

Nataša Resnik¹, Mateja Erdani Kreft²

Vloga tunelskih nanocevk v medceličnem sporazumevanju in (pato)fiziologiji

The Role of Tunneling Nanotubes in Intercellular Communication and (Patho)Physiology

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: citoskeletni elementi, kokultura, medcelično sporazumevanje, onkoproteini, tarčno zdravljenje, tunelske nanocevk, urothelijske celice

Medcelično sporazumevanje je osnovni proces, ki omogoča normalen razvoj, obnovo in preživetje celic ter tkiv. Med načine medceličnega sporazumevanja uvrščamo tudi nedavno odkrite tunelske nanocevk, ki so tanki cevasti membransko-citoplazemski izrastki, ki *in vitro* in *in vivo* med seboj povezujejo različne tipe celic. Tunelske nanocevk delujejo kot sporazumevalni tuneli, saj omogočajo, da se iz donorske celice v tarčno celico prenese celični tovor, kot so celični organeli, lipidi, beljakovine, nukleinske kisline in signalne molekule, kot tudi necelični material, kot so patogeni in nanodelci. Kadar pride do prenosa škodljivega tovora (poškodovani organeli, onkoproteini, patogeni), imajo tunelske nanocevk patofiziološko vlogo, saj sodelujejo tako pri nastanku bolezni kot tudi pri njenem razširjanju. Tunelske nanocevk različnih tipov celic se razlikujejo po dolžini, premeru, nastanku ter po sestavi citoskeletnih elementov. Iz strukturne heterogenosti tunelskih nanocevk najverjetneje izvirajo tudi raznolikosti v njihovi funkciji. Razumevanje strukture in funkcije tunelskih nanocevk je nujno za razumevanje nastanka bolezni in možnosti njihovega zdravljenja. Ta prispevek opisuje strukturne in molekularne lastnosti tunelskih nanocevk, njihov nastanek in njihove funkcije ter predstavlja nekatera najnovejša dognanja o uporabi tunelskih nanocevk v namene zdravljenja.

ABSTRACT

KEY WORDS: cytoskeletal elements, coculture, intercellular communication, oncoproteins, targeted therapy, tunneling nanotubes, urothelial cells

Intercellular communication is a vital process that enables normal tissue development, cell renewal, and survival. The recently discovered tunneling nanotubes are one of the types of intercellular communication. They are thin tubular membrane-cytoplasmic protrusions that connect different cell types *in vitro* and *in vivo*. Tunneling nanotubes act as communication tunnels by allowing the transport of cellular cargo such as cell organelles,

¹ Doc. dr. Nataša Resnik, univ. dipl. biol., Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

² Prof. dr. Mateja Erdani Kreft, univ. dipl. biol., Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; mateja.erdani@mfn.uni-lj.si

lipids, proteins, nucleic acids, as well as non-cellular material such as pathogens and nanoparticles from the donor cell to the target cell. When a deleterious cargo (damaged organelles, oncoproteins, and pathogens) is transferred, tunneling nanotubes play a pathophysiological role by participating in both the onset of disease and its spread. Tunneling nanotubes are thus highly heterogeneous in terms of function, and this is likely also the origin of their structural heterogeneity. Tunneling nanotubes of different cell types differ in length, diameter, formation, and composition of cytoskeletal elements. Understanding the structure and function of tunneling nanotubes is critical to understanding disease and treatment options. This review describes the mechanisms of formation and the role of tunneling nanotubes known to date and presents some of the latest findings on the use of tunneling nanotubes for therapeutic purposes.

UVOD

Sposobnost medsebojnega sporazumevanja celic je predpogoj za fiziološko delovanje celic, tkiv in organizmov. V patofizioloških okoljih lahko medcelično sporazumevanje kot odziv na neugoden okoljski stres prispeva k nastanku in napredovanju bolezni ter k preživetju celic, tkiv ali organizmov. Sporazumevanje poteka na dolge razdalje s stikom (kontaktno, neposredno) ali brez njega (nekontaktno, posredno). Brez stika poteka s signalnimi molekulami, ki dosežejo membranske receptorje oddaljenih celic. Primer je endokrino signaliziranje, kjer endokrine celice sproščajo hormone v krvno žilje in sprožijo odziv v tarčnih celicah v telesu. Po krvni žilji se lahko razširjajo tudi zunajcelični vezikli. To so vezikli, obdani s fosfolipidnim dvoslojem, ki nastajajo z odcepljanjem neposredno iz plazmaleme donorske celice (mikrovezikli ali ektosomi) ali pa z eksocitozo multivezikularnih teles (eksosomi). V notranjosti veziklov so sestavine donorske celice, kot so npr. beljakovine, lipidi in nukleinske kisline, in ti ob zlivanju veziklov s tarčno celico vplivajo na njeno delovanje.

Neposredno sporazumevanje oz. sporazumevanje s stikom poteka na krajše razdalje preko presledkovnih stikov. Gre za medcelične kanalčke, ki jih gradijo beljakovine koneksini in predstavljajo neposredno povezavo citoplazme dveh celic.

Kanalček je prehodni samo za ione in majhne vodotopne molekule velikosti < 1 kDa. Sporazumevanje s stikom je možno tudi na daljše razdalje s tunelskimi nanocevkami (angl. *tunneling nanotubes*, TNT), o katerih so pred 20 leti prvič poročali Rustom in sodelavci (1). Ta način sporazumevanja bomo v prispevku natančneje opisali.

TNT so prvič opazili med živimi celicami linije PC12, ki izvirajo iz tumorja nadledvične žleze podgane (feokromocitoma), in med celicami linije normalnih podganjih ledvičnih (angl. *normal rat kidney*, NRK) celic. V celicah linije PC12 in NRK so TNT s fluorescenčnim mikroskopom opazili kot drobne membransko-citoplazemske strukture po označitvi celice s fluorescenčnim označevalcem plazmaleme. 3D-rekonstrukcija slik je pokazala, da imajo TNT premer 50–200 nm, dolžino nekaj premerov celice ter da so TNT redko razvejane in brez povezave s podlago gojilne posode. Vloga TNT v medceličnem sporazumevanju je bila dokazana s snemanjem prenosa lizosomov znotraj TNT z označevalcem LysoTracker™ (Thermo Fisher Scientific Inc.®, Waltham, Massachusetts, ZDA) v živih celicah, vključenost aktivnega prenosa z aktinskimi filamentami pa z imunooznačevanjem motornega proteina miozina Va (1).

TNT so cevasti membransko-citoplazemski izrastki, ki povezujejo celice *in vitro* in *in vivo*. Znotraj TNT se prenašajo celične

sestavine, kot so organeli (mitohondriji, endosomi, ribosomi, vezikli iz Golgijevega aparata), lipidne kaplje, kratkoverižne nukleinske kisline, npr. mikro-RNA (miRNA), omogočajo pa tudi prenos neceličnih sestavin, kot so nanodelci, bakterije, virusi in beljakovinski skupki (2). Raznolikost tovora kaže na fiziološko in patofiziološko vlogo TNT v večceličnih organizmih, sodelujejo namreč tudi pri širjenju nalezljivih in nevrodegenerativnih bolezni ter imajo pomembno vlogo pri razvoju rakavih obolenj (2, 3). Medcelično sporazumevanje je v heterogenem tumorskem mikrookolju kritičnega pomena pri napredovanju bolezni, saj lahko vodi v razvoj odpornosti na kemoterapevtike. Raziskave TNT med rakavimi celicami ter med rakavimi in normalnimi (zdravimi) celicami *in vitro*, *in vivo* in na biopsijah bolnikov z rakom pripomorejo k razumevanju nastanka in napredovanja te bolezni. S tem se odpirajo tudi nove možnosti za razvoj učinkovitejšega zdravljenja raka.

Na Inštitutu za biologijo celice Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani raziskujemo medcelično sporazumevanje s TNT med rakavimi in normalnimi urotelijskimi celicami (epitelijske celice sečnega mehurja) (4–7). Raziskave potekajo na rakavih in normalnih urotelijskih celicah *in vitro* v monokulturah, kjer preučujemo TNT med celicami enega tipa, ter v kokulturah, kjer preučujemo TNT med celicami obeh tipov. Monokulture uporabljamo predvsem za ugotavljanje osnovnih značilnosti TNT, kot so frekvenca pojavljanja, dolžina, debelina, citoskeletna in lipidna sestava. Kokulture uporabljamo kot model, ki posnema sporazumevanje med normalnimi in rakavimi celicami *in vivo*. Ugotoviti namreč želimo, ali se v stresnih razmerah poveča tvorba TNT in koliko stresne razmere vplivajo na prenos tovora iz rakavih celic v normalne in obratno ter kako s tem vplivajo tudi na napredovanje ali nazadovanje bolezni. Ključni metodi za raziskovanje TNT sta svetlobna in elektronska mikroskopija.

MORFOLOŠKE IN MOLEKULARNE LASTNOSTI TUNELSKIH NANOCEVK

Morfološke in molekularne lastnosti TNT v največji meri poznamo iz raziskovanj v klasičnih dvodimenzionalnih (2D) celičnih kulturah. Od tod tudi izhajajo osnovna merila za določitev TNT.

TNT prepoznamo po tem (8):

- da povezujejo celice na razdalji, daljši od 10 μm ,
- da nimajo stika s podlago in imajo aktinske filamente kot osnovne citoskeletne gradnike ter tudi
- da omogočajo prenos različnega tovora med celicami, kot so ioni, beljakovine, RNA in organeli.

Našeta merila morajo biti izpolnjena, da TNT ločimo od celičnih izrastkov – filopodijev. Filopodiji so dinamični, kratki celični izrastki, običajno dolgi < 5 μm , pritrjeni so na podlago in ne omogočajo izmenjave snovi med celicami, saj niso medcelične povezave. Med celicami v klasični 2D-kulturi nastajajo bolj ali manj ravne TNT. Ločimo homotipične TNT, ki povezujejo celice istega tipa, ter heterotipične TNT, ki povezujejo različne tipe celic. Nekatere TNT imajo razcepišča in odebelitve, imenovane gondole (9, 10). S korelativno svetlobno-elektronsko mikroskopijo so ugotovili, da so gondole mesta nahajanja večjih veziklov in organelov (10). Z matematičnim modeliranjem so ugotovili, da je nastanek gondol posledica molekularne heterogenosti v membrani, kar se pojavi bodisi zaradi agregacije beljakovin bodisi zaradi sestave membrane (11). TNT najdemo tudi v 3D-*in vitro* modelih, kot so sferoidi in organoidi, ter *in vivo* v zdravem tkivu in tumorskih tkivih bolnikov (12–16). V slednjih so našli ravne in ukrivljene TNT ter tudi TNT z odebelitvami (gondolami) (15–17).

TNT so morfološko (glede na dolžino, premer) in molekularno (glede na citoskeletno sestavo, tovor) zelo heterogene (tabela 1). Heterogenost se pojavlja znotraj

Tabela 1. Primeri tunelskih nanocevk (angl. *tunneling nanotubes*, TNT) različnih tipov celic in njihove lastnosti. F-aktin – fibrilarni aktin, ND – ni določeno, NPU – normalne urotelijske celice (angl. *normal porcine urothelial*).

Celični tip	Dolžina TNT (µm)	Citoskeletni elementi	Tovor	Reference
Celice tumorja nadledvične žleze (feokromocitom, linija PC12)	6	F-aktin	mitohondriji, endosomi, lizosomi	(1)
Limfociti B	22	F-aktin, α-tubulin	vezikli, lizosomi, mitohondriji	(22)
Metastatske celice debelega črevesa (linija LoVo)	100	ND	onkoprotein K-Ras	(23)
Celice mikroglije (linija HMC3)	10–20	F-aktin, α-tubulin	mitohondriji, α-sinuklein	(24)
NPU	105	F-aktin, α-tubulin, citokeratin 7	mitohondriji, lizosomi, vezikli Golgijevega aparata	(6)
Neinvazivne urotelijske celice papiloma (linija RT4)	ND	F-aktin, citokeratin 7	ND	(9)
Mišično invazivne urotelijske celice (linija T24)	32	F-aktin, citokeratin 7, α-tubulin	mitohondriji, lizosomi, vezikli Golgijevega aparata	(6)

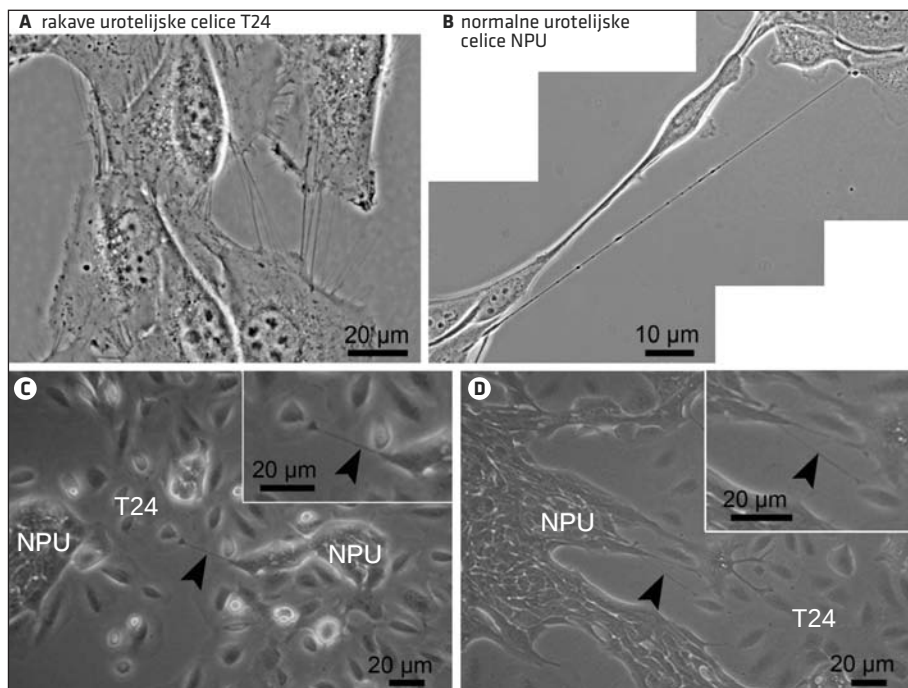
iste celične linije v danih fizioloških razmerah, dodatno pa k heterogenosti prispevajo stresne razmere, izzvane s fizikalnimi ali kemijskimi dejavniki, kot sta ultravijolično (UV) sevanje in brezserumski hranilni medij (18, 19). Tako celice PC12 tvorijo manj TNT, ki vsebujejo več mikrotubulov, kadar so obsevane z UV-sevanjem, kot kadar niso. Gojenje celic v brezserumskem hranilnem mediju je v astrocitih in nevronih sprožilo nastanek večjega števila TNT, v urotelijskih rakavih celicah pa se je število TNT zmanjšalo (19, 20).

Dolžina in premer tunelskih nanocevk

Dolžina TNT se razlikuje tako med različnimi tipi celic kot znotraj istega celičnega tipa (tabela 1). Večina TNT *in vitro* je dolgih od 10 do več 100 µm. Dolžina TNT je dinamično uravnana, saj se s premikanjem dveh celic, ki sta povezani s TNT, spreminja tudi dolžina TNT. Zanimiva je primerjava dolžine TNT normalnih in rakavih uro-

telijskih celic *in vitro* (slika 1). Normalne urotelijske celice imajo TNT dolge povprečno 105 µm, rakave pa 32 µm (6). Med normalnimi urotelijskimi celicami je bila dolžina najdaljših TNT približno 300 µm. TNT med normalnimi celicami povezujejo večje skupine celic (t. i. celične otočke), medtem ko TNT med rakavimi urotelijskimi celicami povezujejo posamične, sosednje celice (slika 1).

Tako kot dolžina se tudi premer TNT med različnimi tipi celic razlikuje. TNT celic feokromocitoma imajo premer 50–200 nm, TNT limfocitov pa 180–380 nm (1, 25). Premer TNT človeških makrofagov je lahko tudi večji od 700 nm (26). Debelina TNT je povezana tudi z vsebnostjo citoskeletnih elementov. V tanjših cevkah (premer < 700 nm) se nahajajo aktinski filament, v debelejših (premer > 700 nm) aktinski filament in mikrotubuli ter v nekaterih primerih tudi intermediarni filament (7). Z njihovo vključitvijo se poveča tudi trdnost TNT (6, 25, 26).

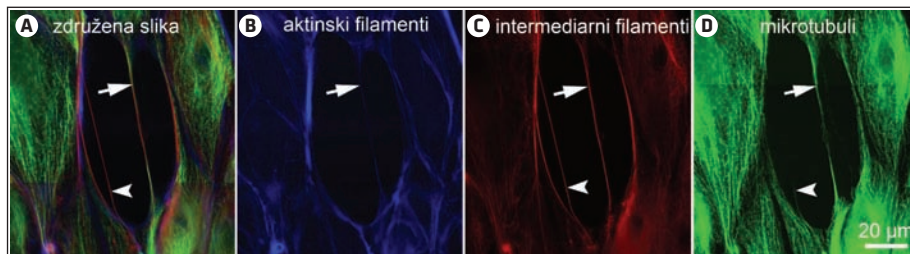


Slika 1. Tunelske nanocevkke (angl. *tunneling nanotubes*, TNT) med urotelijskimi celicami. TNT v monokulturi rakavih (A) in normalnih urotelijskih celic (B) ter kokulturi rakavih in normalnih urotelijskih celic (C, D). TNT med rakavimi celicami so krajše, številčnejše in povezujejo celice na krajših razdaljah kot TNT med normalnimi urotelijskimi celicami (A). TNT med normalnimi celicami so dolge in povezujejo večje skupine celic (t. i. celične otočke) (B) (7). V kokulturi normalnih in rakavih celic nastajajo TNT, ki povezujejo normalne in rakave urotelijske celice (glave puščic) (C, D). Slike so posnetki živih celic, posnetih z invertirnim mikroskopom. NPU – normalne urotelijske celice (angl. *normal porcine urothelial*), T24 – linija mišično invazivnih urotelijskih celic.

Citoskeletni elementi v tunelskih nanocevkah

Citoskeletni elementi sodelujejo pri izražanju TNT, so oporni elementi TNT ter skupaj z motornimi proteini omogočajo prenos tovora znotraj TNT. Zastopanost citoskeletnih elementov v TNT je odvisna od tipa celic (tabela 1). Razlikujemo TNT z enim citoskeletnim elementom (monocitoskeletne TNT), z dvema različnima citoskeletnima elementoma (bicitoskeletne TNT) in s tremi različnimi citoskeletnimi elementi (tricitoskeletne TNT) (6). Aktinski filamenti veljajo za glavne gradnike in s tem tudi označevalce TNT. Mikrotubuli se lahko v TNT nahajajo kot posamični citoskeletni

gradniki ali skupaj z aktinom oz. z intermediarnimi filamenti, npr. s citokeratini v urotelijskih celicah in s kislimi glialnimi fibrilarnimi beljakovinami (angl. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP) v astrocitih (27). V TNT so prisotni različni α -tubulini kot osnovni gradniki mikrotubulov. Acetiliran in tiroziniran α -tubulin prispevata k stabilnejši obliki TNT (26). Tako mikrotubuli kot tudi intermediarni filamenti povečajo togost TNT in s tem podaljšajo njihovo življenjsko dobo (21, 28). Tricitoskeletno sestavo TNT smo prvič odkrili v TNT normalnih in rakavih urotelijskih celic (slika 2). V normalnih urotelijskih celicah je bilo 57 %, v rakavih urotelijskih celicah pa 53 %



Slika 2. Citoskeletni elementi v tunelskih nanocevkah (angl. *tunneling nanotubes*, TNT) normalnih urotelijskih celic. Na združeni sliki (A) sta vidni dve TNT (glava puščice in puščica). TNT z bicitoskeletno sestavo (glava puščice) vsebujejo intermediarne filamente (C) in mikrotubule (D), TNT s tricitoskeletno sestavo (puščica) pa vse tri citoskeletne elemente (B, C, D). Aktinski filamenti (fibrilarni aktin (F-aktin)) so označeni s faloidinom, intermediarni filamenti s primarnimi protitelesi proti citokeratinu 7 in mikrotubuli s primarnimi protitelesi proti α -tubulinu.

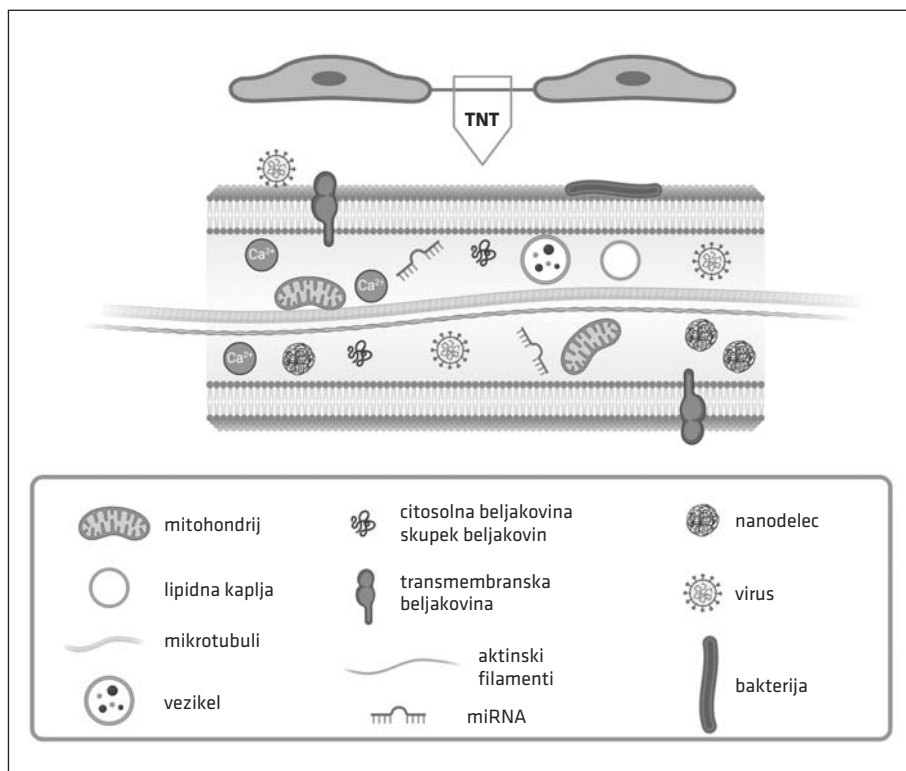
TNT s tricitoskeletno sestavo. V TNT z bicitoskeletno sestavo je v normalnih in rakavih urotelijskih celicah prevladovala kombinacija aktinskih filamentov in mikrotubulov. Monocitoskeletne TNT v normalnih urotelijskih celicah so vsebovale intermediarne filamente (citokeratin 7), v rakavih urotelijskih celicah pa aktinske filamente (6). Ugotovili smo tudi, da se v nekaterih TNT urotelijskih celic mikrotubuli razporejajo okoli intermediarnih filamentov v obliki vijačnice (4). Takšna organizacija domnevno pripomore k stabilizaciji TNT med njenim raztegovanjem ali krčenjem, ki se pojavi zaradi oddaljevanja ali približevanja celic.

Kljub pomanjkanju specifičnega označevalca lahko TNT prepoznamo tako, da fluorescenčno označimo plazmalemo ali citoskeletne elemente ter tanke povezave med celicami poiščemo s fluorescenčnim mikroskopom. Razumevanje sestave TNT na molekularni ravni je še vedno pomanjkljivo, saj se soočamo z glavno oviro – osamitvijo posameznih TNT. Za raziskovanje TNT sta trenutno poglavitni tehniki svetlobna in elektronska mikroskopija ter kombinacija obeh. Zaradi svoje tanke strukture TNT niso enostavne za raziskovanje, saj so občutljive na mehanski stres, kemijsko fiksacijo, osvetljevanje in temperaturne spremembe (25, 29).

PRENOS PO TUNELSKIH NANOCEVKAH

Tovor, ki se prenaša po TNT, zajema tako celične kot necelične sestavine, ki se prenašajo po citoplazmi TNT ali membranski zunajcelični strani TNT (slika 3). Med celičnimi sestavinami, ki se prenašajo po citoplazmi, so bili v TNT dokazani deli endoplazemskega retikuluma, vezikli Golgijevega aparata, endosomi, lizosomi, mitohondriji, lipidne kaplje in miRNA. Po plazmalemi TNT se prenašajo transmembranske beljakovine, kot so npr. transferinski receptor, dendritičnim celicam specifična transmembranska beljakovina (angl. *dendritic cell-specific transmembrane protein*, DC-STAMP) in mutirani K-Ras. Po citoplazmi TNT se prenašajo tudi necelične sestavine, kot so patogeni (virusi, prioni, bakterije), amiloidni skupki, nanodelci ter ioni (30–34). Prenos bakterij *Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin* (BCG) je prisoten na zunajcelični strani membrane TNT (26).

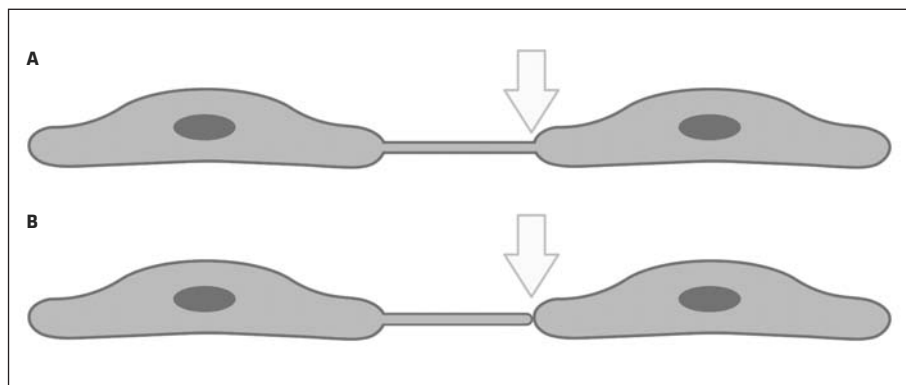
Prenos tovara po citoplazmi TNT zahteva, tako kot prenos po citoplazmi celice, citoskeletne elemente, motorne proteine in ATP. Motorni proteini so encimi ATPaze, ki hidrolizirajo ATP. Energija, ki se sprosti ob cepitvi vezi med ADP in fosfatom, omogoči konformacijsko spremembo, zaradi česar se motorni protein premakne vzdolž citoskeletnega elementa (35). Motorni proteini,



Slika 3. Shematski prikaz prereza tunelskih nanocevk (angl. *tunneling nanotubes*, TNT). Prenos po TNT poteka enosmerno ali dvosmerno, z motornimi proteini (niso prikazani) ter po aktinskih filamentih in mikrotubulih. Po citoplazemskem delu TNT se lahko prenašajo mitohondriji, različne beljakovine in mikro-RNA (miRNA), vezikli, lipidne kapljice ter nanodelec. Nekateri mikroorganizmi izkoriščajo TNT za prenos iz ene celice v drugo, in sicer po citoplazemskem delu TNT ali po zunajcelični površini membrane TNT. TNT – tunelske nanocevice (angl. *tunneling nanotubes*), miRNA – mikro-RNA.

kinezini in dineini, omogočajo prenos tovara po mikrotubulih, medtem ko miozini omogočajo prenos tovara po aktinskih filamentih. S prisotnostjo miozinov Va in X je bil dokazan prenos po aktinskih filamentih v TNT (1, 36). Tudi v TNT urotelijskih celic smo dokazali miozin Va ter dinein, ki tovor premika proti minus koncu mikrotubulov, in kinezin 5B, ki premika tovor proti plus koncu mikrotubulov. Tako smo potrdili dvosmerni prenos po mikrotubulih po TNT (37). Poleg razpoložljivih motornih proteinov je prenos tovara v tarčno celico odvisen tudi od ultrastrukture področja, kjer se TNT pripenja na tarčno celico. Znano je, da so TNT lahko odprtega tipa (angl. *open-ended*

TNT) ali zaprtega tipa (angl. *close-ended TNT*) (slika 4). Pri TNT odprtega tipa je med donorsko in tarčno celico neposredna povezava citoplazme in plazmaleme TNT ter tarčne celice, ki omogoča prehod večjim molekulam in celičnim organelom. Pri TNT zaprtega tipa pa je na meji med TNT in plazmalemo tarčne celice presledkovni stik, ki omogoča le prehod majhnih molekul velikosti < 1 kDa ter kalcijevih ionov (slika 4). Le-ti se najverjetneje širijo iz donorske v tarčno celico v smeri koncentracijskega gradienta (38). Prenos bakterij BCG po zunanji strani TNT makrofagov poteka tako, da se bakterije najprej ujamejo na površino TNT, nato pa se s konstitutivnim



Slika 4. Načina povezovanja celic s tunelskimi nanocevkami (angl. *tunneling nanotubes*, TNT). Kadar se na mestu povezave plazmalema TNT in plazmalema tarčne celice zlijeta (puščica), nastane TNT odprtega tipa (A). Kadar do zlitja ne pride in ni neposredne povezave med citoplazmama povezanih celic (puščica), nastane TNT zaprtega tipa (B).

tokom gradnikov plazmaleme pomikajo proti tarčni celici, ki jih fagocitira (26). Endocitoza je tudi eden od načinov prenosa snovi v TNT zaprtega tipa. Prehod tovora po TNT iz donorske celice v tarčno celico se sproži, pospeši ali poveča zaradi stresnih razmer (hipoksija, H_2O_2 , pomanjkanje seruma, UV-sevanje) (39).

VLOGA TUNELSKIH NANOCEVK V FIZIOLOŠKIH IN PATO(FIZIOLOŠKIH) PROCESIH

Čeprav večina raziskav prikazuje vlogo TNT pri nastanku ali razširjanju bolezni, prispevajo tudi k ohranjanju funkcij in homeostaze zdravega tkiva (slika 5). Od narave tovora je odvisno, ali bodo TNT delovale v prid zdravemu ali bolezenskemu stanju.

V nadaljevanju bomo osvetlili primere, kjer TNT prispevajo k normalnemu delovanju celic, ter njihovo vlogo pri nastanku in poteku različnih bolezni.

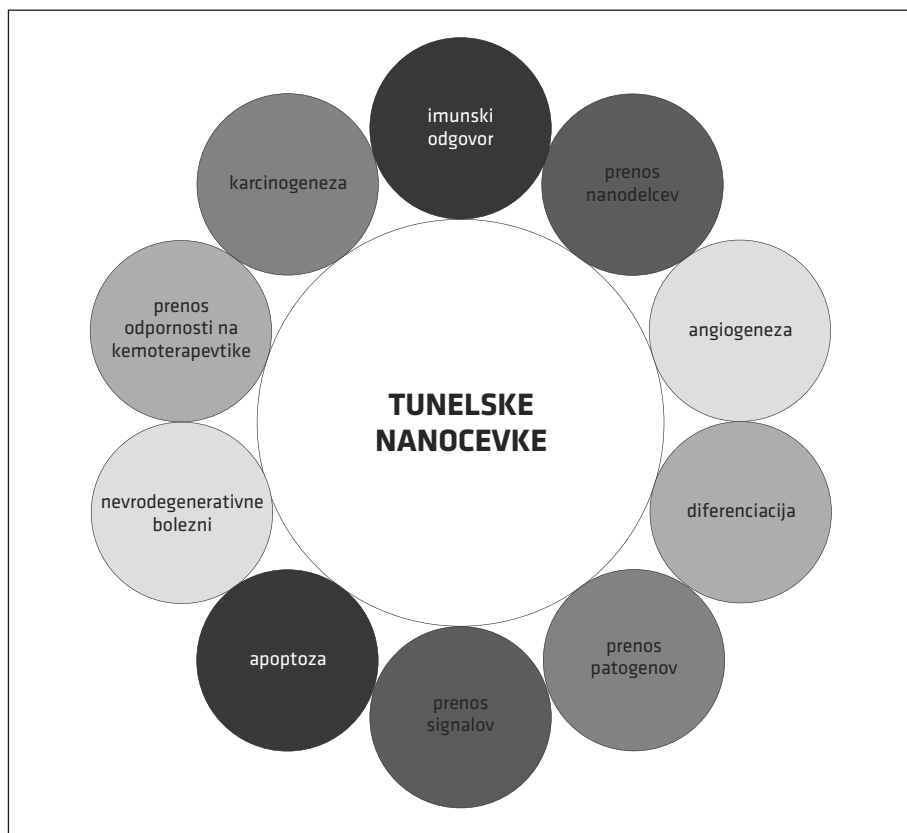
Vloga tunelskih nanocevk v fizioloških procesih

Vloga TNT je bila posredno dokazana pri angiogenezi razvijajočih se možganov človeka, in sicer na tkivnih rezinah zarodka v 22. tednu gestacije. Errede in sodelavci so

našli TNT, ki so povezovale pericite krvno-možganske pregrade s periciti oddaljenih kapilar (40). Nakazana je bila tudi vloga TNT pri hitrejši in boljši predstavitvi antigenov. V tem primeru so ugotovili, da se po membranski strani TNT celic raka materničnega vratu, imenovanih HeLa (osamitev iz tumorja bolnice Henriette Lacks), prenašajo molekule glavnega kompleksa tkivne skladnosti humanega levkocitnega antigena A2 (HLA-A2) (41). V drugem primeru pa so ugotovili, da je izražanje beljakovine LST1 (angl. *leukocyte-specific transcript 1*) spodbudilo sestavljanje molekularnega kompleksa, odgovornega za tvorbo TNT, kar je pospešilo prenos HLA-A2 med celicami (42). Tudi pri diferenciaciji osteoklastov, zlasti v procesu zlivanja predhodnikov osteoklastov *in vitro* in *in vivo*, so se pojavili številni TNT. Po TNT so opazili hiter prenos DC-STAMP, transmembranske beljakovine, ki je bistvena za zlivanje celic pri osteoklastogenezi (43, 44).

Vloga tunelskih nanocevk v (pato)fizioloških procesih

Prispevek TNT v patologiji je, da omogočajo prenos in razširjanje za celice škodljivega tovora, kot so onkoproteini, poškodno-



Slika 5. Tunelske nanocevkve so vpletene v celične procese, ki lahko vodijo v patološke spremembe, ali pa so del normalne fiziologije celic.

vani organeli, virusi, bakterije, infektivni delci (prioni, serumski amiloid A, α -sinuklein, virioni) (slika 3). Tako črevesne rakave celice LoVo z mutirano različico virusnega onkogenega homologa Kirsten podganjega sarkoma (angl. *Kirsten rat sarcoma*, KRAS) s pomočjo TNT prenesejo mutiran onkoprotein K-Ras v črevesne rakave celice divjega tipa brez mutirane različice. Med rakavimi celicami z izraženim KRAS je smer prenosa onkoproteina K-Ras iz bolj agresivnih donorskih celic v manj agresivne tarčne črevesne rakave celice (23). Pridobitev onkoproteina K-Ras poveča fosforilacijo kinaze, uravnavane z zunajceličnim signalom (angl. *extracellular signal-regulated kinase*, ERK), in poveča nastanek TNT

v tarčnih celicah brez K-Ras (23). Celice glioblastoma lahko preko TNT pridobijo mitohondrije iz zdravih astrocitov iz tumorskega mikrookolja, zaradi česar pride do povečane proliferacije celic in sinteze ATP rakavih celic ter ohranitve rakotvornosti (45).

Tudi toksični beljakovinski skupki, kot so prioni, amiloid β , tau, mutirani huntingtin (mHTT) in α -sinuklein, ki se kopičijo pri nevrodegenerativnih boleznih, kot so Alzheimerjeva, Parkinsonova in Huntingtonova bolezen, se prenašajo po TNT. Izpostavili bomo α -sinuklein, ki je presinaptična beljakovina, katere skupki imajo ključno vlogo pri nastanku Parkinsonove bolezni, saj se kopičijo v nevronih in povzročajo

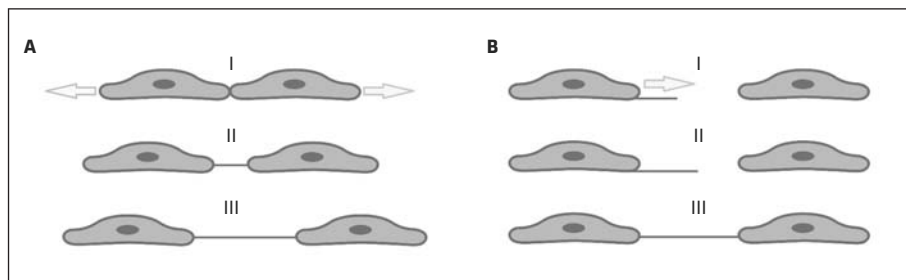
vnetje ter celično smrt. Izkazalo se je, da TNT, ki nastanejo med celicami mikroglije, in TNT med nevroni in celicami mikroglije, omogočajo prenos tako α -sinukleina kot mitohondrijev (24). Po TNT se α -sinuklein prenaša znotraj lizosomov (46). Skupki α -sinukleina se prenašajo predvsem iz nevronov v celice mikroglije, kar se predvideva kot mehanizem za razbremenitev nakopičenih skupkov in s tem zmanjšanje vnetja. Še več, v nasprotni smeri celice mikroglije prenašajo mitohondrije, prednostno v nevrone, nakopičene z α -sinukleinom, kar predstavlja morebitni reševalni mehanizem (24). Celice mikroglije, ki so jih darovali bolniki s Parkinsonovo boleznijo, so pokazale slabšo zmožnost za prenos skupkov po TNT, kar je vodilo v povečano vnetje ter celično smrt celic mikroglije (47). Tovrstne ugotovitve govorijo v prid pomenu TNT pri medsebojnih interakcijah nevronov in celic mikroglije.

Tudi HIV-1 npr. izkorišča TNT za širitev iz žariščne okužene celice v okoliške zdrave celice. Zelo verjetno lahko virusi tudi nadzorujejo nastajanje TNT med okužbo, tako da sprožijo tvorbo TNT in s tem stopnjujejo razširjanje (25, 48). Tudi koronavirus hudega akutnega respiratornega sindroma tipa 2 (angl. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, SARS-CoV-2) se lahko iz ene celice v drugo širi tako po citoplaz-

mi znotraj veziklov, obdanih z dvojno membrano, kot po zunajcelični strani membrane TNT (49). Prenos veziklov znotraj TNT posredujejo aktinski filamenti z miozinom Va (1). Za razširjanje okužbe z BCG je bilo ugotovljeno, da se prenaša po zunajcelični strani TNT in v tarčno celico vstopi s fagocitozo (26). Raziskave torej kažejo na večplastno vlogo TNT, ki je lahko povezana z različnimi bolezenskimi stanji. Navedeni primeri tako izpostavljajo njeno vlogo pri nastanku in napredovanju raka, nevrodegenerativnih boleznih ter pri širjenju virusnih in bakterijskih okužb.

NASTANEK TUNELSKIH NANOCEVK

Za ugotovitev načina nastanka TNT je potrebno snemanje živih celic, saj označevalci, ki bi TNT ločevali po načinu nastanka, niso znani. TNT nastanejo na dva načina. Pri prvem načinu nastanejo z oddaljevanjem tesno stikajočih se celic (slika 6), kar je prevladujoči način nastajanja TNT *in vitro*. Pri drugem načinu nastanejo z rastjo filopodiju podobnega izrastka proti tarčni celici oz. s povezovanjem celic (slika 6). Ta način je bolj značilen za relativno negibljive celice (npr. nevrone in epiteljske celice) (50). Za stabilno pritrnitev TNT na tarčno celico so pomembne beljakovine adherentnih stikov, N-kadherini in β -katenini (7, 9, 51, 52).



Slika 6. Dva načina nastanka tunelskih nanocevk (angl. *tunneling nanotubes*, TNT). Nastajanje TNT z oddaljevanjem celic (angl. *keeping contact TNT*) (A). Pritrjeni celici (I) se ločita (II), z oddaljevanjem pa med njima nastane TNT (III). Nastajanje TNT z rastjo filopodiju podobnega izrastka (angl. *making contact TNT*) (B). Filopodiju podoben izrastek (I) se izteza proti sosednji celici po podlagi (II). Ko s celico vzpostavi stik, nastane TNT, ki nima več stika s podlago (III).

TNT se spontano tvorijo v fizioloških razmerah, vendar jih celice pod vplivom stresnih dejavnikov tvorijo več. Nastajanje TNT pospešujejo vnetje, oksidativni stres, hiperglikemični medij, pomanjkanje seruma, nizek pH in UV-sevanje (53, 54). Ko so naredili kokulturo s stresiranimi astrociti (celice so predhodno izpostavili brezserumskemu hranilnemu mediju ali hranilnemu mediju z dodanim H_2O_2) in nestresiranimi astrociti, so TNT vedno tvorile stresirane celice proti nestresiranim celicam in ne obratno (19). Po TNT so se prenesli nepoškodovani mitohondriji iz nestresiranih celic v stresirane celice feokromocitoma PC12 in ledvične tubularne celice, s čimer so se stresirane celice izognile apoptozi (43, 44). Primer škodljivega TNT-sporazumevanja pa so odkrili med celicami glioblastoma in netumorskimi astrociti, kjer je zaradi TNT-povezav prišlo do prilagoditve netumorskih astrocitov na hipoksijo in na tumorsko presnovo (55). V naših raziskavah na kokulturah rakavih in normalnih urotelijskih celic smo ugotovili, da celice, ki jih je številčno manj, tvorijo TNT do celic, ki jih je številčno več. Torej, ko smo nasadili rakave in normalne urotelijske celice v razmerju 1:40, so rakave celice tvorile približno osemkrat več TNT do normalnih celic kot normalne celice TNT do rakavih celic (37).

Kljub poznavanju nekaterih molekul pri nastanku TNT pri posameznih tipih celic so splošni spodbujevalci nastanka TNT in signalne poti, vključene v nastanek TNT, še slabo poznani. Zelo verjetno je, da različni mehanizmi prevladujejo v različnih vrstah celic. Pri začetku nastanka TNT ima pomembno vlogo polimerizacija aktina (56). V astrocitih se TNT oblikujejo med stresiranimi in nestresiranimi celicami. Njihovo tvorbo v glavnem nadzira transkripcijski dejavnik p53. V nevronih in astrocitih oksidativni stres povzroči aktivacijo p53, ki posledično poveča izražanje receptorja epidermalnega rastnega dejav-

nika (angl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR), aktivira signalno pot PI3K/Akt/mTOR in sproži nastanek TNT (19). V makrofagih in podocitih pa je nastanek TNT sprožen z izražanjem citosolne beljakovine M-Sec, preko katerega se proži polimerizacija globularnega aktina (G-aktin) in ki sproži začetek izvihavanja plazmaleme za tvorbo TNT (57, 58).

TUNELSKÉ NANOCEVKE *IN VIVO*

Pomembna prelomnica pri raziskovanju TNT je bilo odkritje TNT med celicami imunskega sistema *in vivo*, in sicer med mieloidnimi celicami v roženici zdrave miši (15). TNT so odkrili tudi med makrofagi v mišičnem tkivu miši, med osteoklasti pri podganah ter med periciti v krvno-možganski pregradi človeškega zarodka (17, 40, 59). V rakavem tkivu so TNT odkrili v vzorcih tumorjev humanega pljučnega karcinoma in mezotelioma, tumorjih jajčnika in karcinoma grla (16, 60). Funkcionalne raziskave na TNT so bile narejene na miših z gliomi in miših z intrakranialno injekcijo fluorescenčno označenega α -sinukleina (47, 61).

Skupna lastnost TNT v tkivih je, da so pogosto ukrivljene, saj druge celice in gost preplet molekul v medcelični preprečujejo, da bi se celice povezale z ravnimi TNT na najkrajši razdalji (15, 16).

Raziskovanje TNT v tkivih je pomembno tako za razumevanje njihove fiziološke vloge kot tudi vloge TNT pri nastanku in razvoju bolezni, vendar je raziskav o TNT v tkivih neprimerljivo manj kot o TNT *in vitro*. Velik izziv je namreč prepoznavanje TNT v zapletenem večceličnem okolju z veliko medceličnine, kot so živalski modeli ali tumorske resekcije. Prav tako še ne poznamo značilnega označevalca TNT, ločljivost svetlobne mikroskopije pa ne omogoča morfološke opredelitve teh povezav v tkivnem okolju. Naslednji korak pri določanju patofiziološke vloge TNT v boleznih bo tudi povezati nove izsledke z etiologijo,

napredovanjem in odzivom teh bolezni na trenutne načine zdravljenja.

MOŽNOSTI UPORABE TUNELSKIH NANOCEVK V KLINIČNE NAMENE

Kljub temu da so raziskave o TNT še vedno zelo bazične, rezultati kažejo na njihov morebiten pomen pri zdravljenju. V raziskavah so TNT predstavljene predvsem kot strukture, ki jih pri zdravljenju tarčimo, ali kot strukture za tarčno dostavo učinkovin. V prvem primeru TNT predstavljajo možno tarčo za zdravila, ki bi s prekinitvijo TNT prekinila medcelični prenos signalov, onkogenih beljakovin, miRNA in spodbujevalcev celičnih delitev ter s tem ustavila rast in širitev tumorja (62). Namreč, TNT med rakavimi celicami ter rakavimi in stromalnimi celicami, ki tvorijo tumorsko mikrookolje, zelo verjetno pripomorejo k razvoju in napredovanju tumorja ter k pripravi na invazijo tumorja in nastanek zasevkov (63, 64). Ker se iz endotelijskih celic v rakave celice po TNT prenašajo mitohondriji in z njimi povezana odpornost na kemoterapevtike, bi tako s tarčenjem TNT lahko preprečili odpornost rakavih celic na kemoterapevtike (63). Tarčna zdravila, ki bi porušila TNT, bi bila zlasti koristna kot pomožno zdravljenje v pooperativnem procesu, ko se ostanek posamičnih rakavih celic s pomočjo TNT lahko ponovno poveže med sabo v maligni tumor (6). Čeprav specifični zaviralci nastajanja TNT še niso bili opisani, se nastajanje TNT *in vitro* lahko prekine z uporabo toksinov, ki depolarizirajo aktinske filamente, kot sta npr. citohalazin D ali latrunkulin A (39).

Po drugi strani bi TNT-povezave lahko uporabili za izboljšanje prenosa med celicami in spodbujanje dostave terapevtikov do težko dostopnih populacij celic. Ker se po TNT prenašajo tudi liposomi, nano- in mikrodelci, bi lahko v prihodnosti s konjugacijo le-teh s terapevtiki lahko izkoristili tarčno dostavo po TNT (17, 31, 32, 65). *In vitro* so to pokazali s prenašanjem več-

funkcijskih liposomov po TNT med celicami glioblastoma (32). Zasnovali so terapevtske liposome, funkcionalizirane s protirakavim zdravilom doksorubicinom, ter s peptidom apolipoprotein E (apoE) in klorotoksinom kot ligandoma za celice glioblastoma. S tem so pokazali, da so TNT morebitno uporabne kot kanali za dostavo zdravil pri zdravljenju raka, saj omogočajo medcelično prerazporeditev tega zdravila v bližnje in oddaljene celice ter tako dosežejo izolirane tumorske niše, ki so s preprosto difuzijo zdravil v možganskem parenhimu težko dosegljive (32).

Predvsem je bilo odkritje prenosa mitohondrijev po TNT v različnih celičnih modelih monokultur in kokultur tisto, kjer so se TNT pokazali kot osnova za celično zdravljenje, s katerim bi se lahko nadomeščali poškodovani mitohondriji. S prenosom zdravih mitohondrijev po TNT bi tako lahko nadomestili mitohondrije v poškodovanih celicah in podprli preživetje celic, kot smo to opisali pri prenosu zdravih mitohondrijev iz celic mikroglije po TNT v nevrone, nakopičene s skupki α -sinukleina (47).

TNT imajo zanimivo dvojno vlogo, saj lahko blažijo ali spodbujajo neko bolezensko stanje. Povečanje ali zaviranje nastajanja TNT se kaže kot učinkovita strategija zdravljenja več bolezni, pri čemer je potreben razvoj učinkovitih in varnih zdravil, usmerjenih proti TNT.

ZAKLJUČEK

V preglednem članku smo povzeli ključne lastnosti TNT, njihovo vlogo v zdravih in patološko spremenjenih celicah ter možnost uporabe v klinične namene. V dvajsetih letih raziskav predvsem na *in vitro* modelih je poznavanje strukture, delovanja in vloge TNT v različnih patoloških stanjih napredovalo, še vedno pa ostajajo neznanka specifični označevalci TNT ter signalne poti nastajanja TNT. Ne vemo tudi, ali so TNT lastnost vseh vrst rakavih celic, kakšne

spremembe lahko tovor, ki ga celice prejmejo po TNT, povzroči in ali strukturna raznolikost TNT ustreza različnim vlogam v medceličnem sporazumevanju. V nadaljnjem raziskovanju je zato potreben razvoj 3D-*in vitro* modelov, ki bi bili bolj reprezentativni pokazatelj bolezenskega okolja (tumorsko, nevrodegenerativno) kot klasični 2D-*in vitro* modeli. Izziv v raz-

skovanju TNT predstavljajo tudi napredne mikroskopske tehnike za opazovanje TNT v zapletenejšem 3D-okolju. TNT so pomembna celična struktura, ki jo je treba nadalje raziskovati na celično-biološki in molekularno-genetski ravni, da bi te raziskave v prihodnosti omogočile nova in učinkovitejša zdravljenja.

LITERATURA

1. Rustom A, Saffrich R, Markovic I, et al. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science*. 2004; 303 (5660): 1007–10. doi: 10.1126/science.1093133
2. Lagalwar S. Mechanisms of tunneling nanotube-based propagation of neurodegenerative disease proteins. *Front Mol Neurosci*. 2022; 15: 957067. doi: 10.3389/fnmol.2022.957067
3. Matejka N, Reindl J. Perspectives of cellular communication through tunneling nanotubes in cancer cells and the connection to radiation effects. *Radiat Oncol*. 2019; 14 (1): 218. doi: 10.1186/s13014-019-1416-8
4. Resnik N, Prezelj T, De Luca GMR, et al. Helical organization of microtubules occurs in a minority of tunneling membrane nanotubes in normal and cancer urothelial cells. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 17133. doi: 10.1038/s41598-018-35370-y
5. Resnik N, Erman A, Veranič P, et al. Triple labelling of actin filaments, intermediate filaments and microtubules for broad application in cell biology: Uncovering the cytoskeletal composition in tunneling nanotubes. *Histochem Cell Biol*. 2019; 152 (4): 311–7. doi: 10.1007/s00418-019-01806-3
6. Resnik N, Baraga D, Glažar P, et al. Molecular, morphological and functional properties of tunnelling nanotubes between normal and cancer urothelial cells: New insights from the *in vitro* model mimicking the situation after surgical removal of the urothelial tumor. *Front Cell Dev Biol*. 2022; 10: 934684. doi: 10.3389/fcell.2022.934684
7. Baraga D. Ugotavljanje prisotnosti membranskih nanocevk med rakavimi in normalnimi urotelijskimi celicami [magistrsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2015.
8. Pinto G, Brou C, Zurzolo C. Tunneling nanotubes: The fuel of tumor progression?. *Trends Cancer*. 2020; 6 (10): 874–88. doi: 10.1016/j.trecan.2020.04.012
9. Veranič P, Lokar M, Schütz GJ, et al. Different types of cell-to-cell connections mediated by nanotubular structures. *Biophys J*. 2008; 95 (9): 4416–25. doi: 10.1529/biophysj.108.131375
10. Sartori-Rupp A, Cordero Cervantes D, Pepe A, et al. Correlative cryo-electron microscopy reveals the structure of tnts in neuronal cells. *Nat Commun*. 2019; 10 (1): 342. doi: 10.1038/s41467-018-08178-7
11. Alimohamadi H, Ovrjn B, Rangamani P. Modeling membrane nanotube morphology: The role of heterogeneity in composition and material properties. *Sci Rep*. 2020; 10 (1): 2527. doi: 10.1038/s41598-020-59221-x
12. Pulze L, Congiu T, Brevini TAL, et al. MCF7 spheroid development: New insight about spatio/temporal arrangements of TNTs, amyloid fibrils, cell connections, and cellular bridges. *Int J Mol Sci*. 2020; 21 (15): 5400. doi: 10.3390/ijms21155400
13. Whitehead J, Zhang J, Harvestine JN, et al. Tunneling nanotubes mediate the expression of senescence markers in mesenchymal stem/stromal cell spheroids. *Stem Cells*. 2020; 38 (1): 80–9. doi: 10.1002/stem.3056
14. Pinto G, Saenz-de-Santa-Maria I, Chastagner P, et al. Patient-derived glioblastoma stem cells transfer mitochondria through tunneling nanotubes in tumor organoids. *Biochem J*. 2021; 478 (1): 21–39. doi: 10.1042/BCJ20200710
15. Chinnery HR, Pearlman E, McMenamin PG. Cutting edge: Membrane nanotubes in vivo: A feature of MHC class II+ in the mouse cornea. *J Immunol*. 2008; 180 (9): 5779–83. doi: 10.4049/jimmunol.180.9.5779

16. Lou E, Fujisawa S, Morozov A, 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. doi: 10.1371/journal.pone.0033093
17. Rehberg M, Nekolla K, Sellner S, et al. Intercellular transport of nanomaterials is mediated by membrane nanotubes in vivo. *Small*. 2016; 12 (14): 1882–90. doi: 10.1002/smll.201503606
18. Wang X, Gerdes HH. Transfer of mitochondria via tunneling nanotubes rescues apoptotic PC12 cells. *Cell Death Differ*. 2015; 22 (7): 1181–91. doi: 10.1038/cdd.2014.211
19. Wang Y, Cui J, Sun X, et al. Tunneling-nanotube development in astrocytes depends on p53 activation. *Cell Death Differ*. 2011; 18 (4): 732–42. doi: 10.1038/cdd.2010.147
20. Lokar M, Kabaso D, Resnik N, et al. The role of cholesterol-sphingomyelin membrane nanodomains in the stability of intercellular membrane nanotubes. *Int J Nanomedicine*. 2012; 7: 1891–902. doi: 10.2147/IJN.S28723
21. Veranič P, Lokar M, Schütz GJ, et al. Different types of cell-to-cell connections mediated by nanotubular structures. *Biophys J*. 2008; 95 (9): 4416–25. doi: 10.1529/biophysj.108.131375
22. Osteikoetxea-Molnár A, Szabó-Meleg E, Tóth EA, et al. The growth determinants and transport properties of tunneling nanotube networks between B lymphocytes. *Cell Mol Life Sci*. 2016; 73 (23): 4531–45. doi: 10.1007/s00018-016-2233-y
23. Desir S, Wong P, Turbyville T, et al. Intercellular transfer of oncogenic KRAS via tunneling nanotubes introduces intracellular mutational heterogeneity in colon cancer cells. *Cancers (Basel)*. 2019; 11 (7): 892. doi: 10.3390/cancers11070892
24. Chakraborty R, Nonaka T, Hasegawa M, et al. Tunneling nanotubes between neuronal and microglial cells allow bi-directional transfer of α -synuclein and mitochondria. *Cell Death Dis*. 2023; 14 (5): 329. doi: 10.1038/s41419-023-05835-8
25. Sowinski S, Jolly C, Berninghausen O, 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. doi: 10.1038/ncb1682
26. Onfelt B, Nedvetzki S, Benninger RK, 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. doi: 10.4049/jimmunol.177.12.8476
27. Lee HJ, Suk JE, Patrick C, et al. Direct transfer of alpha-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies. *J Biol Chem*. 2010; 285 (12): 9262–72. doi: 10.1074/jbc.M109.081125
28. Gittes F, Mickey B, Nettleton J, et al. Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J Cell Biol*. 1993; 120 (4): 923–34. doi: 10.1083/jcb.120.4.923
29. Kabaso D, Lokar M, Kralj-Iglič V, et al. 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. doi: 10.2147/IJN.S16982
30. Astanina K, Koch M, Jüngst C, et al. Lipid droplets as a novel cargo of tunnelling nanotubes in endothelial cells. *Sci Rep*. 2015; 5: 11453. doi: 10.1038/srep11453
31. Kristl J, Plajnšek KT, Kreft ME, et al. Intracellular trafficking of solid lipid nanoparticles and their distribution between cells through tunneling nanotubes. *Eur J Pharm Sci*. 2013; 50 (1): 139–48. doi: 10.1016/j.ejps.2013.04.013
32. Formicola B, D'Aloia A, Dal Magro R, et al. Differential exchange of multifunctional liposomes between glioblastoma cells and healthy astrocytes via tunneling nanotubes. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019; 7: 403. doi: 10.3389/fbioe.2019.00403
33. Panasiuk M, Rychłowski M, Derewińko N, et al. Tunneling nanotubes as a novel route of cell-to-cell spread of herpesviruses. *J Virol*. 2018; 92 (10): e00090–18. doi: 10.1128/JVI.00090-18
34. 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. doi: 10.1016/j.febslet.2007.03.071
35. Alberts B. *Molecular biology of the cell*. 6th ed. New York: Garland Science; 2014.
36. Uhl J, Gujarathi S, Waheed AA, et al. Myosin-X? is essential to the intercellular spread of HIV-1 Nef through tunneling nanotubes. *J Cell Commun Signal*. 2019; 13 (2): 209–24. doi: 10.1007/s12079-018-0493-z
37. Resnik N, Baraga D, Glažar P, et al. Molecular, morphological and functional properties of tunnelling nanotubes between normal and cancer urothelial cells: New insights from the *in vitro* model mimicking the situation after surgical removal of the urothelial tumor. *Front Cell Dev Biol*. 2022; 10: 934684. doi: 10.3389/fcell.2022.934684
38. 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. doi: 10.1371/journal.pone.0047429

39. Kretschmer A, Zhang F, Somasekharan SP, et al. Stress-induced tunneling nanotubes support treatment adaptation in prostate cancer. *Sci Rep.* 2019; 9 (1): 7826. doi: 10.1038/s41598-019-44346-5
40. Errede M, Mangieri D, Longo G, et al. Tunneling nanotubes evoke pericyte/endothelial communication during normal and tumoral angiogenesis. *Fluids Barriers CNS.* 2018; 15 (1): 28. doi: 10.1186/s12987-018-0114-5
41. Schiller C, Huber JE, Diakopoulos KN, et al. Tunneling nanotubes enable intercellular transfer of MHC class I molecules. *Hum Immunol.* 2013; 74 (4): 412–6. doi: 10.1016/j.humimm.2012.11.026
42. Schiller C, Diakopoulos KN, Rohwedder I, et al. LST1 promotes the assembly of a molecular machinery responsible for tunneling nanotube formation. *J Cell Sci.* 2013; 126 (3): 767–77. doi: 10.1242/jcs.114033
43. Zhang L, Zhang Y. Tunneling nanotubes between rat primary astrocytes and C6 glioma cells alter proliferation potential of glioma cells. *Neurosci Bull.* 2015; 31 (3): 371–8. doi: 10.1007/s12264-014-1522-4
44. Takahashi A, Kukita A, Li YJ, et al. Tunneling nanotube formation is essential for the regulation of osteoclastogenesis. *J Cell Biochem.* 2013; 114 (6): 1238–47. doi: 10.1002/jcb.24433
45. Watson DC, Bayik D, Storevik S, et al. GAP43-dependent mitochondria transfer from astrocytes enhances glioblastoma tumorigenicity. *Nat Cancer.* 2023; 4 (5): 648–64. doi: 10.1038/s43018-023-00556-5
46. Abounit S, Bousset L, Loria F, et al. Tunneling nanotubes spread fibrillar α -synuclein by intercellular trafficking of lysosomes. *EMBO J.* 2016; 35 (19): 2120–38. doi: 10.15252/embj.201593411
47. Scheiblich H, Dansokho C, Mercan D, et al. Microglia jointly degrade fibrillar alpha-synuclein cargo by distribution through tunneling nanotubes. *Cell.* 2021; 184 (20): 5089–106.e21. doi: 10.1016/j.cell.2021.09.007
48. Hurtig J, Chiu DT, Onfelt B. Intercellular nanotubes: Insights from imaging studies and beyond. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2010; 2 (3): 260–76. doi: 10.1002/wnan.80
49. Pepe A, Pietropaoli S, Vos M, et al. Tunneling nanotubes provide a route for SARS-CoV-2 spreading. *Sci Adv.* 2022; 8 (29): eabo0171. doi: 10.1126/sciadv.abo0171
50. Gousset K, Marzo L, Commere PH, et al. Myo10 is a key regulator of TNT formation in neuronal cells. *J Cell Sci.* 2013; 126 (19): 4424–35. doi: 10.1242/jcs.129239
51. 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. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.05.013
52. Jansens RJJ, Van den Broeck W, De Pelsmaeker S, et al. Pseudorabies virus US3-induced tunneling nanotubes contain stabilized microtubules, interact with neighbouring cells via cadherins and allow intercellular molecular communication. *J Virol.* 2017; 91 (19): e00749–17. doi: 10.1128/JVI.00749-17
53. Kimura S, Hase K, Ohno H. The molecular basis of induction and formation of tunneling nanotubes. *Cell Tissue Res.* 2013; 352 (1): 67–76. doi: 10.1007/s00441-012-1518-1
54. Zhu D, Tan KS, Zhang X, et al. Hydrogen peroxide alters membrane and cytoskeleton properties and increases intercellular connections in astrocytes. *J Cell Sci.* 2005; 118 (16): 3695–703. doi: 10.1242/jcs.02507
55. Valdebenito S, Malik S, Luu R, et al. Tunneling nanotubes, TNT, communicate glioblastoma with surrounding non-tumor astrocytes to adapt them to hypoxic and metabolic tumor conditions. *Sci Rep.* 2021; 11 (1): 14556. doi: 10.1038/s41598-021-93775-8
56. Zhang J, Zhang Y. Membrane nanotubes: Novel communication between distant cells. *Sci China Life Sci.* 2013; 56 (11): 994–9. doi: 10.1007/s11427-013-4548-3
57. Hase K, Kimura S, Takatsu 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. doi: 10.1038/ncb1990
58. Barutta F, Kimura S, Hase K, et al. Protective role of the M-Sec-tunneling nanotube system in podocytes. *J Am Soc Nephrol.* 2021; 32 (5): 1114–30. doi: 10.1681/ASN.2020071076
59. Zhang JQ, Takahashi A, Gu JY, et al. In vitro and in vivo detection of tunneling nanotubes in normal and pathological osteoclastogenesis involving osteoclast fusion. *Lab Invest.* 2021; 101 (12): 1571–84. doi: 10.1038/s41374-021-00656-9
60. Lou E, O'Hare P, Subramanian S, et al. Lost in translation: Applying 2D intercellular communication via tunneling nanotubes in cell culture to physiologically relevant 3D microenvironments. *FEBS J.* 2017; 284 (5): 699–707. doi: 10.1111/febs.13946
61. Osswald M, Jung E, Sahn F, et al. Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature.* 2015; 528 (7580): 93–8. doi: 10.1038/nature16071
62. Thayanithy V, Dickson EL, Steer C, et al. Tumor-stromal cross talk: Direct cell-to-cell transfer of oncogenic microRNAs via tunneling nanotubes. *Transl Res.* 2014; 164 (5): 359–65. doi: 10.1016/j.trsl.2014.05.011
63. Lou E, Fujisawa S, Barlas A, et al. Tunneling nanotubes: A new paradigm for studying intercellular communication and therapeutics in cancer. *Commun Integr Biol.* 2012; 5 (4): 399–403. doi: 10.4161/cib.20569

64. Roehlecke C, Schmidt MHH. Tunneling nanotubes and tumor microtubes in cancer. *Cancers (Basel)*. 2020; 12 (4): 857. doi: 10.3390/cancers12040857
65. Ferrati S, Shamsudeen S, Summers HD, et al. Inter-endothelial transport of microvectors using cellular shuttles and tunneling nanotubes. *Small*. 2012; 8 (20): 3151–60. doi: 10.1002/smll.201200472

Prispelo 15. 9. 2023