

## TRÓJWYMIAROWE HODOWLE KOMÓREK NABŁONKA GRUCZOŁU SUTKOWEGO JAKO MODEL BADAWCZY PROCESU RÓŻNICOWANIA\*

THREE DIMENSIONAL MAMMARY EPITHELIAL CELLS CULTURES  
AS A MODEL FOR STUDYING THE PROCESSES OF DIFFERENTIATION

Małgorzata GAJEWSKA, Marcin KOZŁOWSKI, Tomasz MOTYL

Katedra Nauk Fizjologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

*Streszczenie:* Gruczoł sutkowy jest narządem zbudowanym z sieci przewodów i kanalików mlekośnych zakończonych pęcherzykami wydzielniczymi, które otacza zrąb tkanki mezenchymalnej. Pęcherzyki wydzielnicze składają się z komórek mioepitelialnych oraz komórek nabłonka gruczołu sutkowego wykazujących polaryzację szczytowo-podstawną i osiągających pełne, funkcjonalne zróżnicowanie dopiero w okresie laktogenezy. Dlatego też gruczoł sutkowy stanowi dobry model do badań nad procesami różnicowania komórek nabłonkowych. Opracowanie metod trójwymiarowych (3D) kultur komórkowych, opartych na hodowli komórek na tzw. zrekonstruowanej błonie podstawnej, komercyjnie dostępnej pod nazwą Matrigel dodatkowo umożliwiło badaczom lepsze odtworzenie warunków panujących *in vivo* i ogromny postęp w badaniach dotyczących procesów polaryzacji i różnicowania komórek. Niniejsza praca ma na celu podsumowanie wyników najnowszych badań, wykonanych z zastosowaniem hodowli 3D komórek nabłonka gruczołu sutkowego, które wskazują na zasadniczą rolę składników macierzy zewnątrzkomórkowej w regulacji procesów polaryzacji oraz różnicowania komórek nabłonkowych.

*Słowa kluczowe:* gruczoł sutkowy, nabłonek, macierz zewnątrzkomórkowa, integryny, różnicowanie.

*Summary:* The mammary gland is an organ comprised of branched ductal network terminated by secretory alveoli and embedded in mesenchymal stroma. Mammary alveoli, built by myoepithelial and epithelial cells with apico-basal polarity, obtain their functional differentiation only during lactogenesis. For this reason they represent a good model for studies on differentiation process of epithelium. The emergence of three-dimensional (3D) cell culture systems, based on the use of reconstituted basement membrane (rBM), commercially available as Matrigel, enabled to recreate the *in vivo* conditions, and brought a great progress in this area of research. The present review summarizes the latest achievements obtained with the use of 3D culture system of mammary gland acini. The results of these studies clearly indicate the important role of extracellular matrix (ECM) components in the regulation of polarization and functional differentiation of mammary luminal epithelium.

*Key words:* mammary gland, epithelium, extracellular matrix, integrins, differentiation.

\*Badania finansowane były ze środków projektu badawczego przyznanego przez MNiSW o nr: N308306733.

## WSTĘP

W organizmach wielokomórkowych jedną z podstawowych tkanek mających ściśle określoną organizację przestrzenną stanowi nabłonek. Podczas embriogenezy nabłonki biorą swój początek z ektodermy oraz endodermy i różnicują się w wyspecjalizowaną tkankę, której głównymi zadaniami są funkcje ochronne, kontrola procesów pobierania i transportu substancji ze środowiska zewnątrzkomórkowego, a w przypadku nabłonków gruczołowych również funkcje wydzielnicze. Komórki nabłonkowe, podobnie jak inne typy komórek eukariotycznych charakteryzują się przestrzenną orientacją, którą określamy mianem polaryzacji [36]. Szczególnie wyraźnie widoczna jest polaryzacja komórek w przypadku nabłonków jednowarstwowych. Mają one część szczytową (wierzchołkową), która ma kontakt ze światłem narządu, powierzchnię boczną mającą wiele typów połączeń międzykomórkowych (m.in. obwódki zwierające, desmosomy), umożliwiających wzajemny kontakt komórek ze sobą i z podłożem oraz część podstawną, która jest w bezpośrednim kontakcie z macierzą zewnątrzkomórkową – ECM (ang. *extracellular matrix*). Prawidłowe funkcjonowanie komórek nabłonkowych jest ściśle powiązane z ich prawidłową polaryzacją, a ta z kolei jest nierozzerwalnie związana z kontaktem nabłonków z macierzą zewnątrzkomórkową. ECM jest źródłem sygnałów biochemicznych oraz biofizycznych, utrzymujących właściwą organizację przestrzenną nabłonka. Pośredniczy również w przekazywaniu sygnałów parakrynnych pochodzących od komórek zrębu [23]. Zaburzenia w oddziaływaniach nabłonków ze zrębem oraz zmiany w organizacji przestrzennej są oznakami raka oraz wielu chronicznych chorób zwyrodnieniowych.

## GRUCZOŁ SUTKOWY JAKO MODEL DO BADAŃ NAD PROCESAMI POLARYZACJI I RÓŻNICOWANIA KOMÓREK NABŁONKOWYCH

Dobrym modelem do badań nad procesami prowadzącymi do prawidłowej polaryzacji oraz funkcjonalnego różnicowania komórek nabłonkowych jest gruczoł sutkowy, należący do nielicznych narządów w organizmie ssaków, których rozwój funkcjonalny odbywa się głównie w okresie postnatalnym. Daje to możliwość łatwego śledzenia zmian w tkance wydzielniczej u samic będących w różnym okresie dojrzałości płciowej oraz w różnym okresie cyklu laktacyjnego. W budowie gruczołu sutkowego wyróżnia się dwa zasadnicze rodzaje tkanek: tkankę mięszową, odpowiedzialną za funkcję wydzielniczą gruczołu oraz tkankę zrębową, która pełni funkcje strukturalne. Tkanekę mięszową stanowi gęsta sieć kanalików zakończonych pęcherzykami wydzielniczymi (mlekowymi). Zarówno pęcherzyki, jak i kanaliki zbudowane są z pojedynczej warstwy spolaryzowanych komórek nabłonkowych. Komórki nabłonkowe dodatkowo otacza warstwa komórek mięśniowo-nabłonkowych (mioepitelialnych), mająca bezpośredni kontakt z częścią zrębową gruczołu. Wraz ze zwiększającą się

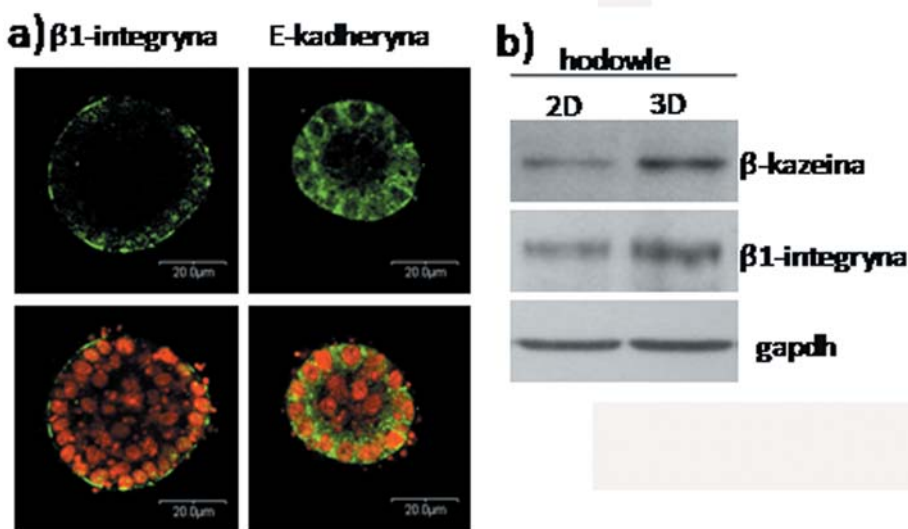
średnicą kanaliki przyjmują postać większych przewodów mlekonosnych, które dochodzą do brodawki sutka (lub w przypadku bydła do strzyku), gdzie rozszerzają się, wytwarzając bańki lub zatoki mlekonosne [46]. Zrąb gruczołu sutkowego składa się z komórek mezenchymalnych: fibroblastów, adipocytów, komórek plazmatycznych oraz macierzy zewnątrzkomórkowej.

Podstawową funkcjonalną jednostkę gruczołu sutkowego stanowi pęcherzyk wydzielniczy zbudowany z pojedynczej warstwy spolaryzowanych komórek nabłonkowych, których część wierzchołkowa zwrócona jest ku światłu pęcherzyka, a strona podstawna kontaktuje się z pojedynczą warstwą komórek mięśniowo-nabłonkowych. Komórki mioepitelialne otoczone są błoną podstawną, stanowiącą wyspecjalizowany rodzaj macierzy zewnątrzkomórkowej. Zostaje ona utworzona w wyniku oddziaływań komórek nabłonkowych ze zrębem, co prowadzi do wytworzenia specyficznych składników ECM (laminin 1, 5 i 10, kolagenu typu IV, entaktyny oraz proetoglikanów) w postaci ok. 100 nm warstwy macierzy u podstawy komórek mięśniowo-nabłonkowych [53]. Komórki nabłonkowe połączone są z błoną podstawną za pomocą receptorów błonowych, z których najlepiej poznaną klasą są receptory integrynowe [55, 38]. Funkcją tych receptorów jest nie tylko kontakt komórek z macierzą zewnątrzkomórkową, ale również przekazywanie sygnałów pochodzących ze zrębu gruczołu sutkowego oraz wytwarzanych parakrynnie cytokin i czynników wzrostowych [24].

Badania *in vivo* i *ex vivo* dostarczyły wiele interesujących obserwacji dotyczących zmian w strukturze tego narządu podczas cyklu laktacyjnego oraz wpływu hormonów i czynników wzrostowych na rozwój gruczołu sutkowego różnych gatunków zwierząt. Zastosowanie badań *in vitro*, z wykorzystaniem kultur komórkowych, przyczyniło się do poznania molekularnych mechanizmów odpowiedzi komórek nabłonkowych na sygnały pochodzące od hormonów laktogennych oraz czynników wzrostowych, których poziom zmienia się w czasie mammogenezy oraz cykli laktacyjnych. Zdecydowana większość tych doświadczeń opiera się jednak na hodowlach komórkowych prowadzonych na plastikach. W takich warunkach komórki o właściwościach adhezyjnych w momencie kontaktu z podłożem zaczynają proliferację tworząc jednowarstwę. Hodowane komórki choć mogą przybierać tkankowo-specyficzne kształty, jednak nie są w stanie osiągnąć charakterystycznej orientacji przestrzennej, którą zapewniają im warunki naturalne. Dzieje się tak ponieważ płaska, sztywna powierzchnia plastiku uniemożliwia receptorom integrynowym przekazywanie właściwych sygnałów inicjujących prawidłową polaryzację rosnącym komórkom. Komórki nabłonka wydzielniczego utrzymywane na plastiku hodowlanym nie wykazują pełnego funkcjonalnego zróżnicowania, czego wynikiem jest niezdolność do wytwarzania składników mleka w odpowiedzi na działanie hormonów laktogennych [35, 45].

Skutecznym narzędziem w badaniach nad molekularnymi procesami różnicowania struktur nabłonkowych okazały się trójwymiarowe (3D) kultury komórkowe, opierające się na hodowli komórek nabłonkowych na jednym, lub kilku składnikach macierzy zewnątrzkomórkowej. Rozwój trójwymiarowych modeli badawczych *in vitro* rozpoczął się ponad 30 lat temu, kiedy Elsdale i Bard w 1972 roku opisali system hodowli fibroblastów na podłożu kolagenowym, osiągając trójwymiarową sieć

włókien [10]. Emerman i Pitelka w roku 1977 opisali hodowlę komórek nabłonka wydzielniczego wyizolowanych z gruczołu sutkowego myszy na podłożu kolagenowym [11]. Obecność kolagenu umożliwiła odtworzenie w warunkach *in vitro* właściwej polaryzacji komórek oraz powstawanie struktur pęcherzykowych przypominających pęcherzyki wydzielnicze *in vivo*. Obserwacje budowy ultrastrukturalnej komórek nabłonkowych wykazały, iż w takich warunkach były one również w stanie odtworzyć błonę podstawną wokół tworzących się struktur pęcherzykowych. Późniejsze badania pokazały, że to właśnie składniki błony podstawnej (lamininy, kolagen IV) są głównymi czynnikami warunkującymi prawidłową polaryzację oraz funkcjonalne różnicowanie komórek nabłonka gruczołu sutkowego, a jeden z jej składników – laminina 1 należy do białek indukujących ekspresję beta kazeiny [32, 45, 52]. Zaowocowało to stworzeniem komercyjnie dostępnego podłoża hodowlanego o nazwie Matrigel, które jest nazywane zrekonstruowaną błoną podstawną – rBM (ang. *reconstituted basement membrane*) [4]. Matrigel jest sterylnym roztworem



RYCINA 1. Struktury pęcherzykowe utworzone przez komórki nabłonka gruczołu sutkowego bydła linii BME-UV1 hodowane na podłożu Matrigel: a) obraz struktur pęcherzykowych z mikroskopu konfokalnego; komórki nabłonkowe będące w bezpośrednim kontakcie z podłożem wykazują prawidłową polaryzację, uwidocznioną specyficznym barwieniem receptorów integrynowych u podstawy komórek oraz właściwą boczną lokalizacją białka adhezyjnego E-kadheryny (barwienie zielone przeciwciałami sprzęzonymi z barwnikiem Alexa Fluor488, jądra wybarwione 7AAD na czerwono), b) różnice w poziomie  $\beta$ -kazeiny oraz  $\beta$ 1-integriny w komórkach rosnących w formie jednowarstwy w klasycznych hodowlach 2D na plastiku oraz tworzących struktury pęcherzykowe w kulturach 3D na Matrigelu, gapdh użyto jako białka referencyjnego

FIGURE 1. Acinar structures formed by BME-UV1 bovine mammary epithelial cells cultured on Matrigel: a) confocal images of acini with proper polarization of cells, that are in direct contact with ECM components – antibodies against two polarization markers:  $\beta$ 1-integrin, and E-cadherin were used to show special orientation of cells (green staining), nuclei were stained red with 7AAD; b) differences in  $\beta$ -casein and  $\beta$ 1-integrin levels between monolayer cell culture, and 3D culture of cells forming acinar structures on Matrigel, gapdh was used as a reference protein

białek wyekstrahowanych z guza mysiego mięsaka Engelbretha-Holma-Swarma (EHS), będącego guzem bogatym w białka macierzy zewnątrzkomórkowej. Głównymi składnikami Matrigelu są lamininy, kolagen IV, entaktyna oraz proteoglikan. W temperaturze 37°C Matrigel tworzy trójwymiarowy żel, wspierający rozwój morfotyczny, różnicowanie i wzrost komórek. Komórki nabłonka gruczołu sutkowego hodowane na Matrigelu tworzą prawidłowo spolaryzowane struktury pęcherzykowe budową przypominające pęcherzyki wydzielnicze. Część szczytowa komórek zwrócona jest do wnętrza pęcherzyka, zaś część podstawna kontaktuje się za pomocą receptorów integrynowych ze składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej [4, 8] (ryc. 1a). Utworzone struktury mają również zdolność wytwarzania składników mleka do światła pęcherzyka w obecności hormonów laktogennych. Ekspresja białek mleka jest bezpośrednio uzależniona od kontaktu komórek nabłonka wydzielniczego z błoną podstawną. Na promotorach genów kodujących kazeiny znajduje się specyficzne miejsce wiązania czynników transkrypcyjnych, nazwane miejscem indukowanym przez macierz zewnątrzkomórkową (ang. *ECM response element*), do którego przyłączają się czynniki transkrypcyjne (GR, STAT5, C/EBP) niezbędne do indukcji transkrypcji tych genów [5].

Warto też podkreślić, że prawidłową polaryzację osiągają jedynie komórki nabłonka gruczołu sutkowego niewykazujące znamion transformacji nowotworowej. Komórki wyizolowane z guzów piersi lub linie nowotworowe gruczołu sutkowego, takie jak: HMT-3522, MCF-7, czy MDA-MB-231, nie są w stanie w tych warunkach utworzyć zróżnicowanych struktur pęcherzykowych, lecz rosną w postaci bryłkowatych tworów, zbudowanych z komórek niewykazujących polaryzacji lub wykazujących nieprawidłową polaryzację [48, 20, 9, 40].

## **METODY PROWADZENIA TRÓJWYMIAROWYCH HODOWLI KOMÓREK NABŁONKA GRUCZOŁU SUTKOWEGO**

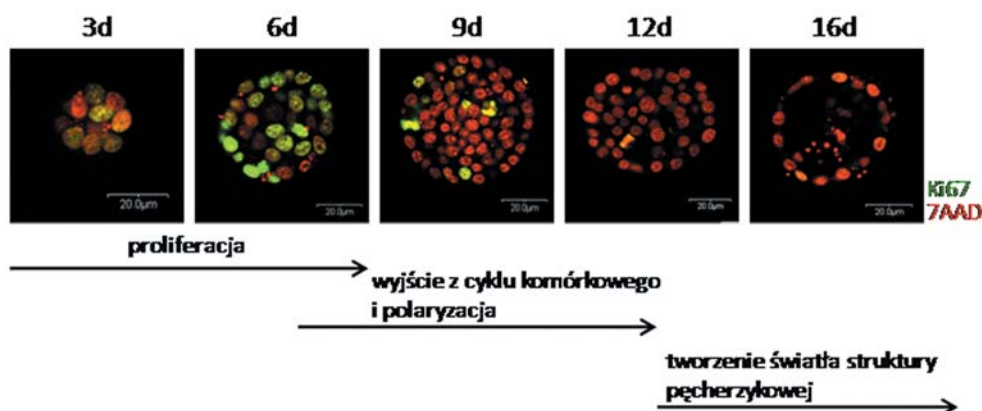
Istnieje kilka sposobów hodowli komórek nabłonka gruczołu sutkowego w kulturach 3D. Do najpowszechniej stosowanych metod należą hodowle komórek wewnątrz lub na powierzchni Matrigelu bądź żeli kolagenowych. Szczegółowe procedury metodyczne zostały przedstawione w kilku bardzo interesujących pracach przeglądowych [61, 23, 31]. W ogólnym zarysie prowadzenie trójwymiarowej hodowli komórek nabłonka gruczołu sutkowego należy rozpocząć od pokrycia powierzchni szalek lub szkiełek nakrywkowych typu Lab-Tek™ warstwą Matrigelu (o grubości ok. 1 mm), który w temperaturze 0–4°C znajduje się w postaci płynnej i jest łatwy do równomiernego rozprowadzenia po danej powierzchni. W temperaturze 37°C tworzy on trójwymiarowy żel, będący właściwą powierzchnią hodowlaną dla komórek. Nasze laboratorium stosuje powierzchniową metodę hodowli komórek nabłonka gruczołu sutkowego bydła na Matrigelu. Sposób ten pozwala na użycie bezpośrednich metod barwienia immunofluorescencyjnego w celu wykrywania markerów proliferacji (np. Ki-67), czy polaryzacji (np. E-kadheryna, ZO-1, integryny),



które w przypadku prowadzenia hodowli komórek wewnątrz żelu zawierającego składniki błony podstawnej muszą być poprzedzone przygotowaniem skrawków mrożeniowych. Łatwiejsza jest również izolacja białek komórkowych z powierzchniowych hodowli 3D. Istnieją również bardziej wyspecjalizowane formy powierzchni, na które nakładany jest Matrigel. Takie powierzchnie tworzone są technikami litografii (zwanymi z ang. *microtransfer molding* oraz *dry lift-off*), dzięki czemu możliwe jest śledzenie rozwoju pojedynczych struktur pęcherzykowych, powstających z podziałów pojedynczej komórki nabłonka gruczołu sutkowego nałożonej na tego typu produkt [50].

Obserwowany proces różnicowania komórek nabłonka gruczołu sutkowego na Matrigelu przebiega w trzech etapach. Początkowo komórki nabłonkowe rozpoczynają proliferację tworząc małe, okrągłe skupiska. Niedługo po tym, struktury te tworzą oś szczytowo-podstawnej polaryzacji. Przejawia się ona sekrecją składników macierzy przez część podstawną komórek nabłonkowych, odpowiednią przestrzenną orientacją (boczną lub szczytową) połączeń międzykomórkowych oraz rozmieszczeniem aparatu Golgiego w szczytowej części komórek. Takie rozmieszczenie aparatu Golgiego w komórkach umożliwia w późniejszych etapach rozwoju sekrecję białek mleka do wnętrza pęcherzyka [8, 48]. Należy podkreślić, iż właściwą polaryzację uzyskują wyłącznie komórki będące w bezpośrednim kontakcie z macierzą zewnątrzkomórkową. Z tego względu podczas dalszego rozwoju tworzących się struktur pęcherzykowych *in vitro* dochodzi do wyjścia komórek z cyklu komórkowego oraz stopniowego tworzenia światła pęcherzyka przez śmierć komórek znajdujących się w środkowej jego części drogą apoptozy [7, 44]. Komórki, które tracą kontakt z Matrigelem i narażone są na stres związany z niedoborem substancji odżywczych, wykazują początkowo cechy autofagii [14, 17]. Później jednak dochodzi do stopniowej śmierci komórek w centralnej części tworzących się struktur pęcherzykowych, ma miejsce specyficzny rodzaj śmierci apoptotycznej zwanej anoikis [7, 33].

Opisany powyżej proces różnicowania komórek nabłonka gruczołu sutkowego w funkcjonalne struktury pęcherzykowe zachodzi zarówno w przypadku komórek hodowli pierwotnej, izolowanych zwykle z gruczołów sutkowych ciężarnych samic, jak również w przypadku hodowli 3D ustalonych linii komórkowych. Różnica polega jedynie na tempie tworzonych pęcherzyków. Trójwymiarowe hodowle pierwotne mysich komórek nabłonka wydzielniczego wytwarzają dojrzałe struktury pęcherzykowe o pustym świetle w czasie zaledwie czterech dni hodowli [37]. Wynika to z faktu, iż struktury takie nie są tworzone z pojedynczych komórek, lecz z agregatów komórkowych pozyskiwanych w czasie izolacji. Mają one wyższy potencjał proliferacyjny i rozwojowy, ponieważ izolowane są z gruczołów sutkowych, pochodzących z okresu najintensywniejszego wzrostu i różnicowania (ciąży). W doświadczeniach prowadzonych na liniach komórkowych nabłonka gruczołu sutkowego hodowanych na Matrigelu komórki nabłonka wydzielniczego do pełnej polaryzacji oraz zróżnicowania potrzebują około 2 tygodni (od 12 do 20 dni) bez względu na to, czy są to komórki linii ludzkiej, mysiej, czy bydłowej [8, 15, 60, 29]. Nasze badania wykazały, iż komórki nabłonka gruczołu sutkowego bydła linii BME-



RYCINA 2. Fazy tworzenia przez komórki nabłonka gruczołu sutkowego bydła linii BME-UV1 dojrzałych struktur pęcherzykowych na podłożu Matrigel. Zdjęcia przedstawiają obraz z mikroskopu konfokalnego struktur pęcherzykowych w różnych dniach hodowli; jako markera proliferacji użyto białka Ki67 (barwienie zielone przeciwciałami sprzężonymi z barwnikiem Alexa Fluor488), jądra komórkowe wybarwiono na czerwono 7AAD

FIGURE 2. Phases of acinar structures' formation by BME-UV1 bovine mammary epithelial cells cultured on Matrigel – confocal images represent acini during 16 days of 3D cell culture, green staining shows proliferation marker: Ki67, nuclei were stained red with 7AAD

UV1 rosnące na podłożu Matrigel potrzebują ok. 16 dni do utworzenia w pełni zróżnicowanych struktur pęcherzykowych (ryc. 2).

## UDZIAŁ SKŁADNIKÓW MACIERZY ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ W REGULACJI RÓŻNICOWANIA KOMÓREK NABŁONKA GRUCZOŁU SUTKOWEGO

Badania prowadzone na modelu trójwymiarowych kultur *in vitro* komórek nabłonka gruczołu sutkowego dostarczają coraz więcej informacji dotyczących procesów różnicowania komórek oraz ich interakcji ze środowiskiem zewnątrzkomórkowym. Dzięki nim udowodniono m.in., iż skład macierzy zewnątrzkomórkowej (zawartość laminin, kolagenu typu Iv oraz I), jak również właściwości biofizyczne decydują o różnicowaniu oraz morfologii komórek nabłonkowych [12, 30]. Kontakt komórek z lamininą 1 indukuje sygnały decydujące o właściwej polaryzacji nabłonka, tworzeniu struktur pęcherzykowych oraz ekspresji genów charakterystycznych dla tkanki gruczołowej [19, 3]. Grupa Miny J. Bissell wykazała, że sygnały te wywołują również deacetylację histonów H3 oraz H4 w komórkach nabłonka gruczołu sutkowego przechodzących wymienione zmiany morfotyczne [30].

Ponadto stwierdzono, iż nawet elastyczność podłoża, na którym hodowane są komórki decyduje o ich rozwoju. Podłoża bogate w lamininę 1 (zawartość ok. 40%), takie jak: Matrigel wykazują elastyczność zbliżoną do warunków panujących w warunkach *in vivo* i przyczyniają się do wysokiej ekspresji  $\beta$ -kazeiny. Z kolei

hodowla na podłożach o większej sztywności, np. na macierzy zewnątrzkomórkowej o zredukowanej ilości lamininy 1 do 10% lub na sztywnych żelach poliakrylamidowych powoduje drastyczne obniżenie ekspresji  $\beta$ -kazeiny [3]. Co więcej, okazuje się, iż obniżenie elastyczności macierzy zewnątrzkomórkowej jest jedną z cech obserwowanych w guzach litych nowotworów gruczołu sutkowego [42]. Z kolei McDaniel i wsp. [34] pokazali, iż skład macierzy zewnątrzkomórkowej zasadniczo różni się w poszczególnych fazach cyklu laktacyjnego gruczołu sutkowego i determinuje sposób różnicowania komórek nabłonkowych. W swoim doświadczeniu badacze izolowali ECM od nieciążarnych samic szczurów oraz od samic w okresie involucji. Następnie wzbogacali oni Matrigel wyizolowaną macierzą w stosunku 1:1 i na tak przygotowanym podłożu prowadzili hodowlę komórek nabłonka gruczołu sutkowego linii MCF-12A. Okazało się, iż komórki rosnące na Matrigelu wzbogaconym macierzą zewnątrzkomórkową wyizolowaną od zwierząt będących w okresie involucji tworzyły typowe trójwymiarowe struktury pęcherzykowe. Tymczasem wzbogacenie Matrigelu w macierz pochodzącą od nieciążarnych samic inicjowało tworzenie przez te komórki struktur przypominających przewody mlekońskie.

Również odpowiedź komórkowa na badane czynniki różni się w zależności od tego, czy komórki hodowane są w postaci jednowarstwy czy też w kulturach 3D. Przykładem może być przekazywanie sygnału indukowanego przez naskórkowy czynnik wzrostowy – EGF (ang. *epidermal growth factor*). Wang i wsp. [57] zaobserwowali, iż w przekazywaniu sygnału pochodzącego od aktywowanego przez ligand receptora EGFR bierze również udział  $\beta$ 1-integryna, ale tylko w przypadku, kiedy komórki nabłonka gruczołu sutkowego hodowane są w kulturach 3D. Nasze badania wykazały, iż obecność składników macierzy zewnątrzkomórkowej stymuluje komórki nabłonka gruczołu sutkowego byłą linii BME-UV1 do syntezy białek mleka, a poziom tych białek jest istotnie wyższy w porównaniu do ilości uzyskiwanej podczas hodowli w klasycznej jednowarstwie (ryc. 1b). Sygnały pochodzące od podłoża przekazywane są komórkom przez receptory integrynowe, których ekspresja również jest istotnie wyższa w komórkach rosnących w 3D. Co więcej, poziom  $\beta$ -kazeiny był wyższy w komórkach rosnących na Matrigelu nawet w hodowlach niestymulowanych prolaktyną (obserwacje własne). Wykonana przez nasz zespół analiza porównawcza genów ulegających ekspresji w komórkach nabłonka gruczołu sutkowego byłą rosnących w hodowlach 2D oraz 3D, wykonana przy pomocy mikromacierzy cDNA, wykazała istotne różnice w ekspresji ponad 40 genów, spośród których znajdowały się geny kodujące białka cytoszkieletu, składniki macierzy zewnątrzkomórkowej, czynniki transkrypcyjne oraz kinazy, m.in. serynowo-treoninowa kinaza Rac, która bierze udział w szlakach sygnałowych związanych z procesami rozwoju, kontrolą cyklu komórkowego, przemianami cytoszkieletu oraz adhezją komórek pośredniczoną przez receptory integrynowe [29].



## ZNACZENIE INTEGRYN W PROCESIE RÓŻNICOWANIA KOMÓREK NABŁONKA GRUCZOŁU SUTKOWEGO

Właściwy odbiór sygnałów pochodzących od macierzy zewnątrzkomórkowej i błony podstawnej, będącej jej pochodną, zapewniają komórkom receptory integrynowe, zlokalizowane w części podstawnej błony komórkowej. Co więcej regulują one również odpowiedź komórkową na czynniki wzrostowe oraz cytokiny wydzielane auto/parakrynnie. Wrażliwość komórek na te czynniki jest bowiem uzależniona od lokalizacji komórek w tkance gruczołowej [24]. Integryny są heterodimerycznymi receptorami zbudowanymi z dwóch typów podjednostek:  $\alpha$ - i  $\beta$ - [38]. Obecnie znane są 24 typy heterodimerów integrynowych wykazujących powinowactwo do różnych ligandów [55, 22], z czego w nabłonku gruczołu sutkowego stwierdza się obecność dimerów:  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\beta 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\alpha 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha 9\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 4$ ,  $\alpha v\beta 5$ , oraz  $\alpha v\beta 6$  [18]. Badania *in vivo* oraz *in vitro* w hodowlach 3D wykazały, iż decydującą rolę w przekazywaniu sygnału ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórki odgrywają podjednostki „beta” integryn. O prawidłowym różnicowaniu gruczołu sutkowego decyduje właściwy poziom ekspresji tych podjednostek na powierzchni błony komórkowej. Na przykład zbyt wysoki poziom  $\beta 4$ -integryny, która w warunkach fizjologicznych wykazuje pozytywny wpływ na polaryzację komórek, powoduje oporność komórek na apoptozę i powiązany jest z procesami nowotworzenia [58]. Istotną rolę w kontroli prawidłowego przebiegu różnicowania komórek nabłonka gruczołu sutkowego ma również podjednostka  $\beta 1$ -integryn. Delecja tej podjednostki powoduje zahamowanie proliferacji i rozwoju pęcherzyków wydzielniczych *in vivo* oraz tworzenia nieprawidłowych struktur pęcherzykowych *in vitro* [39]. Ponadto podjednostka ta reguluje odpowiedź komórek nabłonkowych na hormony laktogenne. Jej brak zahamowuje translokację czynnika transkrypcyjnego Stat5 do jądra komórkowego pod wpływem prolaktyny. Świadczy to o znaczącym udziale  $\beta 1$ -integryny w procesie funkcjonalnego różnicowania komórek nabłonka wydzielniczego [52, 39, 2].

Znaczenie  $\beta 1$ -integryny w regulacji różnicowania komórek nabłonka gruczołu sutkowego potwierdzają również obserwacje badaczy, zajmujących się charakterystyką populacji komórek macierzystych w gruczole sutkowym. Schackleton i wsp. [47] oraz Stingl i wsp. [51] w swoich pracach opisali metodę identyfikacji oraz izolacji komórek macierzystych opartą na połączeniu kilku markerów powierzchniowych: CD24,  $\beta 1$ -integryny (CD29) oraz  $\alpha 6$ -integryny (CD49f). Komórki wykazujące obecność CD24 oraz wysoką ekspresję CD29 i CD49f charakteryzowały się wysoką zdolnością samoodnowy oraz były w stanie zregenerować cały narząd po przeszczepieniu ich do gruczołu sutkowego myszy biorcy pozbawionego tkanki mięszonej. Dalsze badania Taddei i wsp. [54] pokazały, że oddziaływanie  $\beta 1$ -integryn z macierzą zewnątrzkomórkową warunkują również utrzymanie na stałym poziomie populacji komórek macierzystych w gruczole sutkowym oraz właściwą segregację i umiejscowienie poszczególnych linii komórkowych (mioepitelialnych oraz nabłonkowych) podczas mammoogenezy.

## **ZNACZENIE SKŁADNIKÓW MACIERZY ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ W REGULACJI SYGNAŁÓW POCHODZĄCYCH OD HORMONÓW I CZYNNIKÓW WZROSTOWYCH**

Działanie większości hormonów i czynników wzrostowych odgrywających znaczącą rolę w rozwoju gruczołu sutkowego podlega regulacji przez macierz zewnątrzkomórkową oraz receptory integrynowe. Dzieje się tak, ponieważ duża grupa receptorów powierzchniowych, specyficznych dla czynników wzrostowych, takich jak: naskórkowy czynniki wzrostowy – EGF, insulinopodobny czynniki wzrostowy – IGF, czynnik wzrostu hepatocytów – HGF, czy transformujący czynnik wzrostowy beta – TGF- $\beta$ , należy do klasy receptorów tyrozynowych lub serynowo-treoninowych, mających wspólne z integrynami szlaki przekaźnictwa sygnałów [6]. Przykładem może być IGF-I, wytwarzany przez komórki zrębu w wyniku działania hormonu wzrostu. Wraz z EGF czynnik ten stymuluje proliferację komórek nabłonka gruczołu sutkowego, przy czym wykazano, że efekt obydwu czynników jest silniejszy, jeśli komórki mają kontakt ze składnikami błony podstawnej (kolagenem I i IV, lamininą, czy fibronktyną [26]. Ponadto doświadczenia na jednowarstwie pokazały, iż EGF podwyższa ekspresję białek wiążących IGF (IGFBPs) regulując w ten sposób działanie IGF-I na komórki nabłonkowe. Tym czasem kontakt komórek z macierzą zewnątrzkomórkową znosi to działanie EGF [59].

Badania prowadzone z wykorzystaniem trójwymiarowych hodowli *in vitro* pokazały też istotną rolę HGF w procesie tworzenia oraz rozgałęziania przewodów mlekośnych [21, 1]. Komórki nabłonka gruczołu sutkowego rosnące na podłożu kolagenowym i traktowane HGF wraz z progestyną wykazywały rozwój podobny do obserwowanego *in vivo*. Zastosowanie przeciwciał blokujących podjednostkę  $\alpha 2$ -integryny hamowało rozwój przewodów stymulowany przez HGF [21]. Zablockowanie podjednostki  $\beta 1$ -integryny wywołało podobnie hamujący efekt na działanie HGF. Świadczy to o szczególnej roli integryn w przekazywaniu sygnałów indukujących rozwój gruczołu sutkowego podczas mammogenezy.

Innym czynnikiem wzrostowym, na którego działanie ma wpływ kontakt komórek z macierzą zewnątrzkomórkową, jest TGF- $\beta 1$ . TGF- $\beta 1$  jest czynnikiem wzrostowym działającym antyproliferacyjnie oraz proapoptotycznie na komórki nabłonka gruczołu sutkowego [28, 16]. Wykazano jednak, że komórki rosnące na podłożu zawierającym składniki błony podstawnej nie podlegają apoptozie pod wpływem tej cytokiny, a jedynie zahamowany zostaje ich wzrost [43]. Niedawne badania Ewana i wsp. [13] pokazują możliwość występowania wzajemnych zależności pomiędzy promitotycznym wpływem estrogenów a antyproliferacyjnym wpływem TGF- $\beta 1$  na komórki nabłonkowe rosnące w hodowlach 3D. Najnowsza teoria przewiduje, iż kontakt komórek z macierzą zewnątrzkomórkową umożliwia wydzielanemu auto/parakrynnie czynnikowi TGF- $\beta 1$  hamowanie proliferacji komórek nabłonka gruczołu sutkowego indukowanej przez hormony steroidowe, jednak oddziaływanie komórek z podłożem poprzez receptory integrynowe chroni komórki przed działaniem apoptogennym tej cytokiny [24].

Działanie wielu hormonów mających istotny wpływ na różnicowanie komórek nabłonka gruczołu sutkowego również podlega regulacji przez interakcję z macierzą zewnątrzkomórkową. Prolaktyna, będąca znanym hormonem laktogennym, stymuluje komórki nabłonka wydzielniczego do różnicowania tylko w obecności składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Również w przypadku steroidów, które mają istotny wpływ na rozwój przewodów mlekoносnych i pęcherzyków wydzielniczych, wykazano podobne zależności. Dodatek  $17\beta$ -estradiolu do hodowli komórek nabłonka gruczołu sutkowego bydła linii BME-UV1 na Matrigelu przyspiesza ich polaryzację oraz tworzenie pustych w środku struktur pęcherzykowych (obserwacje własne). Kim i wsp. [25] wykazali, iż szlak indukowany przez estrogeny jest również powiązany ze szlakiem integrynowym przez kinazę Src, która pośredniczy w indukcji sygnałów proliferacyjnych i uruchamia aktywację MAP kinaz. Inne badania pokazały, iż kolagen IV oraz lamininy mogą regulować ekspresję receptora estrogenowego alfa ( $E\alpha$ ) poprzez oddziaływanie z podjednostkami integrynowymi:  $\alpha 2$ ,  $\alpha 6$  i  $\beta 1$  [41].

Kolejną istotną grupą hormonów regulujących utrzymanie prawidłowej polaryzacji i tworzenia obwódek zwierających przez komórki nabłonka gruczołu sutkowego stanowią glikokortykosteroidy. Indukcja sygnału pochodzącego od hormonów z tej grupy, m.in. hydrokortyzonu, przebiega przez szlak kinaz MEKK4/JNK. Zahamowanie tego szlaku specyficznym inhibitorem kinazy JNK (SP600125) hamuje ekspresję  $\beta 4$ -integryny oraz powoduje zaburzenie polaryzacji komórek i tworzenie niezróżnicowanych organoidów [37].

### **STWORZENIE PEŁNEGO MODELU GRUCZOŁU SUTKOWEGO *IN VITRO* – KOKULTURY KOMÓRKOWE NA SKŁADNIKACH MACIERZY ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ**

Badania z wykorzystaniem składników macierzy zewnątrzkomórkowej w hodowli komórek nabłonka gruczołu sutkowego *in vitro* jednoznacznie pokazują, iż zarówno w rozwoju tego narządu, jak i w procesach nowotworzenia istotną rolę odgrywa mikrośrodowisko tkanki gruczołowej. Z tego względu pojawiają się próby dokładniejszego odwzorowania warunków panujących w gruczole sutkowym podczas morfogenezy, funkcjonalnego różnicowania oraz nowotworzenia. Możliwość taką może stworzyć zastosowanie tzw. kokultur komórkowych, w których prócz błony podstawnej dołączane są również komórki zrębu. Ostatnio Wang i wsp. [57] przedstawili metodę hodowli ludzkich komórek nabłonka gruczołu sutkowego na podłożu Matrigel wraz z komórkami macierzystymi tkanki tłuszczowej, zwanymi hASCs (ang. *human adipose stem cells*). Wykazali oni, iż obecność hASCs spowodowała hamowanie proliferacji komórek nabłonkowych oraz przyspieszała ich funkcjonalne różnicowanie przez indukcję morfogenezy przewodowej i pęcherzykowej. Inni badacze zastosowali w swych doświadczeniach hodowlę ludzkich komórek nabłonka gruczołu sutkowego wraz z ludzkimi fibroblastami, które izolowano z gruczołów sutkowych zdrowych kobiet po redukcyjnej plastyce piersi [27].

Doświadczenia prowadzone były na żelu kolagenowym typu I lub mieszaninie kolagenu typu I z Matrigelem. Zauważyli oni, że obecność fibroblastów w hodowli komórkowej wzmacniała tworzenie struktur pęcherzykowych oraz przewodów przez komórki nabłonkowe. Wcześniejsze badania grupy Malathy Shekhar [49], która prowadziła kokultury zarówno z fibroblastami wywodzącymi się z gruczołów sutkowych po mammoplastyce, jak i z guzów piersi wskazywały natomiast, że fibroblasty z tkanki nowotworowej powodują silniejszą indukcję wzrostu i tworzenia przewodów *in vitro*, co może świadczyć o silnym wpływie komórek zrębu i całego mikrośrodowiska wewnątrzgruczołowego na możliwość inicjacji angiogenezy i powstawania przerzutów.

## PODSUMOWANIE

Opracowanie metod hodowli *in vitro* trójwymiarowych struktur przypominających pęcherzyki wydzielnicze przyniosło odpowiedź na wiele pytań związanych z przebiegiem procesów polaryzacji i różnicowania komórek nabłonka gruczołu sutkowego. Dzięki hodowli komórek nabłonkowych na zrekonstruowanej błonie podstawnej (Matrigelu) wiemy obecnie, że w procesie funkcjonalnego różnicowania istotne są oddziaływania pomiędzy białkami podłoża: kolagenem, lamininami a komórkami, jak również pomiędzy sąsiadującymi komórkami, tworzącymi struktury pęcherzykowe. Oddziaływania te warunkują prawidłową polaryzację szczytowo-podstawną oraz stopniowe tworzenie światła pęcherzyka, zaś zaburzenia w nich mogą prowadzić do procesu nowotworzenia. Ponieważ komórki nowotworowe na Matrigelu nie są w stanie odtworzyć prawidłowych struktur pęcherzykowych, badania z zastosowaniem hodowli 3D pozwalają również lepiej zrozumieć biologiczne oraz biochemiczne różnice pomiędzy komórkami normalnego nabłonka oraz komórkami nowotworowymi. Dodatkowe możliwości poznawcze może również przynieść zastosowanie w hodowli 3D kokultury komórkowych. Komórki zrębu (adipocyty, fibroblasty, komórki plazmatyczne) otaczające tkankę gruczołową stanowią bowiem źródło czynników wzrostowych i cytokin oraz mają bezpośredni wpływ na skład macierzy zewnątrzkomórkowej. Lepsze i coraz bardziej szczegółowe poznanie wzajemnych interakcji pomiędzy komórkami i macierzą zewnątrzkomórkową nie tylko pozwoli w przyszłości lepiej zrozumieć procesy sterujące różnicowaniem komórek, ale również opracować terapie przeciwnowotworowe nowej generacji wykorzystując wiedzę zdobytą między innymi dzięki zastosowaniu trójwymiarowego modelu hodowli komórkowych.

## LITERATURA

- [1] ACCORNERO P, MARTIGNANI E, MACCHI E, BARATTA M. Hepatocyte growth factor exerts multiple biological functions on bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci* 2007; **90**(9): 4289–4296.
- [2] AKHTAR N, STREULI CH. Rac1 links integrin-mediated adhesion to the control of lactational differentiation in mammary epithelia. *J Cell Biol* 2006; **173**(5): 781–793.

- [3] ALCARAZ J, XU R, MORI H, NELSON CM, MROUE R, SPENCER VA, BROWNFIELD D, RADISKY DC, BUSTAMANTE C, BISSELL MJ. Laminin and biomimetic extracellular elasticity enhance functional differentiation in mammary epithelia. *EMBO J* 2008; **27**(21): 2829–2838.
- [4] BARCELLOS-HOFF MH, AGGELER J, RAM TG, BISSELL MJ. Functional differentiation and alveolar morphogenesis of primary mammary cultures on reconstituted basement membrane. *Development* 1989; **105**(2): 223–235.
- [5] BISSELL MJ. Modelling molecular mechanisms of breast cancer and invasion: lessons from the normal gland. *Biochem Soc Trans* 2007; **35**(Pt 1): 18–22.
- [6] BRUNTON VG, MACPHERSON IR, FRAME MC. Cell adhesion receptors, tyrosine kinases and actin modulators: a complex three-way circuitry. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1692**(2–3): 121–144.
- [7] DEBNATH J, MILLS KR, COLLINS NL, REGINATO MJ, MUTHUSWAMY SK, BRUGGE JS. The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini. *Cell* 2002; **111**(1): 29–40.
- [8] DEBNATH J, MUTHUSWAMY SK, BRUGGE JS. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods* 2003; **30**(3): 256–268.
- [9] DEBNATH J, BRUGGE JS. Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nat Rev Cancer* 2005; **5**(9): 675–688.
- [10] ELSDALE T, BARD J. Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol* 1972; **54**(3): 626–637.
- [11] EMERMAN JT, PITELKA DR. Maintenance and induction of morphological differentiation in dissociated mammary epithelium on floating collagen membranes. *In Vitro* 1977; **13**(5): 316–328.
- [12] ENGLERA, BACAKOVA L, NEWMAN C, HATEGANA, GRIFFIN M, DISCHER D. Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses. *Biophys J* 2004; **86**(1 Pt 1): 617–628.
- [13] EWAN KB, OKETCH-RABAH HA, RAVANI SA, SHYAMALA G, MOSES HL, BARCELLOS-HOFF MH. Proliferation of estrogen receptor-alpha-positive mammary epithelial cells is restrained by transforming growth factor-beta1 in adult mice. *Am J Pathol* 2005; **167**(2): 409–417.
- [14] FUNG C, LOCK R, GAO S, SALAS E, DEBNATH J. Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival. *Mol Biol Cell* 2008; **19**(3): 797–806.
- [15] FURUTA S, JIANG X, GU B, CHENG E, CHEN PL, LEE WH. Depletion of BRCA1 impairs differentiation but enhances proliferation of mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**(26): 9176–9181.
- [16] GAJEWSKA M, MOTYL T. IGF-binding proteins mediate TGF- $\beta$ 1-induced apoptosis in bovine mammary epithelial BME-UV1 cells. *Comp Biochem Physiol C* 2004; **139**: 65–75.
- [17] GAJEWSKA M, SOBOLEWSKA A, KOZLOWSKI M, MOTYL T. Role of autophagy in mammary gland development. *J Physiol Pharmacol* 2008; **59** Suppl 9: 237–249.
- [18] GILCREASE MZ. Integrin signaling in epithelial cells. *Cancer Lett* 2007; **247**(1): 1–25.
- [19] GUDJONSSON T, RØNNOV-JESSEN L, VILLADSEN R, RANK F, BISSELL MJ, PETERSEN OW. Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. *J Cell Sci* 2002; **115** (Pt 1): 39–50.
- [20] GUPTA PB, KUPERWASSER CH. Disease models of breast cancer. *Drug Discover Today: Disease Models* 2004; **1**: 9–16.
- [21] HASLAM SZ, WOODWARD TL. Host microenvironment in breast cancer development: epithelial-cell-stromal-cell interactions and steroid hormone action in normal and cancerous mammary gland. *Breast Cancer Res* 2003; **5**(4): 208–215.
- [22] JIN H, VARNER J. Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *Br J Cancer* 2004; **90**(3): 561–565.
- [23] JOHNSON KR, LEIGHT JL, WEAVER VM. Demystifying the effects of a three-dimensional microenvironment in tissue morphogenesis. *Methods Cell Biol* 2007; **83**: 547–583.
- [24] KATZ E, STREULI CH. The extracellular matrix as an adhesion checkpoint for mammary epithelial function. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; **39**(4): 715–726.
- [25] KIM H, LAING M, MULLER W. c-Src-null mice exhibit defects in normal mammary gland development and ER $\alpha$  signaling. *Oncogene* 2005; **24**(36): 5629–5636.
- [26] KLEINBERG DL, FELDMAN M, RUAN W. IGF-I: an essential factor in terminal end bud formation and ductal morphogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2000; **5**(1): 7–17.
- [27] KRAUSE S, MAFFINI MV, SOTO AM, SONNENSCHN C. A Novel 3D *In Vitro* Culture Model to Study Stromal-Epithelial Interactions in the Mammary Gland Tissue. *Eng Part C Methods* 2008; **14**(3): 261–271.



- [28] KOLEK, O., GAJKOWSKA, B., GODLEWSKI, M.M., MOTYL, T. Co-localization of apoptosis-regulating proteins in mouse mammary epithelial HC11 cells exposed to TGF-beta1. *Eur J Cell Biol* 2003; **82**(6): 303–312.
- [29] KOZŁOWSKI M, GAJEWSKA M, MAJEWSKA A, JANK M, MOTYL T. Differences in growth and transcriptomic profile of bovine mammary epithelial monolayer and three-dimensional cell cultures. *J Physiol Pharmacol* 2009; **60** Suppl 1: 5–14.
- [30] LE BEYEC J, XU R, LEE SY, NELSON CM, RIZKI A, ALCARAZ J, BISSELL MJ. Cell shape regulates global histone acetylation in human mammary epithelial cells. *Exp Cell Res* 2007; **313**(14): 3066–3075.
- [31] LEE GY, KENNY PA, LEE EH, BISSELL MJ. Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nature Methods* 2007; **4**: 359–365.
- [32] LI ML, AGGELER J, FARSON DA, HATIER C, HASSELL J, BISSELL MJ. Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**(1): 136–140.
- [33] MAILLEUX AA, OVERHOLTZER M, BRUGGE JS. Lumen formation during mammary epithelial morphogenesis: insights from *in vitro* and *in vivo* models. *Cell Cycle* 2008; **7**(1): 57–62.
- [34] McDANIEL SM, RUMER KK, BIROC SL, METZ RP, SINGH M, PORTER W, SCHEDIN P. Remodeling of the mammary microenvironment after lactation promotes breast tumor cell metastasis. *Am J Pathol* 2006; **168**(2): 608–620.
- [35] MEDINA D, LI ML, OBORN CJ, BISSELL MJ. Casein gene expression in mouse mammary epithelial cell lines: dependence upon extracellular matrix and cell type. *Exp Cell Res* 1987; **172**(1): 192–203.
- [36] MOSTOV KE. Epithelial polarity and morphogenesis. *Methods* 2003; **30**(3): 189–190.
- [37] MURTAGH J, MCARDLE E, GILLIGAN E, THORNTON L, FURLONG F, MARTIN F. Organization of mammary epithelial cells into 3D acinar structures requires glucocorticoid and JNK signaling. *J Cell Biol* 2004; **166**(1): 133–143.
- [38] NAYLOR MJ, STREULI CH. Integrin regulation of mammary gland development. W: E Danen [red.], In integrins and development. Georgetown TX: *Landes Bioscience* 2006: 176–185.
- [39] NAYLOR MJ, LI N, CHEUNG J, LOWE ET, LAMBERT E, MARLOW R, WANG P, SCHATZMANN F, WINTERMANTEL T, SCHÜETZ G, CLARKE AR, MUELLER U, HYNES NE, STREULI CH. Ablation of beta1 integrin in mammary epithelium reveals a key role for integrin in glandular morphogenesis and differentiation. *J Cell Biol* 2005; **171**(4): 717–728.
- [40] NELSON CM, BISSELL MJ. Modeling dynamic reciprocity: engineering three-dimensional culture models of breast architecture, function, and neoplastic transformation. *Semin Cancer Biol* 2005; **15**(5): 342–352.
- [41] NOVARO V, ROSKELLEY CD, BISSELL MJ. Collagen-IV and laminin-I regulate estrogen receptor alpha expression and function in mouse mammary epithelial cells. *J Cell Sci* 2003; **116**(Pt 14): 2975–2986.
- [42] PASZEK MJ, ZAHIR N, JOHNSON KR, LAKINS JN, ROZENBERG GI, GEFEN A, REINHART-KING CA, MARGULIES SS, DEMBO M, BOETTIGER D, HAMMER DA, WEAVER VM. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 2005; **8**(3): 241–254.
- [43] PULLAN S, WILSON J, METCALFE A, EDWARDS GM, GOBERDHAN N, TILLY J, HICKMAN JA, DIVE C, STREULI CH. Requirement of basement membrane for the suppression of programmed cell death in mammary epithelium. *J Cell Sci* 1996; **109**(Pt 3): 631–642.
- [44] REGINATO MJ, MILLS KR, BECKER EB, LYNCH DK, BONNIA, MUTHUSWAMY SK, BRUGGE JS. Bim regulation of lumen formation in cultured mammary epithelial acini is targeted by oncogenes. *Mol Cell Biol* 2005; **25**(11): 4591–4601.
- [45] ROSKELLEY CD, DESPREZ PY, BISSELL MJ. Extracellular matrix-dependent tissue-specific gene expression in mammary epithelial cells requires both physical and biochemical signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**(26): 12378–12382.
- [46] SAWICKI W. Gruczoł sutkowy. W: Sawicki W. [red.] *Histologia*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2000: 500–503.
- [47] SHACKLETON M, VAILLANT F, SIMPSON KJ, STINGL J, SMYTH GK, ASSELIN-LABAT ML, WU L, LINDEMAN GJ, VISVADER JE. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 2006; **439**: 84–88.
- [48] SHAW KR, WROBEL CN, BRUGGE JS. Use of three-dimensional basement membrane cultures to model oncogene-induced changes in mammary epithelial morphogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2004; **9**: 297–310.

- [49] SHEKHAR MP, WERDELL J, SANTNER SJ, PAULEY RJ, TAIT L. Breast stroma plays a dominant regulatory role in breast epithelial growth and differentiation: implications for tumor development and progression. *Cancer Res* 2001; **61**(4): 1320–1326.
- [50] SODUNKE TR, TURNER KK, CALDWELL SA, McBRIDE KW, REGINATO MJ, NOH HM. Micropatterns of Matrigel for three-dimensional epithelial cultures. *Biomaterials* 2007; **28**(27): 4006–4016.
- [51] STINGL J, EIREW P, RICKETSON I, SHACKLETON M, VAILLANT F, CHOI D, LI HI, EAVES CJ. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* 2006; **439**: 993–997.
- [52] STREULI CH, SCHMIDHAUSER C, BAILEY N, YURCHENCO P, SKUBITZ AP, ROSKELLEY C, BISSELL MJ. Laminin mediates tissue-specific gene expression in mammary epithelia. *J Cell Biol* 1995; **129**(3): 591–603.
- [53] STREULI C.H. Cell-matrix adhesion, cell-cell interactions, and malignancy. W: S. Pelengaris & M. Kahn [red.], *The molecular biology of cancer*. Blackwell Publishing, Malden, MA 2006: 357–388.
- [54] TADDEI I, DEUGNIER MA, FARALDO MM, PETIT V, BOUVARD D, MEDINA D, FÄSSLER R, THIERY JP, GLUKHOVA MA. Beta1 integrin deletion from the basal compartment of the mammary epithelium affects stem cells. *Nat Cell Biol* 2008; **10**(6): 716–722.
- [55] TADDEI I, FARALDO MM, TEULIÈRE J, DEUGNIER MA, THIERY JP, GLUKHOVA MA. Integrins in mammary gland development and differentiation of mammary epithelium. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2003; **8**(4): 383–394.
- [56] WANG F, WEAVER VM, PETERSEN OW, LARABELL CA, DEDHAR S, BRIAND P, LUPU R, BISSELL MJ. Reciprocal interactions between beta1-integrin and epidermal growth factor receptor in three-dimensional basement membrane breast cultures: a different perspective in epithelial biology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**(25): 14821–14826.
- [57] WANG X, ZHANG X, SUN L, SUBRAMANIAN B, MAFFINI MV, SOTO A, SONNENSCHNEIN C, KAPLAN DL. Preadipocytes stimulate ductal morphogenesis and functional differentiation of human mammary epithelial cells on 3D silk scaffolds. *Tissue Eng Part A* 2009; **15**(10): 3087–3098.
- [58] WEAVER VM, LELIÈVRE S, LAKINS JN, CHRENEK MA, JONES JC, GIANCOTTI F, WERB Z, BISSELL MJ. Beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer Cell* 2002; **2**(3): 205–216.
- [59] WOODWARD TL, XIE J, FENDRICK JL, HASLAM SZ. Proliferation of mouse mammary epithelial cells *in vitro*: interactions among epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, ovarian hormones, and extracellular matrix proteins. *Endocrinology* 2000; **141**(10): 3578–3586.
- [60] XIAN W., SCHWERTFEGER KL, VARGO-GOGOLA T, ROSEN JM. Pleiotropic effects of FGFR1 on cell proliferation, survival, and migration in a 3D mammary epithelial cell model. *J Cell Biol* 2005; **171**(4): 663–673.
- [61] XIANG B, MUTHUSWAMY SK. Using three-dimensional acinar structures for molecular and cell biological assays. *Methods Enzymol* 2006; **406**: 692–701.

*Dr Małgorzata Gajewska*

*Katedra Nauk Fizjologicznych Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW,*

*ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa*

*e-mail: malgorzata\_gajewska@sggw.pl*