

Endotel Hücreleri Arasında Nanotüp Tünellemenin ve Organel İletiminin Görüntülenmesi

Bilge Özerman EDİS

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul.

ÖZET

Nanotüp tünelleme hücreler arası iletişimde rol almaktadır. Ökaryotik hücrelerin yenilenmek, hayatta kalmak ya da strese direnmek üzere nanotüp tünelleri oluşturduğu düşünülmektedir. Homotipik ya da heterotipik hücreler arasında köprüler oluşturan nanotüp tünellerin kalsiyum iyon akışı gibi sinyal moleküllerini ilettiği, organel, patojen ya da onkojenik molekülleri aktardığı gösterilmiştir. Nanotüp tünellerin temel yapısı mikrofilamentlerdir. Stres oluşturan çevresel etkenler altında aktin iskeletinin nanotüp tünellerin oluşmasını tetiklediği ve birbirinden uzak iki hücre arasında köprü oluşturduğu belirlenmiştir. Uzun-sürelili hücre kültürü ortamında endotel hücrelerinde strese neden olmakta ve hücre yaşlanma olmaktadır. Bu çalışmada standart hücre kültürü ortamında tekrarlayan pasajlar (P) ile çoğaltılan insan göbek kordonu damar endotel hücreleri (HUVEC) arasında nanotüp tünellemenin görüntülenmesi amaçlandı. Floresan mikroskop incelemesi için aktin iskeleti ve endozomlar sırası ile falloidin ve anti-EEA1 antikoru ile işaretlendi. Kontrol grubu (P3-4) ve deney grubu (P8-10) HUVEC'ler ile hazırlanan preparatlarda nanotüp tünel uzunlukları ölçüldü. P8-10 için ortalama uzunluk 30 µm olarak belirlendi. Endozomların nanotüp tünel yapısındaki aktin iskeleti ile birlikte konumlandığı gösterildi. Bu bulgular, hücre içinde kargo taşıyan endozomların, nanotüp tünelleme ile HUVEC'ler arasında da madde aktarımı yapabileceğini göstermektedir. Sonuçta tekrarlayan pasajlar ile çoğaltılan HUVEC'ler arasındaki nanotüp tünellerin mikrofilamentlerin dinamiğine bağlı olarak işlevsel olduğu belirlenmiştir. Hücreler arasında yeni bir iletişim yolu olarak kabul gören nanotüp tünelleme, stres cevabının irdelendiği çalışmalarda morfolojik bir parametre olarak değerlendirilebilir.

Anahtar Kelimeler: Aktin filamenti. Endotel hücresi. Endozom. Nanotüp tünelleme.

Imaging the Nanotube Tunneling and the Organel Transfer between Endothelial Cells

ABSTRACT

The tunneling nanotube plays a role in intercellular communication. Nanotube tunnels are thought to be formed to regenerate, to survive or to resist stress by eukaryotic cells. Nanotube tunnels, forming bridges between homotypic and heterotypic cells, have shown to transmit signaling molecules such as calcium ion flux, and to transport organelles, pathogens or oncogenic molecules. The basic structure of nanotube tunnels is microfilaments. The actin skeleton triggers the formation of a nanotube tunnel and a bridge between two distant cells under stressing conditions. Cellular aging occurs in endothelial cells in a long-term cell culture. In this study, it is aimed to visualize nanotube tunneling between endothelial cells under cellular aging. Human umbilical cord vascular endothelial cells (HUVECs) were grown in the standard cell culture conditions with repeated passages (P). The actin cytoskeleton and endosomes were labeled with phalloidin and anti-EEA1 antibody respectively, for fluorescence microscopy. Nanotube tunnel lengths were measured in control (P3-4) and experimental (P8-10) HUVECs preparations. The average length for P8-10 was determined to be 30 µm. The endosomes were located together with the actin cytoskeleton in the nanotube tunnel. These findings show that endosomes, cargo-carrier inside the cell, can also transfer substances between HUVECs by nanotube tunneling. As a result, nanotube tunnels, formed between HUVECs of high passages depending on the dynamics of the microfilaments, were found to be functional. Nanotube tunneling, accepted as a new way of communication between cells, can be evaluated as a morphological parameter in studies of stress responses.

Key Words: Actin filaments. Endothelial cells. Endosome. Tunneling nanotube.

Geliş Tarihi: 23.Aralık.2021

Kabul Tarihi: 13.Nisan.2021

Dr. Bilge ÖZERMAN EDİS
İstanbul Üniversitesi,
İstanbul Tıp Fakültesi, Esnaf Hastanesi,
Biyofizik Anabilim Dalı
Tahtakale, Süleymaniye Takvimhane Cad.
No:19, 34116 Fatih - İstanbul
Tel: 0 212 414 20 00 (12152)
E-posta: bilge.edis@istanbul.edu.tr

Yazarların ORCID ID Bilgisi:
Bilge ÖZERMAN EDİS: 0000-0002-3499-0474

Nanotüp tüneller, hücreler arası iletişimde rol alan yeni yapılar olarak kabul görmektedir. Birbirinden 100 µm kadar uzakta bulunan ökaryotik hücrelerin oluşturduğu nanotüp tüneller *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında ortaya konmuştur¹. Nanotüp tünelleme ile hücreden hücreye endositik vezikül ve organel geçişinin olduğu ilk kez feokromasitoma-12 (PC12) hücreleri arasında gösterilmiştir². Patojenlerin ya da hücre organellerinin dağılımını sağlayan nanotüp tünellerin, hücreler arasında köprü oluşturan yapılar olduğunu kanıtlayan çalışmalar gün geçtikçe artmak-

tadır. Bakteri, virüs, prion, HIV enfeksiyonu sırasında görülen viral proteinler gibi patojenlerin nanotüp tüneller aracılığı ile daha hızlı yayıldığı gösterilmiştir³⁻⁹. Hücreler arası iletişimde sitosolik iyonların, proteinlerin ve onkojenik mikroRNA'ların nanotüp tüneller ile taşındığı belirlenmiştir¹⁰⁻¹². Hücre iskeletini barındıran bu sitoplazmik tüneller, homotipik ya da heterotipik hücreler arasında köprüler oluşturup organel alışverişine olanak sağlamaktadır^{13,14}. Yapısal incelemelerde nanotüp tünellerin filopod benzeri hücre uzantıları gibi hücre iskeleti bileşenlerinden oluştuğu fakat temel yapısının aktin filamentleri olduğu gösterilmiştir¹⁵.

Aktin, ökaryotik hücrelerde mikrofilament yapısının temel bileşenidir ve hücrede hem monomer hem de polimer olarak bulunabilir. Bu özelliği sayesinde aktin filamentleri hücrede dinamik bir yapı oluşturur. Böylece hücre göçü, morfogenez ve fagositoz gibi hücre zarının sürekli düzenlendiği hücrenel süreçlerde aktin filamentinin polimerleşme ve depolimerleşmesi morfolojik değişikliklere yön verir. Filamentöz aktin hücre içinde sitosolik faktörlerin ya da organellerin taşınmasına da destek olur. Aktin filamentlerinin (F-aktin) polimerleşmesi için gerek duyulan yaklaşık 20 kcal/mol değerindeki serbest enerji, hücre içi ADP/ATP oranına bağlıdır¹⁶. Aktin filamentinin uzama aşamasında, ATP bağlı serbest G-aktin monomerleri filamente eklenir, F-aktin-ATP bileşiği filamentin hızlı polimerleşen ucunda koruyucu kapak görevi görür. Yaşlanma gibi enerji metabolizmasının değiştiği koşullar altında, aktin filamentleri, hücre içi yapısal farklılaşmayı hızlandırdığı gibi sensör görevini de üstlenerek hücreler arası iletişimi yönlendirir¹⁷. Dinamik aktin iskeleti organellerin hareketine de destek olmaktadır. Hücre içine alınan moleküller endositik veziküller ile taşınır. Veziküllerin hücre içinde erken endozomlara yönelmesini, yüzeylerinde taşıdıkları sinyal peptidleri ile aktin iskeletinin sağladığı gösterilmiştir¹⁸. Bu aşamada aktin ile etkileşen sinyal peptidleri erken endozom ilişkili protein (EEA-1) ve Rab5-GDP proteinidir. EEA1, endozom zarı üzerindeki fosfatidilinozitol-3-fosfata bağlanarak, veziküllerin sadece yakınlaşmasını sağlamakla kalmaz, aynı zamanda geç endozomlar ile füzyonlarını da aktive eder. Rab5 erken endozomların geç endozomlara doğru göç etme sinyalini Rac-GTP aracılığı ile aktin iskeletine aktarır¹⁹.

Stres oluşturan çevresel etkenler altında aktin iskeleti, nanotüp tünellerin oluşmasını tetikler²⁰. Oksidatif stresin, astrositler ve hipokampal nöronlarda nanotüp tünel oluşumunu hızlandırdığı gözlenmiştir^{13,21}. Enflamasyonun, kemik iliği kökenli stromal hücreler ile akciğer alveol hücreleri arasında nanotüp tünellemeye neden olduğu belirlenmiştir²². Hücre kültürü ortamında virütik enfeksiyonun ardından Vero, HeLa ve NIH 3T3 tipi hücrelerde nanotüp tünellemenin hızlandığı saptanmıştır²³. Diyabetik koşulların modellendiği hücre kültüründe çoğaltılan HUVEC'ler ile endotelial

projenitör hücreler arasında nanotüp tünellerin oluştuğu ve bu yapıların lizozomların geçişini sağladığı gösterilmiştir²⁴.

Uzun-sürelili hücre kültürü ortamında tekrarlayan pasajların hücrelerde strese neden olduğu belirlenmiştir. Yüksek pasaj (P) sayısı ile elde edilen endotel hücrelerinde morfolojik yapıların bozulduğu, beta-galaktosidaz enzim etkinliğinin artış gösterdiği ve hücrenel yaşlanma oluştuğu gözlenmiştir^{25,26}. Bu çalışmada çok sayıda tekrarlayan pasajlar ile çoğaltılan endotel hücreleri arasında nanotüp tünellemenin görünlmesi amaçlandı. Öte yandan nanotüp tüneller ile hücreden hücreye doğrudan biyomolekül aktarımını gözlemlemek üzere endozomlar incelendi.

Gereç ve Yöntem

Kimyasallar

Hücre kültüründe kullanılan malzemeler Falcon (Becton Dickinson Labware Oxnard, CA, USA) ve Nunc (Maxisorp, Denmark) firmalarından alındı. Çalışmada birinci antikör olarak, anti-EEA1 (Abcam, Cambridge, UK), ikinci antikör olarak fluoresein izotiyosiyanat (FITC) işaretli anti-tavşan IgG (Santa Cruz, CA, USA) ve tetrametilrodamin izotiyosiyanat (TRITC) işaretli falloidin (Sigma, St. Louis, MO, USA) kullanıldı. ProLong Gold Antifade preparat koruyucusu ile 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) Invitrogen (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Inc) firmasından alındı.

Hücre Kültürü

Çalışmada tüm hücre soyu insan göbek kordonu damar endotel hücreleri (HUVEC) (ATCC-CRL-1730) kullanıldı. Standart hücre kültürü ortamı, %10 fetal sıgır serumu (FBS) ve antibiyotik (100 µg/ml streptomisin ve 100 U/ml penisilin) içeren Dulbecco modifiye Eagle medium (DMEM) F-12 ile hazırlandı. Hücreler 37°C'de ve %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. Hücre kültüründeki 4-5 günün ardından HUVEC'ler, hücre kazıyıcısı ile yüzeyden kaldırıldılar. Hücre canlılık tespiti için tripan mavisi ayırma yöntemi kullanıldı. Hemositometre ile yapılan hücre sayımının ardından HUVEC'ler yeni pasajda 2x10⁵ hücre/ml olacak şekilde yeniden kültür ortamına ekildi. Pasaj sayısı, 3-4 ve 8-10 olan hücreler sırası ile kontrol (P3-4) ve deney grubu (P8-10) olarak belirlendi²⁵. Hücrelerdeki morfolojik değişiklikler ters mikroskopta (Olympus) gözlemlendi. Floresan mikroskopta incelenmek üzere hücreler, içinde yuvarlak lamel bulunan 6 kuyulu hücre plaklarına (1x10⁶ hücre/ml) ekildi. Hücrelerin lamellere yapışması için gece boyu beklendi.

Nanotüp Tünel: Hücreler Arası Köprü

İmmüno Floresan mikroskopisi ile görüntüleme

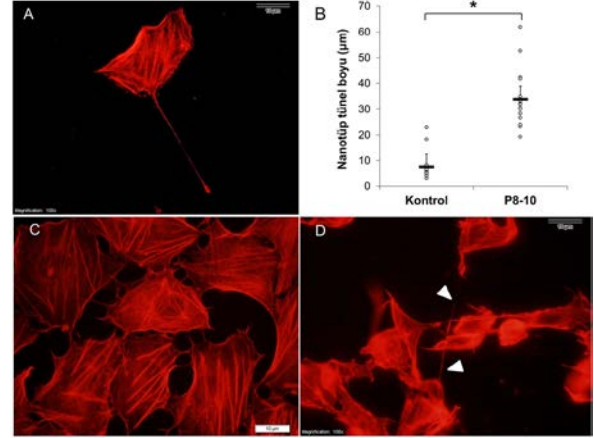
Yuvarlak lameller üzerine yayılmış hücreler fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) ile yıkandı ve %0,01 Triton X-100/PBS çözeltisinde 10 dakika bekletildi. Tespit için %2 paraformaldehit/PBS ortamında 1 saat +4°C'de inkübe edildikten sonra %1 PBS-BSA ile 1:750 oranında seyreltilen birinci antikor ile 2 saat boyunca bekletildi. Floresan işaretli antikorlar %1 PBS-BSA ile 1:2000 oranında seyreltildi ve 1 saat boyunca uygulandı. Preparatlar floresan mikroskopta (Olympus BX51) immersiyon objektifi ile x100 büyütmede incelendi. Aktin iskeleti, F-aktine bağlanan falloidin-TRITC ile işaretlenerek kırmızı renkte, hücrelerde erken endozom belirteci EEA1 için anti-EEA1 ve anti-tavşan IgG-FITC ile işaretlenerek yeşil renkte görüntüldü. Hücre çekirdekleri DAPI ile işaretlenerek üçlü filtre aracılığı ile mavi renkte görüntüldü. Hücreler arası uzantılar Olympus DP-72 kamera sistemi ile görüntüldü, DP2-TWAIN yazılım programı ile fotoğraflandı ve nanotüp tünellerin uzunlukları ölçüldü²⁷.

İstatistiksel Analiz

Birbirinden bağımsız P8-10 deney gruplarında (n=3) görülen nanotüp tüneller ölçüldü ve Student t test kullanılarak P3-4 kontrol grubu (n=3) ile karşılaştırıldı. Veriler ortalama ± standart hata değerleri olarak sunuldu. İstatistiksel anlamlılık düzeyi p<0.05 olarak kabul edildi.

Bulgular

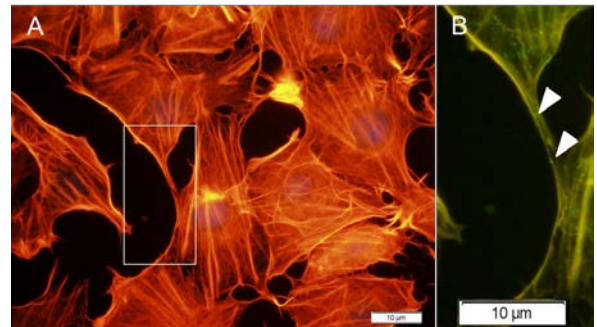
Hücre kültüründe çoğaltılan endotel hücrelerinin aktin iskeleti falloidin-TRITC ile işaretlendi. Pasaj sayısı 3-4 olan kontrol grubu (P3-4) ile pasaj sayısı 8-10 olan deney grubunda (P8-10) hücreler arası kurulan köprüler incelendi. Hücreler arası haberleşmeye destek olduğu düşünülen nanotüp tünel yapılarındaki F-aktin görüntüldü (Şekil 1A). Bağlantı kuran iki hücre arasındaki nanotüp tünel uzantılarının boyu ölçüldü (Şekil 1B). Kontrol grubundaki hücrelerin, bitişik hücreler ile bağlantı oluşturduğu ve uzantıların ortalama boyunun 10 µm'den düşük olduğu belirlendi (Şekil 1C). Deney grubundaki hücrelerin, P3-4 hücrelerinden farklı olarak, morfolojilerinin bozulduğu, lamel üzerinde yayılmadıkları tespit edildi. P8-10 hücrelerinin bitişikteki hücreleri aşarak, uzaktaki bir diğer hücre ile kendisi arasında nanotüp tünel oluşturdukları görüntüldü (Şekil 1D). P8-10 endotel hücreleri arasındaki nanotüp tünellerin ortalama boyunun 30 µm'den büyük olduğu belirlendi. Kontrol ve deney grubundan elde edilen ortalama verilerin arasındaki farkın anlamlı olduğu saptandı.



Şekil 1:

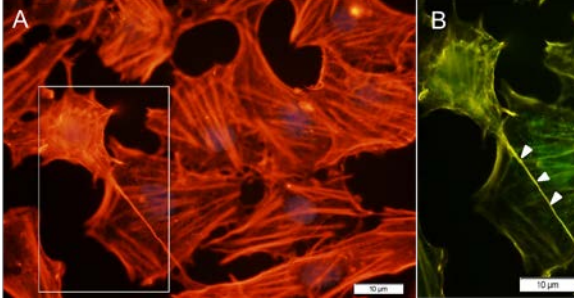
Tekrarlayan pasajlar ile çoğaltılan endotel (HUVEC) hücrelerinde aktin iskeleti (falloidin-TRITC) ve nanotüp tünel köprüsünün floresan mikroskop görüntüsü. (A) Endotel hücresinden uzanan nanotüp tünel. (B) Kontrol ve deney gruplarındaki iki hücre arasında bağ oluşturan nanotüp tünellere ait uzunluk ortalamalarının istatistiksel değerlendirilmesi. (C) Kontrol grubu endotel hücrelerinin oluşturduğu hücre zarı uzantıları bitişik hücreler arasında görünmektedir. (D) Uzun-sürelili hücre kültüründe çoğaltılan P8-10 endotel hücreleri arasında nanotüp tünel köprüsü (beyaz ok başı) (Büyütme x100).

Nanotüp tünel aracılığı ile iki hücre arasında sitosolik faktörlerin iletilme olasılığından yola çıkarak HUVEC'lerde erken endozomlar işaretlendi. Aktin filamentleri, endozomlar ve hücre çekirdeği bir arada görüntüldü (Şekil 2A). EEA1 proteini ile işaretlenen endozomların aktin filamentleri üzerinde olduğu gösterildi (Şekil 2B). Benzer işaretleme ile erken endozomlar nanotüp tünel ile birlikte görüntüldü (Şekil 3).



Şekil 2:

Endotel hücreleri arasında endozomların hücreler arası geçişi görünmektedir. (A) İmmüno Floresan mikroskop incelemesi için aktin iskeleti (falloidin-TRITC), erken endozomlar (anti-EEA1) ve hücre çekirdeği (DAPI) işaretlemesi bir arada yapılmıştır. İki endotel hücresi arasında endozomların geçişi çerçeve ile belirlenmiştir (Büyütme x 100). (B) Çerçeve içindeki alanda endozomlar (beyaz ok başı) FITC etiketli ikinci antikor işaretlemesi ile ayırt edilmektedir.



Şekil 3:

İki endotel hücresi arasındaki nanotüp tünelden endozomların geçişi görülmektedir. (A) Nanotüp tünel aktin iskeletinin falloidin-TRITC işaretlemesi ile ayırt edilmektedir. İmmunofloresan mikroskop incelemesi için endozomlar (anti-EEA1) ve hücre çekirdeği (DAPI) işaretlemesi bir arada yapılmıştır. Endozomların yerleştiği nanotüp tünel çerçeve ile belirlenmiştir (Büyütme x 100). (B) Çerçeve içindeki alanda nanotüp tünel ve endozomlar (beyaz ok başı) birlikte görülmektedir. Endozomlar FITC etiketli ikinci antikor işaretlemesi ile ayırt edilmektedir.

Tartışma ve Sonuç

Hücreler arası iletişim, sinyal moleküllerinin bir hücreden diğer bir hücreye aktarılmasına dayanır. Nanotüp tünelleme sayesinde biyomoleküllerin yanı sıra organellerin de hücreden hücreye aktarılması söz konusudur. Bu çalışmada, endotel hücreleri arasında oluşan aktin temelli nanotüp tüneller, immunofloresan teknik ile görüntülenmektedir. Aktin filamentlerinin işaretlenmesi ile nanotüp tünellerin ortalama uzunluğu yaklaşık 30 μm olarak belirlenmiştir. Bu uzunluk literatürde belirtilen değer aralığı içinde yer almaktadır²⁸. Aktin filamentleri stres lifleri ile hücrenin yapısal özelliklerini korumasını sağlar, ayrıca hücre içi trafiğe destek olur. Aktin filamentlerinin nanotüp tünellerin yapısına katılması, mikrofilamentlerin hücreler arası iletişimde rol oynadığına işaret etmektedir¹⁵.

Tekrarlayan pasajlama (P8-10) sonucu elde edilen endotel hücrelerin morfolojik yapıları Boisen ve arkadaşlarının çalışması ile uyumludur. Bu hücreler ile kontrol hücreler (P3-4) karşılaştırıldığında, bağ kuran iki hücre arasındaki mesafenin anlamlı olarak yüksek olması nanotüp tünellerin, hücrel stres ile gelişen dinamik yapılar olduğunu göstermektedir.

Hücre içinde erken endozomlar aktin iskeletinden destek olarak hareket ederler¹⁷. Nanotüp tünel yapısındaki aktin filamentleri ile erken endozomların birlikte bulunması, bir endotel hücresine ait organellerin doğrudan bir başka endotel hücresine iletilmesinde nanotüp tünellenmenin işlevsel olduğunu göstermektedir.

Nanotüp tünel oluşumunda hücre zarı uzantılarında olduğu gibi aktin polimerleşmesi gerekmekte ve filamentöz aktin demetler oluşturmaktadır. Hanna ve

arkadaşlarının markofajlar arasında oluşan nanotüp tünel biyogenezi üzerine yaptıkları çalışmada polimerleşmeyi yönlendiren sinyal yollarının RhoGTPaz proteinleri ile düzenlendiği gösterilmiştir²⁹. Nanotüp tünelin uzama aşamasında RhoGTPaz proteinlerinden Cdc42 ve Rac1'in, WASP ile WAVE2 proteinlerini indüklediği ve buna bağlı olarak Arp2/3 aktin çekirdeklenme proteininin etkinleştiği belirlenmiştir. Delage ve arkadaşları fare nöronal CAD hücre soyu ile yaptıkları çalışmada filopod ve nanotüp tünel oluşumunun benzer yollar tarafından düzenlendiğini fakat yüzey uzantılarından birinin uyarılmasının diğer yapının baskılanması ile sonuçlandığını belirlemişlerdir. Aktin bağlayan ve demet oluşumunu sağlayan Eps8 proteininin aşırı anlatımı sonucunda, epitelyal hücrelerin aksine nöronal hücrelerde filopodların oluşumu baskılanırken nanotüp tünel sayısının arttığı belirlenmiştir. CAD hücreleri arasında filopodların kargo taşımadığı, hücrelerarası vezikül aktarımının ancak nanotüp tünel ile gerçekleştiği gözlemlenmiştir³⁰. Hücrel yaşlanmanın tetiklendiği bu çalışmada, aktin dinamiğindeki değişimlere bağlı olarak filopod/nanotüp dengesinin, endotel hücrelerinin lamel üzerinde yayılma hızını azalttığı düşünülmektedir ancak endotel hücrelerinde nanotüp tünellemeyi yönlendiren moleküler yollar henüz belirlenmemiştir.

Endotel hücreleri arasında nanotüp tünellerden mitokondri ve lizozomların yanı sıra lipid damlacıklarının da geçtiği tespit edilmiştir³¹. Aynı çalışmada araşidonik asit uygulamasının nanotüp tünel ile bir diğer hücreye geçen lipid damlacıklarını arttırdığı ve nanotüp tünel sayısının üç katına çıktığı belirlenmiştir. Pedicini ve arkadaşlarının çalışmasında plazma zarının görüntülenmesi amacı ile kullanılan buğday tohumu aglütinin uygulamasının ardından nanotüp tünel sayısının HUVEC'ler arasında arttığı belirlenmiştir³². Bu lektin tipinin derişime bağlı olarak (EC50 8.17 $\mu\text{g/ml}$) hem filamentöz aktin, hem de mikrotübül içeren nanotüp tünellerin oluşumunu hızlandırdığı gözlenmiştir. HUVEC'lerde buğday tohumu aglütinin varlığında, plazma zarı altındaki mikrofilamentlerin yeniden şekillendiği, Fluo4-yüklü endotel hücrelerine mekanik uyarı verildiğinde kalsiyum sinyal iletilisinin tetiklendiği ve kalsiyum dağılımının nanotüp tünel aracılığı ile diğer hücrelere geçtiği canlı hücre görüntülemesi ile tespit edilmiştir. Bu çalışmada endozomların, hücrel yaşlanma gösteren endotel hücreleri arasında nanotüp tünel ile aktarıldığı belirlenmiştir. Buradaki bulgular, hücre işleyişini yönlendiren mitokondri, lizozom gibi organellerin yanında lipid damlacıkları ve endozom gibi kargo taşıyan organellerden, sinyal iletimi sağlayan iyon akışına kadar, hücreler arası madde aktarımının nanotüp tünelleme ile sağlandığını göstermektedir.

Endotel hücrelerinin farklı hücrelerle bir arada incelendiği ortak kültür çalışmalarında nanotüp tüneller incelenmiştir. Mezenkimal kök hücresinden *in vitro*

Nanotüp Tünel: Hücreler Arası Köprü

iskemi modeli uygulanan endotel hücelerine mitokondri geçişinin, F-aktin polimerleşmesine bağlı olarak nanotüp tünel ile sağlandığı gösterilmiştir³³. Taşınan mitokondrilerin HUVEC'lerde bazal ve maksimal oksijen kullanımını arttırdığı, laktat üretimini azalttığı ve apoptotik süreci engellediği ortaya konmuştur. Wang ve arkadaşlarının çalışmasında, *in vitro* koşullarda oluşturulan iskemik hasarın ardından nöral kök hücrelerin çevresinde nanotüp tünellerin geliştiği belirlenmiş ve mitokondrilerin beyin mikrovasküler endotel hücelerine nanotüp tünelleme ile geçişi gösterilmiştir³⁴.

Endotel hücrelerinin anjiyojenik özelliği tümör damarlanmasında önemlidir. Nanotüp tünellerin tümör hücreleri ile endotel hücreleri arasında da işlevsel olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Connor ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışmada, meme kanseri hücre soyları ile endotel hücreleri arasındaki nanotüp tünellerden onkojenik moleküllerin yayıldığı ve buna bağlı olarak endotel hücrelerde fenotipik farklılaşmanın olduğu belirlenmiştir³⁵. Araştırmacılar metastatik yayılım nedenini, kanser hücrelerinden mikroRNA'ların nanotüp tünelleme ile yatay düzlemde taşınmasına bağlamışlardır. Errede ve arkadaşlarının çalışması, CD31/ColIV belirteçlerinin immunohistokimyasal olarak işaretlenen insan glioblastoma doku kesitlerinde zengin bir nanotüp tünel ağının bulunduğunu ve nanotüp tünellemenin kapiller benzeri tümöral damarlara uzandığını bildirmektedir. Çalışmada, perisitlerden endotel hücelerine uzanan nanotüp tünellerin tümöral anjiyojenezi uyardığı öne sürülmüştür³⁶. Pasquier ve arkadaşlarının kemoterapi ajanlarına oluşan direnç ile ilgili yaptıkları çalışmada over ve meme kanseri hücreleri ile endotel hücreleri arasında mitokondri geçişini sağlayan nanotüp tünellerin olduğu gösterilmiştir. Çalışmada akım sitometri analizi ile incelenen MCF7 hücreleri arasından mitokondrileri alan kanser hücrelerinin, doksorubisine karşı direnç geliştirdiği belirtilmiştir³⁷. Hücreden hücreye haberleşmeyi sağlayan nanotüp tüneller ile tümör mikrotüpülerinin tümör gelişiminde ve tedaviye direnç oluşturmada nasıl rol oynadığı Roehlecke ve Schmidt tarafından derlenmiştir³⁸. Bu çalışmalar, heterotipik hücre kültürlerinde endotel hücreleri ile kanser hücreleri arasında gelişen nanotüp tünellemenin tümör biyolojisindeki önemini göstermektedir.

Nanotüp tünelleme ile hücreler arası iletişimi *in vivo* koşullarda kanıtlayan az sayıda çalışma vardır. Seyed-Razavi ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışmada Herpes simplex virus-1 ile enfekte edilen fare korneasında oluşan nanotüp sayısının 24 saat içinde arttığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada canlı hücre görüntüleme tekniği ile hücre sel stres ve sistemik enflamasyon etkisi altında kornea miyeloid kökenli hücrelerin gövdesinden nanotüp tünellerin diğer hücre sel uzantıların oluşum hızından daha hızlı (15,5 µm/dakika) olduğu ortaya konmuştur³⁹. Alarcon-Martinez ve arkadaşları,

nanotüp tünel ile bağlı perisitlerin, nöronal ve mikrovasküler etkinliğe olası katkısını araştırdıkları çalışmada, iki-foton lazer taramalı mikroskop ile fare retinasında ışık uyarısının kan akımında oluşturduğu değişiklikleri *in vivo* görüntülemişlerdir. Araştırmacılar tek ışık uyarısının ardından perisit çiftleri ile bağlanan kapillerlerin birinde daralma olurken diğerinde genişlemenin olduğunu belirlemişlerdir. Böylece kan akımının nöronal uyarı ile uyumlu olarak değişmesinde, perisitler arasında haberleşmeyi sağlayan nanotüp tünellemenin etkili olduğunu ortaya koymuşlardır⁴⁰.

Standart hücre kültüründe yürütülen bu çalışmanın, homotipik hücreler arasında endozomların hangi yöne doğru ilerlediği tespit edilemediği için bazı sınırlamaları vardır. Aydınlik alan mikroskop analizi ile hücreler canlı görüntülenebilir ve nanotüp tünelleme izlenebilir. Epifloresan mikroskop incelemesinde organellere özgü işaretleme ile organellerin hareket yönü ve hızı belirlenebilir.

Gerek *in vitro* gerekse *in vivo* koşullarda yürütülen çalışmalar nanotüp tünellerin hücreler arası iletişimde köprü rolü üstlendiğini göstermektedir. Hücrelerin içinde bulunduğu koşula göre bir hücre, aktin iskeletinin yön vermesi sonucu oluşan nanotüp tünelleme ile uzak mesafedeki bir hücre ile haberleşebilmektedir. Bu açıdan nanotüp tüneller hücreler arası haberleşmede morfolojik bir parametre olarak değerlendirilebilir. Sonuç olarak birçok hücre çeşidi tarafından oluşturulabilen bu iletişim köprülerinin nasıl kurulduğunun ve hücreler arasında hangi moleküllerin aktarıldığının çalışılması, ilaç direnci geliştiren kanser hücreleri ile ya da nanotüp tünellemeyi kullanan virüsler ile mücadelede yeni kapılar açması açısından önemli gözükmektedir.

Etik Kurul Onay Bilgisi:

Hücre kültürü çalışması olmasından dolayı Etik Kurul onayına gerek yoktur.

Araştırmacı Katkı Beyanı: Fikir ve tasarım: B.Ö.E.; Makalenin önemli bölümlerinin yazılması: B.Ö.E.

Destek ve Teşekkür Beyanı: Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje numarası: 21270).

Çıkar Çatışması Beyanı: Makale yazarının çıkar çatışması beyanı yoktur.

Kaynaklar

1. Sherer NM. Long-distance relationships: do membrane nanotubes regulate cell-cell communication and disease progression? *Mol Biol Cell* 2013; 24(8):1095-8.
2. Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes H-H. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* 2004;303:1007-10.
3. Önfelt B, Nedvetzki S, Benninger RK, et al. Structurally distinct membrane nanotubes between human macrophages sup-

- port long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria. *J Immunol* 2006; 177:8476.
4. 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; 254:142-8.
 5. 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; 9:310-5.
 6. 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.
 7. Victoria GS, Zurzolo C. The spread of prion-like proteins by lysosomes and tunneling nanotubes: implications for neurodegenerative diseases. *J Cell Biol* 2017; 216:2633-44.
 8. 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.
 9. 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.
 10. Watkins SC, Salter RD. Functional connectivity between immune cells mediated by tunneling nanotubules. *Immunity* 2005; 23:309-18.
 11. Biran A, Perelmutter M, Gal H, et al. Senescent cells communicate via intercellular protein transfer. *Genes Dev* 2015; 29:791-802.
 12. Thayanithy V, Dickson EL, Steer C, Subramanian S, Lou E. Tumorstromal cross talk: direct cell-to-cell transfer of oncogenic microRNAs via tunneling nanotubes. *Transl Res* 2014; 164:359-65.
 13. Wang Y, Cui J, Sun X, Zhang Y. Tunneling-nanotube development in astrocytes depends on p53 activation. *Cell Death Differ* 2011; 18:732-42.
 14. Koyanagi M, Brandes RP, Haendeler J, Zeiher AM, Dimmeler S. Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes. *Circ Res* 2005; 96:1039-41.
 15. Austefjord MW, Gerdes HH, Wang X. Tunneling nanotubes: diversity in morphology and structure. *Commun Integr Biol* 2014; 7:1-5.
 16. Sept D, McCammon JA. Thermodynamics and kinetics of actin filament nucleation. *Biophys J*. 2001; 81(2):667-74.
 17. Tojkander S, Gateva G, Lappalainen P. Actin stress fibers—assembly, dynamics and biological roles. *J Cell Sci* 2012; 125(Pt 8):1855-64.
 18. Mattera R, Arighi CN, Lodge R, Zerial M, Bonifacino JS. Divalent interaction of the GGAs with the Rabaptin-5–Rabex-5 complex. *EMBO J* 2003; 22(1):78-88.
 19. Scita G, Di Fiore PP. The endocytic matrix. *Nature* 2010; 463(7280):464-73.
 20. Kimura S, Hase K, Ohno H. The molecular basis of induction and formation of tunneling nanotubes. *Cell Tissue Res* 2013; 352(1): 67-76.
 21. 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; 118:3695-703.
 22. Islam MN, Das SR, Emin MT, et al. Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nat Med* 2012; 18:759-65.
 23. Jansens RJ, Tishchenko A, Favoreel HW. Bridging the Gap: Virus Long-Distance Spread via Tunneling Nanotubes. *J Virol* 2020; 94(8):e02120-19.
 24. Yasuda K, Khandare A, Burianovskyy L, et al. Tunneling nanotubes mediate rescue of prematurely senescent endothelial cells by endothelial progenitors: exchange of lysosomal pool. *Aging (Albany NY)*, 2011; 3(6):597-608.
 25. Buachan P, Chularojmontri L, Wattanapitayakul SK. Selected activities of *Citrus maximo* Merr. fruits on human endothelial cells: enhancing cell migration and delaying cellular aging. *Nutrients* 2014; 6(4):1618-34.
 26. Boisen L, Drasbek KR, Pedersen AS, Kristensen, P. Evaluation of endothelial cell culture as a model system of vascular ageing. *Exp Gerontol* 2010; 45(10):779-87.
 27. M Bektaş, E Haciosmanoğlu, B Özerman, B Varol, R Nurten, E Bermek. On diphtheria toxin fragment A release into the cytosol—Cytochalasin D effect and involvement of actin filaments and eukaryotic elongation factor 2. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011; 43(9):1365-72.
 28. Gerdes HH, Bukoreshtliev NV, Barroso JF. Tunneling nanotubes: a new route for the exchange of components between animal cells. *FEBS Lett* 2007; 581:2194.
 29. Hanna SJ, McCoy-Simandle K, Leung E, Genna A, Condeelis J, Cox D. The Role of Rho-GTPases and actin polymerization during Macrophage Tunneling Nanotube Biogenesis. *Sci Rep* 2017; 7: 8547.
 30. Delage E, Cervantes DC, Pénard E, et al. Differential identity of Filopodia and Tunneling Nanotubes revealed by the opposite functions of actin regulatory complexes. *Sci Rep* 2016; 6: 39632.
 31. Astanina K, Koch M, Jüngst C, Zumbusch A, Kiemer AK. Lipid droplets as a novel cargo of tunnelling nanotubes in endothelial cells. *Sci Rep* 2015; 5:11453.
 32. Pedicini L, Miteva KT, Hawley V, et al. Homotypic endothelial nanotubes induced by wheat germ agglutinin and thrombin. *Sci Rep* 2018; 8(1):7569.
 33. Liu K, Ji K, Guo L, et al. Mesenchymal stem cells rescue injured endothelial cells in an in vitro ischemia-reperfusion model via tunneling nanotube like structure-mediated mitochondrial transfer. *Microvas Res* 2014; 92:10-8.
 34. Wang X, Yu X, Xie C, et al. Rescue of brain function using tunneling nanotubes between neural stem cells and brain microvascular endothelial cells. *Mol Neurobiol*. 2016; 53:2480-8.
 35. Connor Y, Tekleab S, Nandakumar S, et al. Physical nanoscale conduit-mediated communication between tumour cells and the endothelium modulates endothelial phenotype. *Nat Commun* 2015; 6:8671.
 36. Errede M, Mangieri D, Longo G, et al. Tunneling nanotubes evoke pericyte/endothelial communication during normal and tumoral angiogenesis. *Fluids Barriers CNS* 2018; 15:28.
 37. Pasquier J, Guerrouahen BS, Al Thawadi H, et al. Preferential transfer of mitochondria from endothelial to cancer cells through tunneling nanotubes modulates chemoresistance. *J Transl Med* 2013; 11:94.
 38. Roehlecke C, Schmidt MH. Tunneling Nanotubes and Tumor Microtubes in Cancer. *Cancers* 2020; 12(4):857.
 39. Seyed-Razavi Y, Hickey MJ, Kuffová 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.
 40. Alarcon-Martinez L, Villafranca-Baughman D, Quintero H, et al. Interpericyte tunnelling nanotubes regulate neurovascular coupling. *Nature* 2020; 585(7823): 91-5.