTs containing Cx43 GJs and the impact of different Cxs on this transfer reported in our study has not been described elsewhere.

Membranous TTs-like structures in LSCC tissues

To date, only few publications about the existence of TTs-like membranous structures in tissues have been published. TTs-like structures were identified in the mouse corneal stroma [33], neonatal rabbit during nephron induction between mesenchymal and epithelial stem cells [125], specimens of human pleural mesothelioma and adenocarcinoma [110], and between migrating cells of human ovarian cancer explant cultures [139].

To determine whether TTs like membranous structures exist not only between LSCC cells *in vitro* but also in tissues, we analyzed samples taken from 6 patients with LSCC diagnose. In tissue sections *ex vivo* stained with phalloidin and anti- α -tubulin, we identified 2 types of structures like in the cell culture: first one, up to 1 μ m in diameter and up to about 100 μ m in length with solely F-actin threads spanning the entire length of structure (Figs. 9A–D [223]), which could be attributed to TT5s found *in vitro*; other structures were longer, up to 300 μ m, and thicker, about 2–3 μ m, with co-localizing both cytoskeleton components, F-actin and α -tubulin (Figs. 10A–D [223]). Moreover, in this case, mitochondria could as well be seen too co-localizing with F-actin (Fig. 10E [223]). Such structures could be attributed to membranous TT(1–4)s found *in vitro*. Unfortunately, in both cases, it was problematic to quantitatively assess the geometry of TTs as we did in the cell culture because 25 μ m tissue sections rarely contained entire and intact TTs.

The impact of different Cxs on formation of membranous TTs and mobility properties of HeLa cells *in vitro*

Experiments with HeLa wt cells and HeLa cells stably transfected with Cx36-EGFP, Cx40-CFP, Cx43-EGFP, Cx45, or Cx47 were carried out to examine the impact of different Cxs on the formation of membranous TTs and mobility properties of cells studied. HeLa wt cells without transfection were used as control. We have identified open-ended, close-ended, and GJs containing intercellular membranous TTs (formation frequency ratio 1:2:4, respectively) of various diameters (ranging from < 200 nm to > 2 μ m) and length (up to 70 μ m) between remote HeLa cells *in vitro* (Figs. 1A–C [224]). These membranous TTs were raised above the substrate; however, the leading edges of lamellipodium-like extensions were usually attached to the substrate and participated in cell mobility and TTs formation processes. They were involved in components transport either inside the membranous TTs or along their outer membrane (indicated by arrows in Figs. 1E–F [224]). None of Cxs isoform affected the geometry of TTs between remote

HeLa cells; however, the number of TTs calculated per 1 mm^2 was significantly higher between HeLa cells expressing Cx36-EGFP and lower between cells expressing Cx43-EGFP, Cx45, and Cx47 compared with HeLa wt cells (table 1 and Fig. 3 [224]). We identified 2 types of membranous TTs between HeLa wt cells or different Cx-expressing HeLa cells: TTs containing only F-actin or TTs containing both F-actin and α -tubulin (F-TTs and F α -TTs, respectively, in Figs. 2A–G [224]). On average, HeLa cells formed 17 percent and 83 percent of F-TTs and F α -TTs, respectively. This proportion was not affected by Cxs expression. Cells expressing different Cxs were able to form TTs with clusters of respective Cxs at the membrane interface with the remote cell (Figs. 2G and 2g [224]).

The mobility properties of different Cx-expressing HeLa cells *in vitro* were tested by the wound healing assay (Figs. 5A and 5B [224]). Occupation of the scraped area by Cx36-EGFP- and Cx40-CFP-expressing HeLa cells was faster compared with HeLa wt cells or Cx43-EGFP-, Cx45-, and Cx47-expressing HeLa cells; however, there were no statistically significant differences between HeLa wt cells and Cx43-EGFP-, Cx45-, or Cx47-expressing HeLa cells. The percentage of the occupied scraped area after 12 h was as follows: in HeLa wt cells culture, 42.8 ± 6.0 percent; HeLa Cx36-EGFP, 69.6 ± 5.4 percent; HeLa Cx40-CFP, 68.3 ± 6.7 percent; HeLa Cx43-EGFP, 29.7 ± 1.1 percent; HeLa Cx45, 29.0 ± 2.4 percent; and in HeLa Cx47 cells, 35.3 ± 3.3 percent.

Heterocellular membranous TTs *in vitro*

HeLa cells with exogenous Cx43 expression and LSCC cells with natural Cx43 expression could form membranous TTs containing functional Cx43 GJs with mesenchymal stem cells *in vitro* (Fig. 3.7.1 in page 64 of this dissertation). Functionality of these GJs was confirmed using patch-clamp method. This finding could be beneficial in solving some problems associated with new treatment possibilities. The specific gene inhibition is one of these promising new therapies for neurodegenerative diseases and malignancies; however, the insertion of exogenous siRNA into the target cell *in vivo* is the major problem [20]. This problem may be dissolved by using the human mesenchymal stem cell (hMSC) based siRNA delivery system for repair of injured and diseased tissues and to treat cancer [9, 13], because hMSC cells are not immunogenic [120], they exhibit high proliferative potential, express Cx43, and they may form membranous TTs containing functional GJs with remote tumor (HeLa and LSCC) cells.

CONCLUSIONS

- 1) We have demonstrated and described the ability of LSCC cells to form membranous TTs and properties of membranous TTs:
 - Five formation modes of membranous TTs *in vitro* were identified and described.
 - The ability of LSCC cells to directly communicate over long distances (up to 1 mm) through TTs of various diameter and length was shown and described. These TTs can be open-ended, close-ended or containing functional GJs.
 - *In vitro*, we have identified two morphological types of membranous TTs between remote LSCC cells with natural Cx43 expression: F-actin rich only or containing both F-actin and microtubules.
 - We provided quantitative assessment of electrical coupling through TTs between remote LSCC cells. TTs were usually open-ended, i. e. they did not have GJs. The mean electrical conductances through TT(2–5)s correlate well with their geometry as well as was dependent on GJs functionality.
 - We provided quantitative assessment of permeability of membranous TTs between remote LSCC cells. The permeability was dependent on molecular mass and charge of cargo, but also on GJs functionality.
 - We have demonstrated transfer of mitochondrias and a dense mitochondrial network inside membranous TTs.
 - We have demonstrated the ability of LSCC and HeLa cells to form heterocellular TTs with human mesenchymal stem cells.
 - We have demonstrated and described a direct transfer of genetic material (DAPI stained components, siRNA-AF488) between remote cells through TTs containing and not containing GJs.
- 2) We identified two types of TTs-like structures in LSCC tissues: one type containing only F-actin and second type containing both F-actin and microtubules.
- 3) None of tested Cxs type affected geometry, i. e. length or diameter of TTs between remote HeLa cells. Cx expression affected:
 - mobility of HeLa cells: Cx36-EGFP- and Cx40-CFP-expressing HeLa cells demonstrate better mobility properties, compared with HeLa cells expressing other Cxs tested or HeLa wt cells.
 - density of TTs network: Cx36EGFP promotes while Cx43EGFP, Cx47 and especially Cx45 inhibit formation of TTs.

CURRICULUM VITAE

Personal information:

Name and vorename: Renata Sveikatiene
Birthdate: 4th March 1964
Marital status: Married.
Sons:
Lukas (born in 1988),
Petras (born in 1992),
Benjaminas (born in 1997).
E-mail: renata.sveikatiene@lsmuni.lt

Education:

2012 to 2016 Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Biomedical Sciences, Biophysics PhD studies
1982 to 1988 Kaunas Medical Institute, Medicine Faculty
1971 to 1982 The first secondary school of Jurbarkas, Cum Laude
Work experience:
since 08-09-2008 Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy: Lecturer at the Institute of Physiology and Pharmacology (since 26-05-2015); Junior Researcher at the Cell culture laboratory of the Institute of Cardiology (since 01-06-2012)
1988 to 2010 Physician in the Dainava Outpatient Clinic of the Kaunas city

Research data associated with this dissertation were presented at 20 conferences, including VIth Nacional Scientific Conference of PhD students in 2013 where the oral presentation was awarded two special prizes (one special prize of „Medicina“ journal and another special prize of sponsor Thermo Fisher Scientific) and VIIIth National Scientific Conference of PhD students in 2015 where the presentation was awarded the first place.

PADĖKA

Dėkoju mokslinio darbo vadovui prof. Vyteniui Arvydui Skeberdžiui už pasitikėjimą ir galimybę dalyvauti *LSCC* naviko tyrimų projekte, suteiktas žinias, reiklumą, pagrįstą kritiką, patarimus ir pagalbą vykdant tyrimus, analizuojant jų duomenis, rengiant publikacijas bei rašant disertaciją. Esu dėkinga visam Ląstelių kultūrų laboratorijos kolektyvui už palaikymą, įvairiapusę pagalbą visų doktorantūros studijų metu, kartu patirtą atradimų džiaugsmą ir išgyvenimus ruošiant publikacijas. Ypač ačiū kolegėms dr. Linai Rimkutei ir tyrimams naudotas *LSCC* ląstelių linijas sukūrusiai dr. Ievai Antanavičiūtei, kurioms padedant, pavyko greičiau suvokti tyrimų metodų subtilybes. Dėkoju LSMU Ausų, nosies ir gerklės ligų klinikai už pateiktą medžiagą, iš kurios buvo pagamintos pirminės *LSCC* ląstelių linijos, bei Anatomijos instituto darbuotojams, ypač dr. Kristinai Rysevaitei-Kyguolienei už pagalbą tiriant audinių preparatus. Dėkoju LSMU Mokslo fondui už paramą doktoranto moksliniams tyrimams. Dėkoju šeimai už suteiktą galimybę studijuoti ir didžiulį palaikymą, kurį jaučiu kiekvieną dieną.