

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie

Vliv fibroblastových růstových faktorů na vývoj mléčné žlázy ve 3D kulturách

Ema Grofová

Jihomoravský kraj

Brno 2020

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie

Vliv fibroblastových růstových faktorů na vývoj mléčné žlázy ve 3D kulturách

The effect of fibroblast growth factors on
development of mammary gland in 3D cultures

Autor: Ema Grofová
Škola: Gymnázium Matyáše Lercha, Žižkova 55
616 00 Brno
Kraj: Jihomoravský kraj
Vedoucí práce: Mgr. Zuzana Koledová, Ph.D.

Brno 2020

Prohlášení

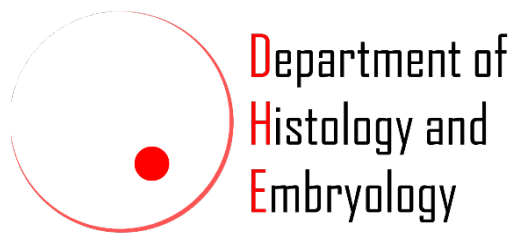
Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze podklady (literaturu, internetové zdroje) uvedené v seznamu.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brně dne 20. 2. 2020

Podpis:



ÚSTAV HISTOLOGIE A EMBRYOLOGIE

LÉKAŘSKÁ FAKULTA

MASARYKOVA UNIVERZITA

Poděkování

Děkuji především Mgr. Zuzaně Koledové, Ph.D., za vedení mé práce, odborný dohled a stejně tak za čas, který mi byla ochotna při tvorbě této práce věnovat.

Dále bych ráda poděkovala také Bc. Denise Belisové za trpělivý přístup při uvádění do práce v laboratoři a panu Jakubu Sumbalovi za pomoc s vyhodnocováním dat.

Tato práce byla vypracována za finanční podpory JMK.

Anotace

Mléčná žláza je orgán, jehož vývoj probíhá prenatálně i postnatálně. Je tvořený epitelem a stromatem a interakce mezi nimi hrají důležitou roli především v postnatálním vývoji mléčné žlázy. Faktory ovlivňující růst a vývoj mléčné žlázy po narození zahrnují také rodinu fibroblastových růstových faktorů. Fibroblastový růstový faktor 2 je znám svou funkcí v procesu větvení morfogeneze, kde indukuje větvení epitelu v období puberty, role ostatních růstových faktorů ve vývoji mléčné žlázy však zatím nebyla objasněna. Tato práce se zaměřuje na studium vlivů fibroblastových růstových faktorů na epitel mléčné žlázy s využitím 3D buněčných kultur.

Klíčová slova

mléčná žláza; FGF signalizace; větvení morfogeneze; organoidy, 3D buněčné kultury

Annotation

The mammary gland is an organ, the development of which occurs both prenatally and postnatally. It is composed of epithelium and stroma and the interactions between them play an important role particularly in the postnatal stage of mammary gland development. The factors influencing the growth and development of the mammary gland include the fibroblast growth factor family. The fibroblast growth factor 2 is known for its function in the process of branching morphogenesis by inducing branching of the epithelium in the puberty, however, the role of the other growth factors in the mammary gland development has not yet been clarified. This work is focused on the study of the effects of the fibroblast growth factors on the mammary gland epithelium using 3D cell cultures.

Key words

mammary gland; FGF signaling; branching morphogenesis; organoids, 3D cell cultures

Obsah

Úvod	7
1. Teoretický úvod	8
1.1. Mléčná žláza a její struktura	8
1.2. Prenatální vývoj mléčné žlázy	9
1.3. Postnatální vývoj mléčné žlázy.....	10
1.3.1. Puberta a dospělost	11
1.3.2. Gravidita, laktace a involuce	12
1.4. Růstové faktory mléčné žlázy	13
1.4.1. Fibroblastové růstové faktory	13
1.4.2. Struktura FGFR	14
1.4.3. Signalizace FGF	15
1.4.4. Role signalizace FGF ve vývoji mléčné žlázy.....	17
1.5. 3D kultury	18
2. Metody.....	20
2.1. Odběr mléčných žláz	20
2.2. Izolace primárních organoidů mléčné žlázy	20
2.3. Vytvoření 3D kultur	20
2.4. Mikroskopické focení	21
2.5. Fixace organoidů.....	21
2.6. Obrazová analýza organoidů	21
3. Výsledky	23
3.1. Vliv FGF2 na fenotyp organoidů.....	25
3.2. Vliv FGF1 na fenotyp organoidů.....	27
3.2.1. Kombinace FGF1 a FGF2	27
3.3. Vliv FGF7 na fenotyp organoidů.....	30
3.3.1. Kombinace FGF7 a FGF2	30
3.4. Vliv FGF10 na fenotyp organoidů.....	32
3.4.1. Kombinace FGF10 a FGF2	33
3.5. Vliv HGF na fenotyp organoidů	35

3.5.1. Kombinace HGF a FGF2.....	36
3.6. Vliv FGF9 na fenotyp organoidů.....	39
3.6.1. Kombinace FGF9 a FGF2	39
3.6.2. Kombinace FGF9 a HGF.....	43
4. Diskuze	46
Závěr.....	49
Seznam pramenů.....	50

Úvod

Mléčná žláza je unikátní orgán savců, tvořený epitelovými kanálky vnořenými do tukového polštáře. Její vývoj je započat již před narozením, ale velká část probíhá až po narození jedince. Zejména v období puberty dochází v mléčné žlázy působením hormonů k masivním změnám v architektuře mléčné žlázy. Epitelové kanálky prorůstají stromatem a přitom se větví v procesu zvaném větvící morfogeneze.

Větvící morfogeneze je regulována hormony, ale také lokální interakcí mezi stromatem a epitelem skrze několik druhů růstových faktorů. Mezi tyto faktory patří i fibroblastové růstové faktory (FGF), které jsou produkovány především buňkami stromatu, mimo jiné fibroblasty. Konkrétně fibroblastový růstový faktor 2 (FGF2) byl rozpoznán jako faktor podporující proliferaci a přežití buněk a zároveň pozitivně ovlivňující větvení epitelu, u mnoha dalších růstových faktorů však zatím nebyla jejich funkce v morfogenezi mléčné žlázy jednoznačně identifikována. Pochopení signalizace těchto faktorů a jejich vlivu na epitel mléčné žlázy je nicméně nesmírně žádoucí, neboť deregulace těchto signalizací může v některých případech vést k rozvoji rakoviny prsu.

Pro studium vlivu růstových faktorů na morfogenezi mléčné žlázy je ideální využít organoidy a techniku 3D buněčných kultur. Uspořádání buněk v organoidu totiž odpovídá architektuře mléčné žlázy, tato technika tak blízce napodobuje opravdovou tkáň a účinně simuluje situaci v živém organismu.

Během práce byly použity FGF1, FGF2, FGF7, FGF9, FGF10 a hepatocytový růstový faktor (HGF) a během devítidenní kultivace byl hodnocen jejich vliv na celkový fenotyp organoidu, konkrétně pak na proliferaci buněk a možnou indukci, případně inhibici větvení. V práci bylo využito také několika kombinací faktorů, jelikož bylo nutné vzít v úvahu i možnou interakci mezi jednotlivými faktory, ke které by mohlo ve tkáni mléčné žlázy docházet.

1. TEORETICKÝ ÚVOD

1.1. Mléčná žláza a její struktura

Mléčná žláza je komplexní sekreční orgán odlišující savce od ostatních živočichů. Její vývoj probíhá prenatalně, ale podstatná část vývoje pokračuje i postnatálně. Mléčná žláza je tvořena dvěma typy tkáně, epitelem a stromatem, jejichž interakce regulují vývoj i následnou funkci mléčné žlázy, výživu mláďat (Macias a Hinck, 2012).

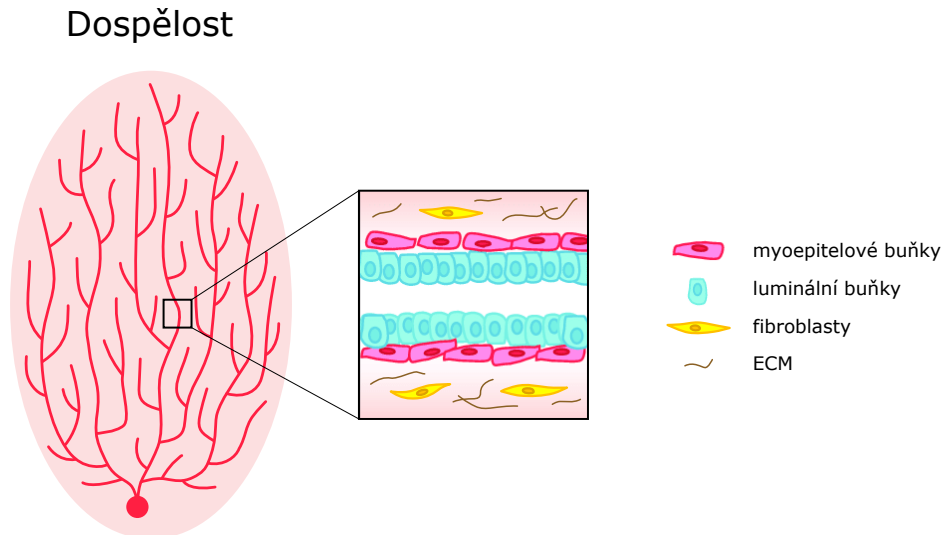
Epitelové buňky mléčné žlázy tvoří kanálky, které se větví a prorůstají stromatem tukového polštáře a na druhé straně ústí na povrch těla bradavkou. V období laktace tvoří také alveoly produkující mléko (Henninghausen a Robinson, 2005). Kanálky, které se vyskytují v dospělosti v mléčné žláze, sestávají ze dvou vrstev epiteliálních buněk a lumen uprostřed. Apikálně orientované lumenální buňky obklopují lumen, zatímco bazálně orientované myoepitelové buňky jsou v kontaktu s bazální laminou. Mezi bazálními epitelovými buňkami se vyskytují v malé míře i buňky kmenové, které mají značnou regenerační schopnost (Inman et al., 2015).

Stroma obklopující epitelové kanálky je tvořeno pojivovou tkání a několika typy podpůrných buněk, jakými jsou adipocyty, fibroblasty, cévní buňky a buňky imunitního systému. Důležitou součástí stromatu je extracelulární matrix (ECM), která je schopna remodelace v závislosti na enzymech sekretovaných buňkami epitelu i stromatu (Howard a Lu, 2014). Mezi důležité složky ECM patří fibronektin, proteoglykany a kolageny, které jsou syntetizovány stromálními fibroblasty (Inman et al., 2015).

Pro studium mléčné žlázy se hojně využívá myšího modelu, neboť jsou mléčné žlázy myši a člověka velmi podobné ve své stavbě i funkci (Cardiff a Wellings, 1999). Nejpodstatnější rozdíly mezi těmito druhy tkví v počtu párů mléčných žláz, které se u myši či člověka vyvinou. U myši se vyskytuje pět párů mléčných žláz. Nacházejí se těsně pod kůží a jsou umístěny podél tzv. mléčné linie, 3 páry se vyskytují v oblasti hrudníku a 2 páry v oblasti třísel (Richert et al., 2000). Naproti tomu člověk disponuje pouze jedním párem mléčných žláz. Další rozdíly spočívají ve stanovení sexuálního dimorfismu. Zatímco u myši dochází

k odlišení vývoje mléčné žlázy jednotlivých pohlaví in utero, u člověka k tomu dochází až v období puberty (Hovey, Trott and Vonderhaar, 2002; Macias a Hinck; 2012).

Při zpracovávání této Středoškolské odborné činnosti byl rovněž použit myší model, proto budou následující kapitoly zaměřeny především na vývoj a stavbu mléčné žlázy myši.



Obr. 1: Struktura mléčné žlázy v dospělosti (převzato z Inman *et al.*, 2015, upraveno). Epitel mléčné žlázy je v období dospělosti tvořen dvouvrstvými kanálky s myoepitelovými a luminálními buňkami a lumen uprostřed. Ve stromatu se nachází fibroblasty a extracelulární matrix.

1.2. Prenatální vývoj mléčné žlázy

Prenatální vývoj mléčné žlázy je z velké části nezávislý na hormonech. Hlavním regulačním mechanismem jsou interakce mezi epitelem a mezenchymem (Macias a Hinck, 2012).

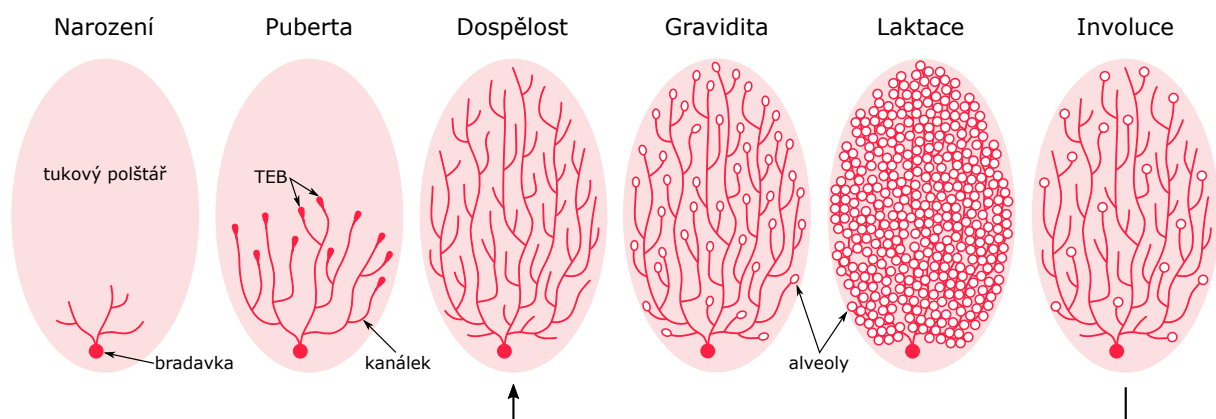
Vývoj mléčné žlázy začíná 10. dnem embryonálního vývoje. Buňky epitelu vytvoří na ventrální části embrya mléčnou lištu táhnoucí se od předního končetinového pupene k zadnímu (Macias a Hinck, 2012). 11. dne dochází k tvorbě 5 pupenů na daných místech podél mléčné lišty. Tyto pupeny však nevznikají současně, nejprve se vytvoří pár 3., následuje 4. pár, poté 1. a 5. pár a nakonec pár 2. Mezi 11. a 12. dnem se buňky pupenů zanoří do mezenchymu pod nimi, dochází rovněž ke kondenzaci a diferenciaci mezenchymu (Hens a Wysolmerski, 2005). U samců se v této fázi aktivuje androgenový receptor a díky působení androgenu produkovaného varlaty se zastavuje diferenciaci mléčné žlázy (Velmaat *et al.*, 2003; Hens a Wysolmerski, 2005). U samic následuje další vývoj až kolem 16. dne. Buňky

epitelu začínají proliferovat, pupen se prodlužuje a prorůstá do tukového polštáře (Richert *et al.*, 2000). Jakmile ho dosáhne, začne se větvit (Macias a Hinck, 2012). Po narození se mléčná žláza skládá z krátkého primárního kanálku a 15-20 sekundárních kanálků tvořících malý epitelový stromeček (Hens a Wysolmerski, 2005; Cowin a Wysolmerski, 2010).

U člověka začíná vývoj mléčné žlázy v 5. týdnu embryonálního vývoje, kdy se formuje mléčná lišta (Gusterson a Stein, 2012). Narozdíl od myši však u člověka vzniká pouze 1 pár pupenů. Mléčná žláza se vyvíjí shodně u obou pohlaví až do období puberty, kdy odlišné hormony regulují její další vývoj odlišným způsobem (Macias a Hinck, 2012).

1.3. Postnatální vývoj mléčné žlázy

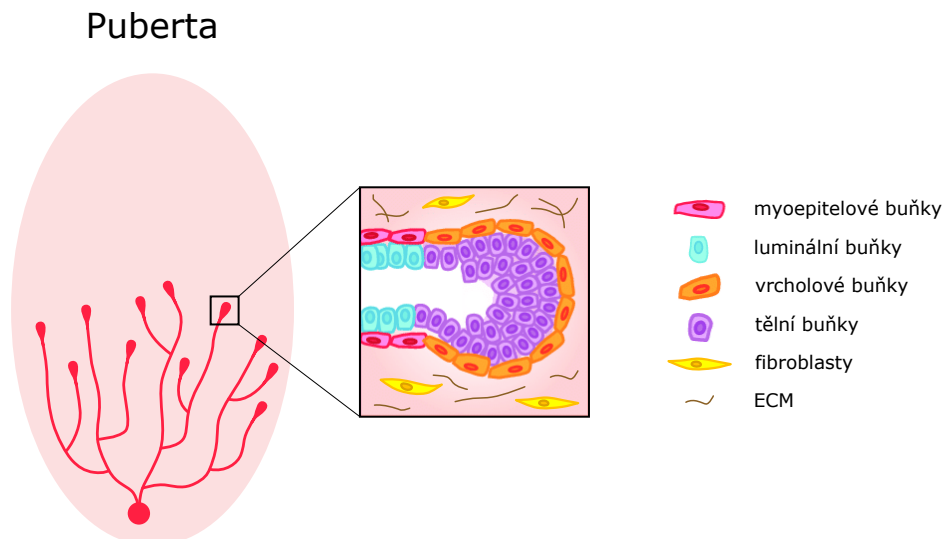
Po narození zůstává mléčná žláza v klidovém stádiu, přičemž roste izometricky (v poměru ke zbytku těla), až do nástupu puberty (Hovey, Trott a Vonderhaar, 2002). V průběhu puberty dochází v důsledku působení endokrinní i parakrinní signalizace k procesu větvicí morfogeneze, kdy se kanálky prodlužují a větví. Následuje období dospělosti, kdy je celý tukový polštář vyplněn epitelovým stromečkem. S nástupem gravidity (březosti) se díky působení hormonů formují alveolární pupeny. Ty diferencují v alveoly, které v období laktace produkují mléko. Po odstavení mláďat nastává poslední fáze, involuce, kdy se tkáň remodeluje a vrací se zpět do stavu v období před březostí. K tomuto cyklu může docházet v průběhu života samice opakovaně (Macias a Hinck, 2012; Hovey, Trott a Vonderhaar, 2002).



Obr. 2: Schématické znázornění postnatálního vývoje mléčné žlázy. Po narození je mléčná žláza v klidovém stádiu, v pubertě dochází k větvicí morfogenezi. V dospělosti kanálky již vyplnily celý tukový polštář a větvicí morfogeneze dále nepokračuje. V těhotenství se začínají formovat alveoly, v nichž poté v období laktace vzniká mléko pro výživu potomstva. Involuce po odstavení mláďat vrací mléčnou žlázu do stavu před těhotenstvím.

1.3.1. Puberta a dospělost

Kolem 26. dne života myši se na koncích kanálku vytvoří terminální koncové pupeny (TEB) (Inman *et al.*, 2015; Hovey, Trott a Vonderhaar, 2002). TEB mají vysokou proliferační schopnost a umožňují tak prodlužování kanálků, jejich větvení a prorůstání tukovým polštářem v procesu větvicí morfogeneze (Macias a Hinck, 2012). TEB se skládají z jedné vrstvy vrcholových buněk, pod kterými se nachází několik vrstev buněk tělních (Inman *et al.*, 2015). Při prorůstání kanálků tukovým polštářem dochází k diferenciaci vrcholových buněk na povrchu TEB v buňky myoepitelové. V tělních buňkách ve středu TEB probíhá apoptóza, čímž se vytvoří lumen kanálku, zatímco zbývající tělní buňky diferencují v buňky luminální (Hovey, Trott a Vonderhaar, 2002; Inman *et al.*, 2015).



Obr. 3: Struktura mléčné žlázy v období puberty (převzato z Inman *et al.*, 2015, upraveno). V pubertě nastává rozvoj větvicí morfogeneze, která je řízena terminálními koncovými pupeny. Na obrázku je znázorněna struktura TEB, vnější vrstvu tvoří vrcholové buňky, zatímco několik vnitřních vrstev je tvořeno buňkami tělními.

Vývoj mléčné žlázy v období puberty je řízen především prostřednictvím hormonů z hypofýzy a vaječnicků. Růstový hormon (GH) indukuje tvorbu inzulinu podobného růstového faktoru 1 (IGF-1) v játrech i ve stromálních buňkách mléčné žlázy. IGF-1 spolu s estrogenem z vaječnicků pozitivně ovlivňuje přežití a proliferaci buněk epitelu. Epidermální růstové faktory (EGF) a fibroblastové růstové faktory (FGF) hrají roli v parakrinní signalizaci v průběhu větvicí morfogeneze (Macias a Hinck, 2012).

Kolem 10. týdne věku myši dosáhne epitelový stromeček hranice tukového polštáře, větvící morfogeneze se zastavuje a dochází k regresi TEB (Richert *et al.*, 2000). V této fázi je zaplněno okolo 60% tukového polštáře (Macias a Hinck, 2012).

U člověka také dochází k větvící morfogenezi, která je řízena strukturami podobnými TEB. Konce bočních větví jsou však nadále rozdělené do několika menších kanálků zvaných acini, jejichž soubor se nazývá lobulární jednotka konců kanálků (TDLU). TDLU je hlavní funkční jednotkou lidské mléčné žlázy a je nejvíce citlivá na působení hormonů (Javed a Lteif, 2013; Cardiff a Wellings, 1999).

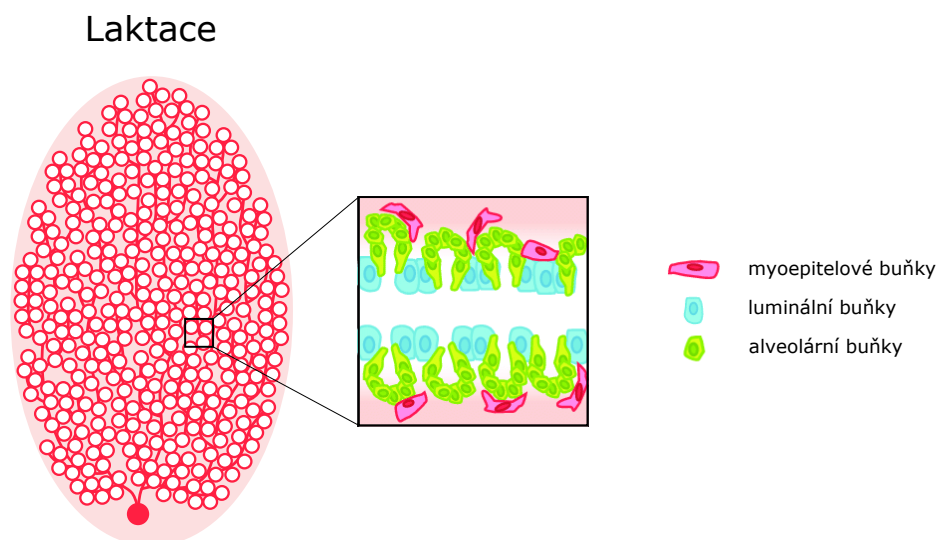
1.3.2. Gravidita, laktace a involuce

V období gravidity tvoří mléčná žláza další sekundární i terciální větve a alveolární pupeny formující lobuloalveolární jednotky, které následně diferencují v alveoly, jež zaplní celý tukový polštář (Macias a Hinck, 2012; Anderson *et al.*, 2007). Adipocyty se zmenšují, aby ustoupily buňkám epitelu (Howard a Lu, 2014). V průběhu březosti také dochází ke zvýšenému prokrvení míst kolem alveol (Macias a Hinck, 2012).

Přestavba mléčné žlázy v období gravidity je regulována hormony hypofýzy a vaječnicků. Progesteron z vaječnicků řídí sekundární a terciální větvení, zatímco prolaktin produkovaný hypofýzou stimuluje vaječnický k další produkci progesteronů a spolu s progesteronem zajišťuje diferenciaci alveolárních pupenů v alveoly (Macias a Hinck, 2012).

Po porodu začne mléčná žláza produkovat mléko, které slouží k výživě potomstva a jehož tvorba je řízena především prolaktinem. V buňkách alveol dochází k nárůstu endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu, což podporuje funkci syntézy a sekrece mléka těmito buňkami (Anderson *et al.*, 2007). Myoepitelové buňky kanálků mají díky expresi aktinu hladkého svalstva kontraktilní funkci a dokáží tak zajistit dopravu mléka z alveol až k mláděti (Inman *et al.*, 2015; Macias a Hinck, 2012).

Jakmile jsou mláďata odstavena, dochází k involuci, projevující se masivní apoptózou v buňkách alveol a celkovou remodelací ECM. Involuce probíhá různě rychle v různých částech tkáně a jejím výsledkem je dosažení stavu mléčné žlázy v období před graviditou (Cardiff a Wellings, 1999; Inman *et al.*, 2015).



Obr. 4: Struktura mléčné žlázy v období laktace (převzato z Inman *et al.*, 2015, upraveno). V období laktace jsou v kanálcích mléčné žlázy vytvořeny alveoly produkující mléko k výživě mláďat.

1.4. Růstové faktory mléčné žlázy

V průběhu vývoje mléčné žlázy hraje důležitou roli komunikace mezi buňkami epitelu a stromatu. Tato parakrinní signalizace (signalizace na kratší vzdálenosti, mezi buňkami blízko u sebe) je zajišťována širokým spektrem růstových faktorů mléčné žlázy, mezi které patří např. epidermální růstový faktor (EGF), hepatocytový růstový faktor (HGF), fibroblastové růstové faktory (FGF) a insulínu podobný růstový faktor 1 (IGF-1) (Hynes a Watson, 2010).

1.4.1. Fibroblastové růstové faktory

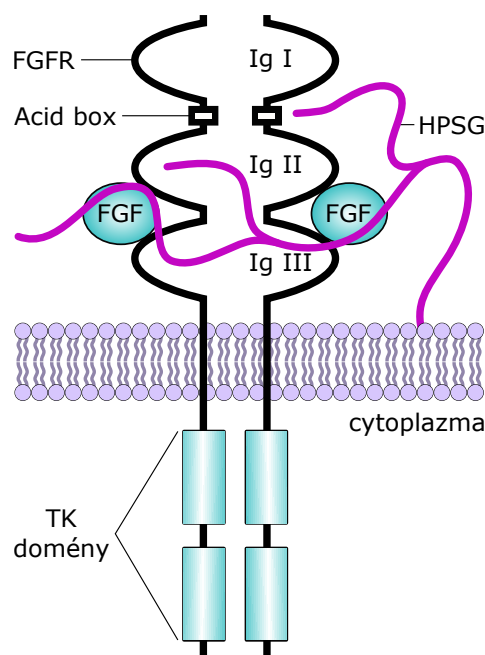
FGF jsou peptidové růstové faktory produkované stromálními fibroblasty. Působí v parakrinní signalizaci v průběhu vývoje mléčné žlázy především v období puberty a prostřednictvím svých receptorů (FGFR) dokáží ovlivňovat proliferaci, diferenciaci, migraci a přežití buněk. V dospělosti se podílejí na udržování homeostázy, angiogenezi a hojení ran. Signalizace FGF je tedy nezbytná pro normální vývoj mléčné žlázy a její deregulace může vést k závažným onemocněním a vzniku nádorů (Turner a Grose, 2010; Ornitz a Itoh, 2015).

Rodina FGF zahrnuje 23 členů. U lidí se však nevyskytuje FGF15, jeho obdobou je FGF19, který se naopak nevyskytuje u myši. (Turner a Grose, 2010). Tato rodina se dále rozděluje do 7 podtříd podle struktury proteinu i jeho biochemických vlastností. Jednu podtříd tvoří

intracelulární FGF (FGF11, FGF12, FGF13, FGF14), které se nevážou na FGFR a namísto toho slouží jako koreceptory pro napětově řízené sodíkové kanály (Ornitz a Itoh, 2015; Beenken a Mohammadi, 2009). FGF ostatních podtříd slouží jako ligandy, které se vážou na specifické tyrozinkinázové receptory pro FGF (FGFR1–4) (Turner a Grose, 2010). Z nich jedna podtřída zahrnuje endokrinní FGF (FGF15/19, FGF21, FGF23), které se vážou k FGFR pomocí proteinů Klotho jako kofaktorů, zatímco ostatní podtřídy FGF hrají roli v parakrinní a autokrinní signalizaci a jako kofaktor jim slouží heparin nebo heparansulfát (Ornitz a Itoh, 2015).

1.4.2. Struktura FGFR

FGFR jsou transmembránové tyrozinkinázové receptory. Každý z nich je složen z extracelulární imunoglobulinové domény, transmembránové domény a intracelulární tyrozinkinázové (TK) domény (Obr 5). Extracelulární doména je složena ze tří imunoglobulinu podobných domén (Ig I, Ig II, Ig III), přičemž Ig II a Ig III slouží k navázání FGF ligandu a kofaktoru ve formě heparansulfátového proteoglykanu (HPSG). Mezi Ig I a Ig II se nachází tzv. acid box, segment z kyselin glutamových a asparagových, který se spolu s doménou Ig I podílí na autoinhibici receptoru (Belov a Mohammadi, 2013; Turner a Grose, 2010).



Obr. 5: Struktura FGF receptoru (převzato z Turner a Grose, 2010, upraveno). Každý receptor se skládá ze dvou podjednotek s extracelulární, transmembránovou a intracelulární doménou. HPSG usnadňuje navázání ligandu FGF na receptor, což způsobí transfosforylaci intracelulárních TK domén a přenos signálu do buňky.

Existují čtyři geny pro FGFR (*Fgfr1*, *Fgfr2*, *Fgfr3*, *Fgfr4*), tři z nich však podléhají alternativnímu sestřihu v oblasti domény Ig III, vzniká doména IIIb nebo IIIc. Tak lze dosáhnout izoform b a c u FGFR1-3 (Beenken a Mohammadi, 2009; Zhang *et al.*, 2006). FGFR4 alternativnímu sestřihu nepodléhá a tudíž se objevuje pouze v jedné izoformě. Tento mechanismus umožňuje expresi celkem 7 forem FGFR, což přispívá ke specifické vazbě ligandu na receptor (Turner a Grose, 2010). Přehled ligandů FGF a jejich receptorů je v tabulce 1.

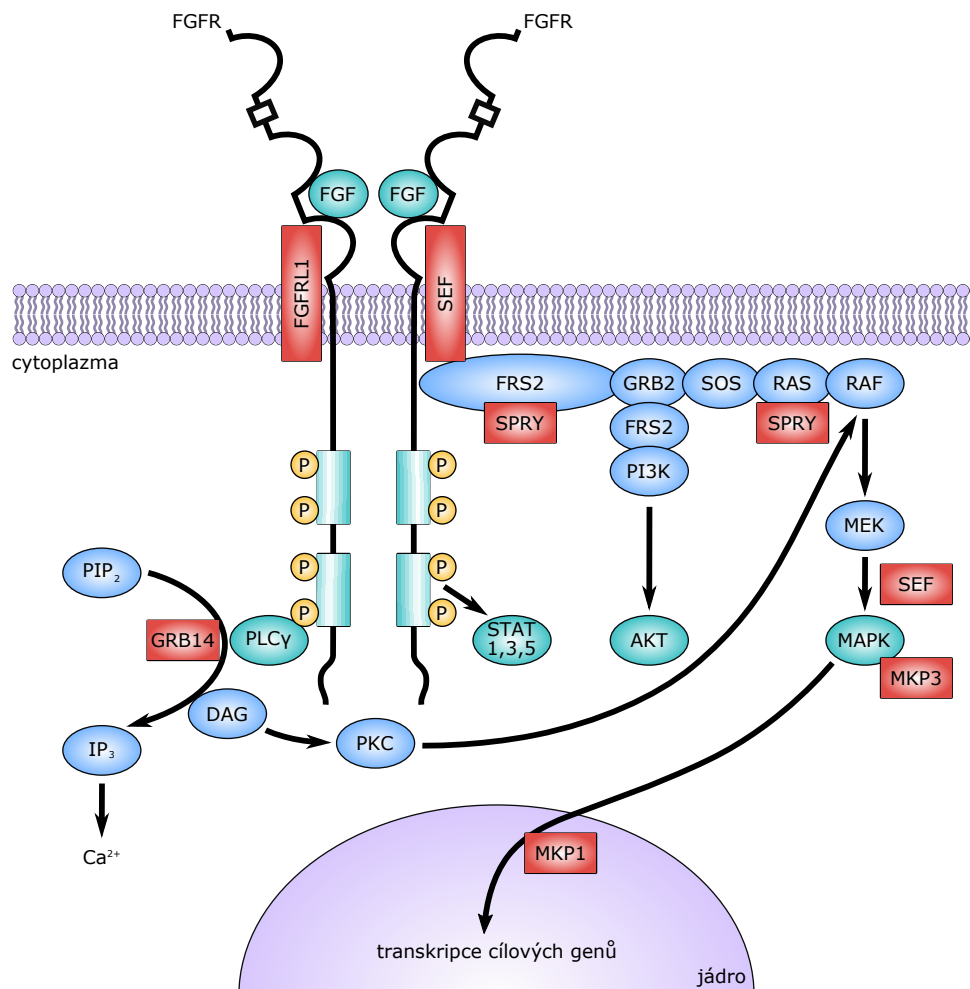
podtřída FGF	FGF	kofaktor	receptory
podtřída FGF1	FGF1 FGF2	heparin nebo heparansulfát	všechny FGFR FGFR 1c, 3c > 2c, 1b, 4
podtřída FGF4	FGF4 FGF5 FGF6		FGFR1c, 2c > 3c, 4
podtřída FGF7	FGF3 FGF7 FGF10 FGF22		FGFR 2b > 1b
podtřída FGF8	FGF8 FGF17 FGF18		FGFR 3c > 4 > 2c > 1c >> 3b
podtřída FGF9	FGF9 FGF16 FGF20		FGFR 3c > 2c > 1c, 3b >> 4
podtřída FGF15/19	FGF15/19 FGF21 FGF23	βKlotho αKlotho	FGFR 1c, 2c, 3c, 4 FGFR 1c, 3c FGFR 1c, 3c, 4

Tab. 1: Specifita FGFR (převzato z Ornitz a Itoh, 2015, upraveno). V tabulce je uvedeno, jaké kofaktory používají jednotlivé FGF ligandy při své signalizaci a skrz které receptory se tato signalizace uskutečňuje.

1.4.3. Signalizace FGF

Po vazbě ligandu FGF na Ig III doménu FGFR za přítomnosti HPSG, který se váže FGF i FGFR, zabraňuje degradaci ligandů a stabilizuje tak interakci FGF s FGFR, dochází k dimerizaci receptoru a transfosforylaci TK domén (Touat *et al.*, 2015; Beenken a Mohammadi, 2009). To má za následek aktivaci čtyř hlavních signálních drah RAS-MAPK, PI3K-AKT, PLC γ a STAT. Tyto dráhy přenáší signál do jádra, kde nastává transkripce cílových genů (Ornitz a Itoh, 2015; Turner a Grose, 2010). Schéma signalizace je znázorněno na obrázku 6.

K aktivaci RAS-MAPK a PI3K-AKT signální dráhy dochází skrze fosforylaci adaptorového proteinu FRS2 (FGFR substrate 2). FRS2 váže další adaptorový protein GRB2 (growth factor receptor-bound 2), který přenáší signál dál na protein SOS (son of sevenless) v RAS-MAPK nebo na GAB1 v PI3K-AKT (Ornitz a Itoh, 2015; Turner a Grose, 2010). RAS-MAPK pokračuje aktivací RAS GTPázy, která spouští MAP kinázovou kaskádu zahrnující kinázy RAF, MEK a ERK. Výsledkem je aktivace transkripčních faktorů rodiny ETS, které interagují s DNA a regulují transkripci cílových genů (Ornitz a Itoh, 2015; Tsang a Dawid, 2004). V signální dráze PI3K-AKT aktivuje GAB1 enzym PI3K, který následně fosforyluje enzym AKT. AKT poté v jádře inhibuje transkripční faktory vyvolávající apoptózu (např. FOXO1 – forkhead box protein O1) a tím pozitivně ovlivňuje přežití buněk (Ornitz a Itoh, 2015; Turner a Grose, 2010).



Obr. 6: Schématické znázornění FGF signalizace (převzato z Turner a Grose, 2010, upraveno). FGFR receptor spouští po navázání FGF ligandu čtyři hlavní signální dráhy. Jedná se o RAS-MAPK, PI3K-AKT, PLC γ a STAT. Cílem signalizace je transkripce cílových genů v jádře. Negativní regulátory těchto drah (např. proteiny SEF a SPRY) jsou na obrázku vyznačeny červeně.

Signální dráha PLC γ se aktivuje fosforylací fosfolipázy C γ (PLC γ) (Beenken a Mohammadi, 2009). PLC γ hydrolyzuje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂) za vzniku inositoltrisfosfátu (IP₃) a diacylglycerolu (DAG). IP₃ vyvolá uvolnění Ca²⁺ iontů z endoplazmatického retikula, zatímco DAG aktivuje proteinkinázu C (PKC). PKC fosforyluje kinázu RAF a tím podporuje aktivaci MAP kinázové kaskády v signální dráze RAS-MAPK (Ornitz a Itoh, 2015; Turner a Grose, 2010).

Další signální dráhou aktivovanou FGFR je signální dráha STAT. FGFR přímo aktivuje proteiny STAT1, STAT3 a STAT5, které se přesunou do jádra, kde regulují transkripci cílových genů (Ornitz a Itoh, 2015).

Negativní regulaci signalizace FGF zajišťuje například protein FGFR1, který interaguje přímo s FGFR. Protein SEF může také inhibovat přímo FGFR nebo v cytoplazmě zabraňovat fosforylací ERK v signální dráze RAS-MAPK (Turner a Grose, 2010). Signální dráha RAS-MAPK je dále na několika místech negativně regulována proteiny Sprouty (SPRY) (Casci *et al.*, 1999). MAPK fosfatázy (MKP1 a MKP3) defosforylací aktivovaných ERK rovněž negativně regulují tuto dráhu. MKP3 se nachází v cytoplazmě, zatímco MKP1 deaktivuje ERK v jádře (Tsang a Dawid, 2004). Signální dráha PLC γ je negativně regulována především skrze GRB14 (growth factor receptor-bound protein 14), který inhibuje aktivaci fosfolipázy C γ (Ornitz a Itoh, 2015).

1.4.4. Role signalizace FGF ve vývoji mléčné žlázy

Embryonální vývoj mléčné žlázy myši začíná založením mléčné lišty a vytvořením pupenů. V embryonálním vývoji má FGF10 a jeho receptor FGFR2-IIIb důležitou funkci při normálním vývoji mléčné žlázy, neboť při absenci alespoň jednoho z nich nedochází k tvorbě čtyř z pěti párů pupenů (Mailleux *et al.*, 2002; Hynes a Watson, 2010).

V postnatálním období jsou v buňkách epitelu mléčné žlázy exprimovány dva ze čtyř receptorů pro FGF, a to FGFR1 a FGFR2. FGFR2 je v TEB exprimován ve velké míře (Lu *et al.*, 2008). Při inaktivaci *Fgfr2* došlo k opožděnému nástupu větvení morfogeneze a míst větvení bylo méně, což indikuje, že FGFR2 hraje roli ve větvení morfogenezi v průběhu puberty (Hynes a Watson, 2010; Lu *et al.*, 2008).

Z fibroblastových růstových faktorů jsou v období postnatálního vývoje exprimované např. FGF1, FGF2, FGF7, FGF9 a FGF10 (Zhang *et al.*, 2014). Pomocí 3D kultivace epitelových organoidů mléčné žlázy bylo zjištěno, že FGF2 indukuje tvorbu a prodlužování epitelových větví a naopak FGF10 tuto reakci nevyvolává (Ewald *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2014). FGF9 při kontaktu s organoidy také větvení nestimuluje, při kultivaci organoidů mléčné žlázy v kokulturách s fibroblasty však bylo zjištěno, že FGF9 signalizuje skrze fibroblasty a jejich prostřednictvím podněcuje tvorbu větví u organoidů (Sumbal a Koledova, 2019). Vliv ostatních FGF na vývoj mléčné žlázy dosud nebyl dostatečně objasněn.

1.5. 3D kultury

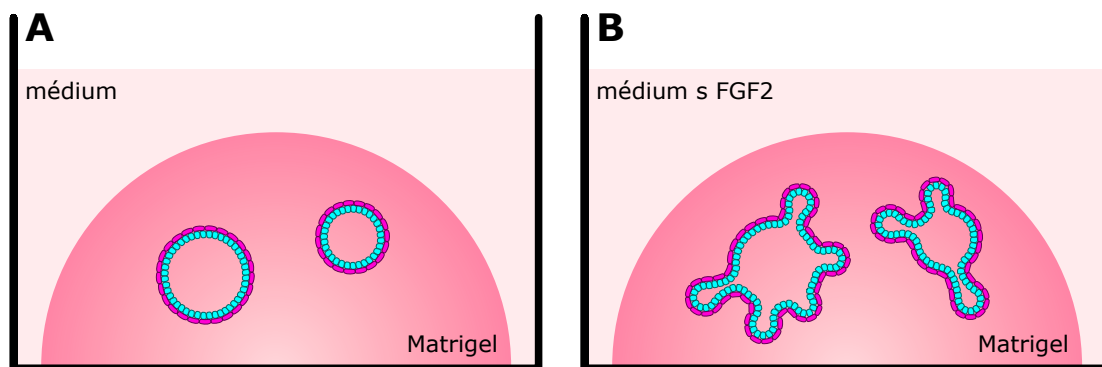
Vzhledem ke složitosti a komplexitě procesů nastávajících v mléčné žláze během jejího vývoje je pro studium a správné pochopení těchto mechanismů nezbytné vytvořit *in vitro* model, který co nejpřesněji odpovídá procesům probíhajícím v živém organismu (Krause *et al.*, 2008).

Standardní 2D modely, kde jsou buňky epitelu kultivovány v jedné vrstvě na plastovém podkladě nevyhovují těmto požadavkům, neboť nevytvářejí podmínky pozorované *in vivo*. (Mazzoleni *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2007). V živém organismu je epitel mléčné žlázy obklopen stromou, jejíž důležitou složkou je extracelulární matrix. Epitelovo-stromální interakce jsou nezbytné pro správný vývoj mléčné žlázy a biomechanické vlastnosti ECM (např. tuhost nebo uspořádání kolagenních vláken) mohou významně ovlivňovat mimo jiné architekturu epitelu, tvar a diferenciaci buněk (Koledova a Lu, 2017; Nguyen-Ngoc *et al.*, 2015; Barnes *et al.*, 2014). 2D kultury postrádají toto mikroprostředí a neodráží tak ani strukturu ani funkci, kterou mléčná žláza plní v živém organismu (Krause *et al.*, 2008).

3D buněčné kultury byly vyvinuty jako přechod mezi 2D kultivací buněk a *in vivo* modely (Campbell a Watson, 2014). Umožňují studovat detailní interakce mezi buňkami a zároveň velmi věrně napodobují podmínky v živém organismu (Krause *et al.*, 2008). Jako složka nahrazující ECM se používá obvykle kolagen typu I nebo Matrigel (komerční směs proteinů tvořících bazální membránu, zejména kolagen typu IV, laminin, nidogen a HPSG) (Koledova a Lu, 2017; Campbell a Watson, 2014). Biochemické vlastnosti bazální membrány jsou zodpovědné za vznik polaritu epitelu (Campbell a Watson, 2014). Díky nim fragmenty epitelu

izolované z mléčné žlázy po nasazení do Matrigelu dokáží vytvořit organoidy, organizované dvojvrstvé struktury s lumen uprostřed, představující reálnou strukturu mléčné žlázy (Nguyen-Ngoc *et al.*, 2015). Organoidy jsou schopné reagovat na signály ze stromatu a plnit funkce tkáně, proto jsou ideální jako model pro studium morfogeneze mléčné žlázy (Campbell a Watson, 2014).

Přidáváním růstových faktorů do média, ve kterém jsou organoidy kultivovány, lze podrobně studovat vlivy těchto faktorů na fenotyp organoidů a tedy i morfogenezi mléčné žlázy. Na obrázku 7 je znázorněna odpověď epitelu na přítomnost FGF2 v médiu.



Obr. 7: Reakce organoidů na přítomnost FGF2 v médiu. A - Organoidy kultivované v bazálním organoidovém médiu bez přidávaných faktorů. B - Organoidy napodobující proces větvicí morfogeneze jako odpověď na stimulaci FGF2.

2. METODY

2.1. Odběr mléčných žláz

K experimentům byly využity 6 – 8 týdnů staré (pubertální) laboratorní myši kmene ICR, které byly chovány a usmrceny cervikální dislokací v souladu s vyhláškou č. 419/2012 Sb., o ochraně pokusných zvířat. Myši byly podrobeny pitvě a v rámci ní jim byl odebrán 3., 4. a 5. pár mléčné žlázy, které byly vloženy do Petriho misky se sterilním PBS.

2.2. Izolace primárních organoidů mléčné žlázy

V laminárním boxu byly žlázy přeneseny na novou Petriho misku, přetrvávající přebytečná tekutina byla odsáta. Za pomoci skalpelů byla žláza nasekána na kousky o velikosti přibližně 1 mm³. Nakrájená tkáň byla přenesena do zkumavky s roztokem kolagenázy. Zkumavka byla protřepávána po dobu 30 minut při 100 rpm a teplotě 37°C. Po uplynutí tohoto času byla táž zkumavka vystavena desetiminutové centrifugaci za přetížení 450 g. Při centrifugaci došlo k rozdělení obsahu zkumavky na tři části. Vrchní část představující tuk byla odebrána stejně jako prostřední vrstva se supernatantem. Zbývající pelet byl resuspendován v 5 ml DMEM/F12 a znovu 10 minut centrifugován při přetížení 450 g. Poté byl odebrán supernatant a pelet byl resuspendován v 4 ml DMEM/F12 a 40 µl DNázy. Následně byla zkumavka 5 minut ručně protřepávána. Ke směsi bylo přidáno ještě 6 ml DMEM/F12 a vše bylo opět centrifugováno 10 minut při 450 g. Po odebrání supernatantu byl pelet resuspendován v 8 ml DMEM/F12.

Dále byla provedena diferenciální centrifugace, při níž byla zkumavka centrifugována 10 sekund při přetížení 450 g, pelet byl resuspendován v 9 ml DMEM/F12. Tento postup byl zopakován celkem třikrát (Koledova a Lu, 2017).

2.3. Vytvoření 3D kultur

Pro vytvoření 3D buněčných kultur s organoidy mléčné žlázy bylo potřeba centrifugovat organoidy 3 minuty při 450 g a výsledný pelet resuspendovat v bazálním organoidovém médiu, které je tvořeno z ITS, penicilinu a streptomycinu v DMEM/F12.

Pro tento experiment byla použita dvaceti čtyř jamková kultivační destička. Do každé jamky bylo nejdříve napipetováno 20 μ l Matrigelu (bez organoidů). Destička byla poté inkubována 15 minut při 37°C, aby došlo k zatuhnutí Matrigelu. Mezitím byly spočítány vyizolované organoidy a ty se poté smíchaly s Matrigelem tak, aby na každou jamku přišlo přibližně 300 organoidů a 50 μ l Matrigelu. Po zatuhnutí Matrigelu v jamkách byl do každé jamky přidán Matrigel s organoidy.

Do každé jamky byl nakonec přidán 1 ml kultivačního média. Každá jamka obsahovala bazální organoidové médium, do některých jamek byly přidány růstové faktory a jejich kombinace.

2.4. Mikroskopické focení

Focení organoidů probíhalo v inkubátoru mikroskopu Olympus, kde byla stálá teplota 37°C a stálá 5% koncentrace CO₂. Focení probíhalo na zvětšení 10x, na konci experimentu byly organoidy přefoceny i na zvětšení 4x. Mimo focení byly organoidy umístěny v samostatném inkubátoru, kde byla teplota i koncentrace CO₂ stejná jako v inkubátoru mikroskopu.

Organoidy byly foceny technikou pseudo time-lapse, tedy v den izolace (den 0) a poté každý třetí den (den 3, 6, 9), kdy zároveň probíhala výměna média. Devátý den byl posledním dnem experimentu a tudíž byly organoidy vyfoceny a zafixovány.

2.5. Fixace organoidů

Fixace organoidů probíhala v laminárním boxu. Před samotnou fixací bylo z jamek odsáto médium. K vlastní fixaci bylo použito 4% PFA, které se nechalo 30 minut při pokojové teplotě působit. Poté bylo PFA odstraněno a organoidy byly znovu promyty v PBS. Po promytí bylo do jamek přidáno nové PBS, destička byla zafilmována a uložena do lednice.

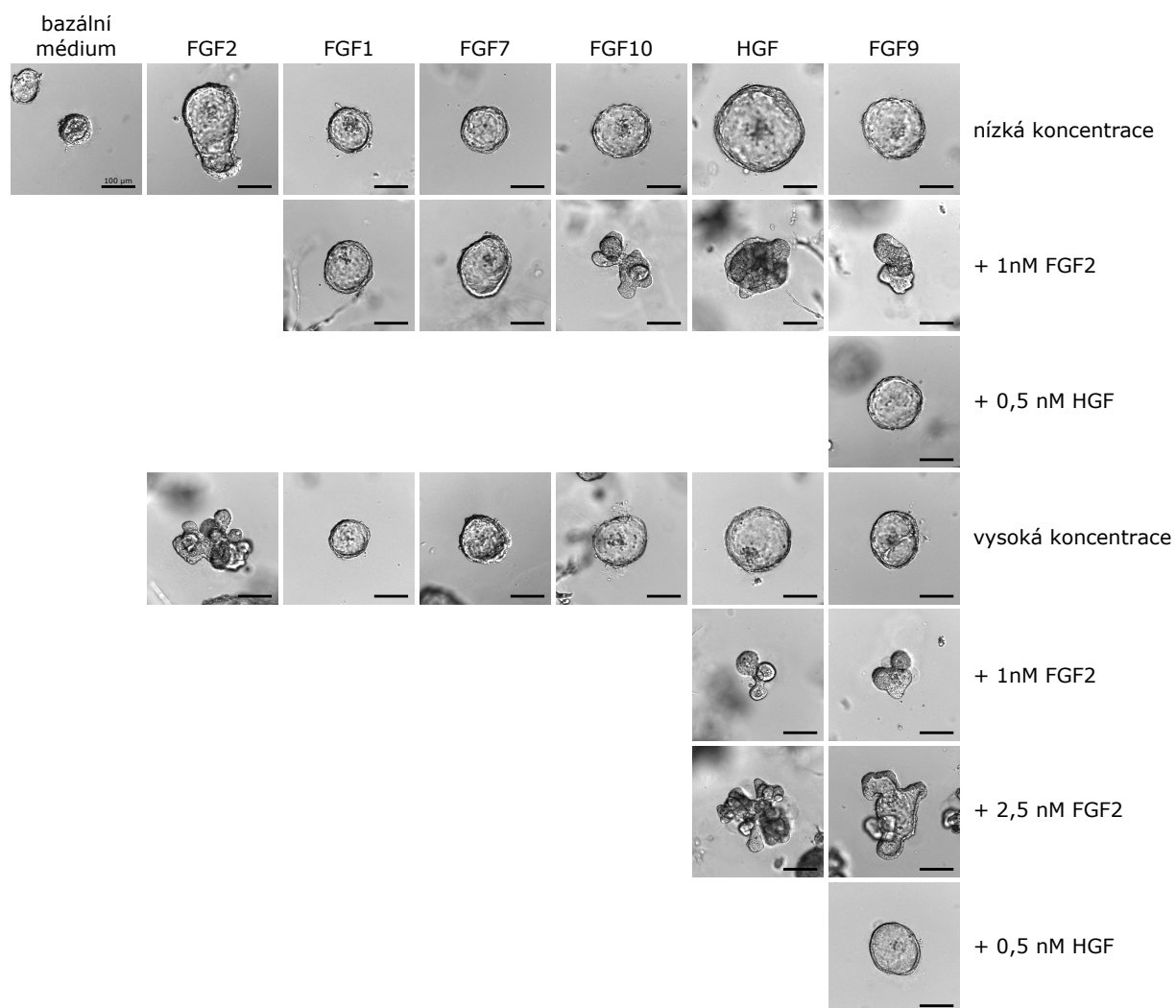
2.6. Obrazová analýza organoidů

Získané fotografie byly analyzovány s použitím programu ImageJ. Pomocí funkce mnohoúhelníkového výběru byla měřena plocha organoidu, pomocí funkce rovné čáry byla

změřena tloušťka stěny, pokud organoid vytvořil cystu. Mimo program pak bylo vyhodnoceno větvení organoidů, tedy zda organoid vytvořil větve a jejich případný počet. Výsledná data byla zanesena do tabulek, následně byly vypočítány průměrné hodnoty a vytvořeny grafy.

3. VÝSLEDKY

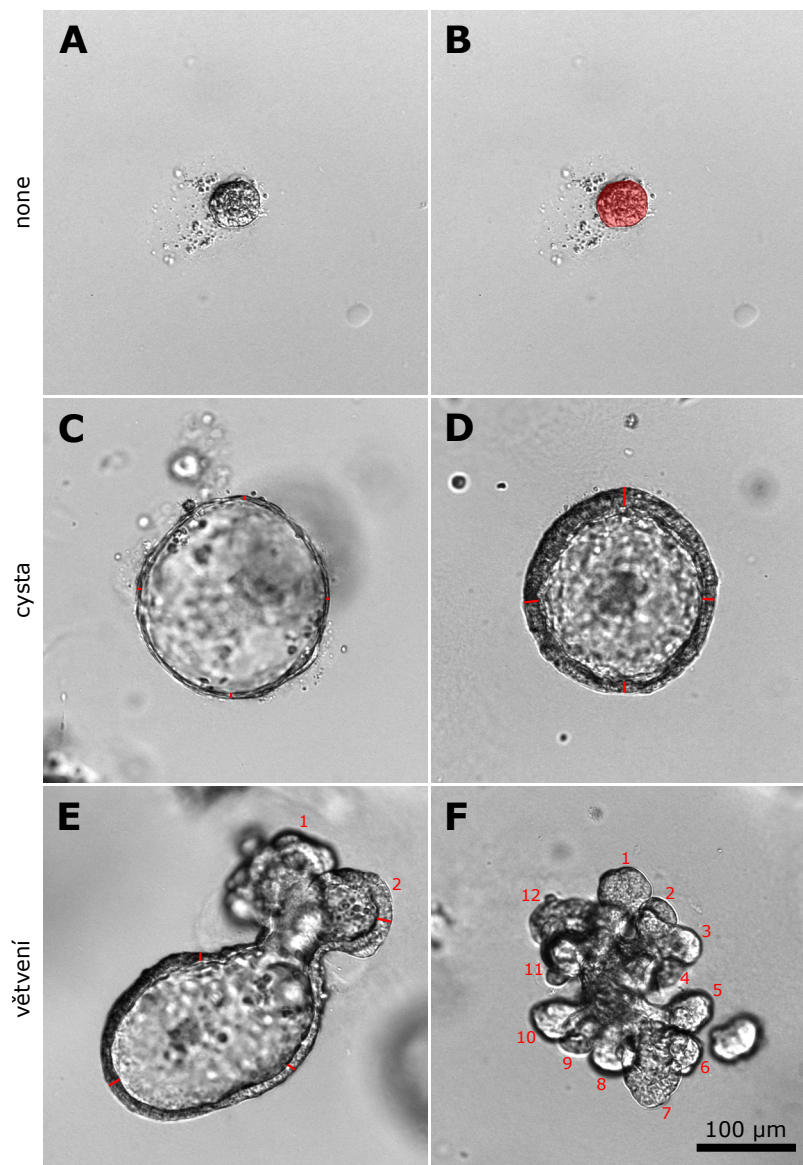
V této práci byly organoidy kultivovány v bazálním médiu (kontrolní skupina) a médiích s přidanými růstovými faktory. Byly použity FGF1, FGF2, FGF7, FGF9, FGF10 nebo HGF o různých koncentracích a dále bylo využito kombinací FGF1, FGF7, FGF9, FGF10 a HGF s FGF2 a kombinace FGF9 s HGF. Shrnutí experimentů je na obrázku 8.



Obr. 8: Shrnutí experimentů. V práci byl sledován vliv FGF1, FGF2, FGF7, FGF9, FGF10, HGF a některých jejich kombinací na vývoj epitelu mléčné žlázy. Obrázky představují typické fenotypy pro určité skupiny organoidů na konci devítidenní kultivace. Měřítko: 100 µm.

Organoidy byly členěny do skupin podle toho, jaký fenotyp vykazovaly. Jednalo se o fenotyp none (malé organoidy typické především pro kontrolní skupinu organoidů kultivovaných v bazálním médiu), cystu, větvenou cystu a normální větvení, ke kterému dochází ve většici morfogenezi mléčné žlázy.

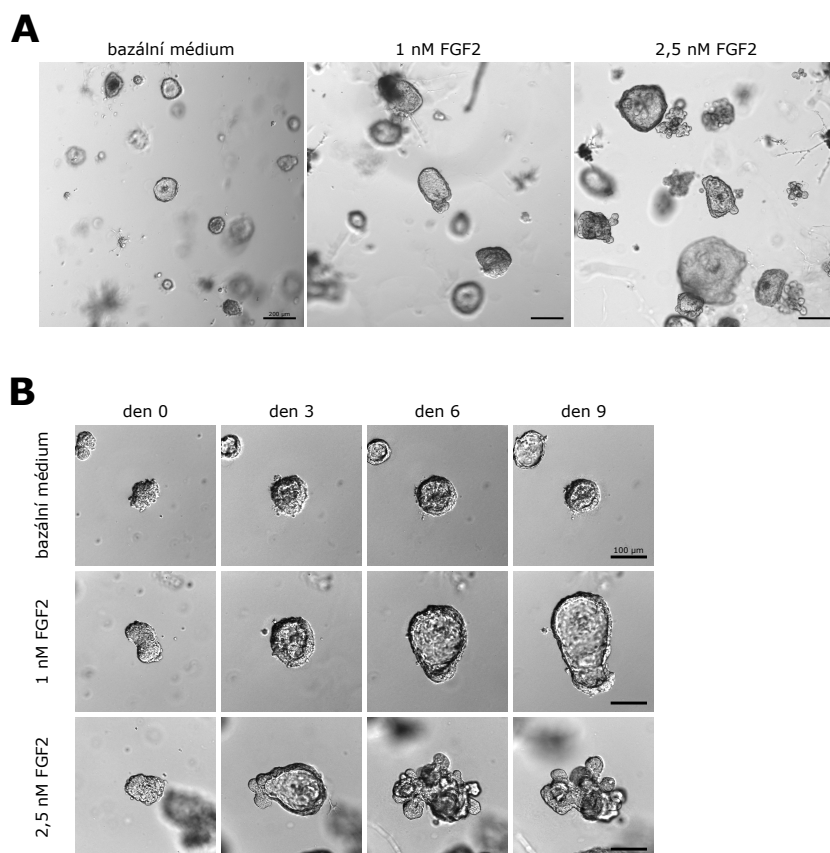
U organoidů všech fenotypů byla měřena plocha, kterou organoid zabíral. Pokud organoid vytvořil cystu, případně větvenou cystu, byla na čtyřech místech změřena tloušťka její stěny a z těchto hodnot byla následně vypočítána průměrná tloušťka stěny cysty. Jestliže bylo identifikováno normální větvení nebo větvená cysta, byl zaznamenán počet větví, jež příslušný organoid vytvořil. Přehled fenotypů a způsobů jejich analýzy je znázorněn na obrázku 9.



Obr. 9: Přehled fenotypů a způsobů jejich analýzy. A,B - fenotyp none, C - tenkostěnná cysta, D - tlustostěnná cysta, E - větvená cysta, F - normální větvení. Obrázek B znázorňuje měření plochy organoidu, obrázky C, D, E měření tloušťky stěny cysty, obrázky E, F počítání větví. Měřítko: 100 μm .

3.1. Vliv FGF2 na fenotyp organoidů

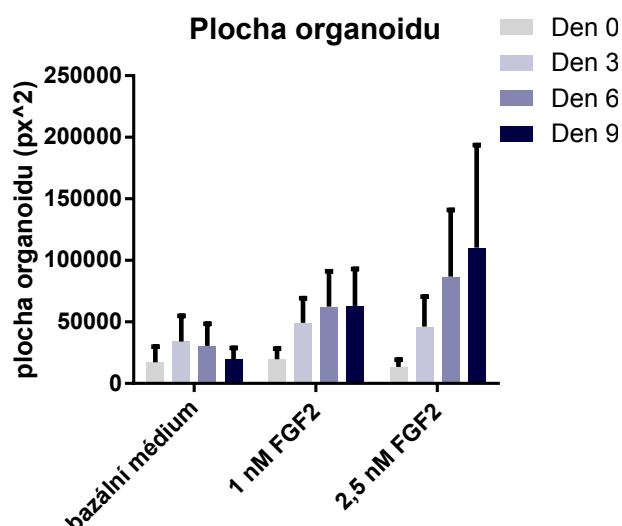
U FGF2 byl potvrzen jeho pozitivní vliv na větvení organoidů (Obr. 10). Narozdíl od kontrolní skupiny, kde se větvení nevyskytovalo (zde byl nejvíce zastoupen fenotyp none a cysta), docházelo v přítomnosti FGF2 k větvení až u 30% organoidů v případě nižší koncentrace (1 nM) FGF2. Při kultivaci ve vyšší koncentraci (2,5 nM) FGF2 došlo k dalšímu nárůstu počtu větvících organoidů. Šestého dne kultivace, kdy dosáhnul počet větvících organoidů v obou koncentracích FGF2 maxima, tvořilo větve okolo 60% organoidů kultivovaných s 2,5 nM FGF2 (Graf 1).



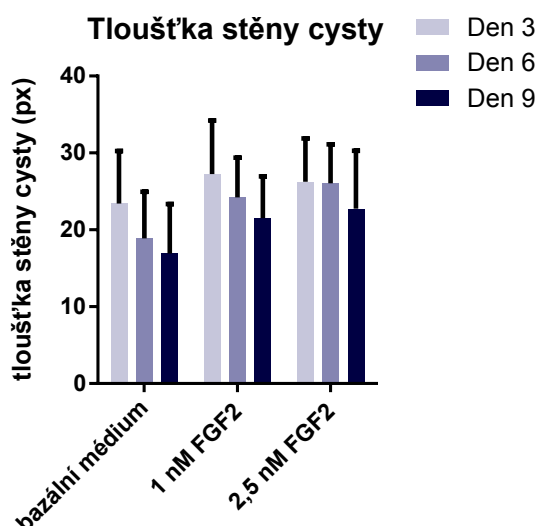
Obr. 10: Srovnání organoidů v médiu s FGF2. A - Celkový pohled na kulturu na konci devítidenní kultivace. Měřítko: 200 µm. B - Měřítko: 100 µm.

Šestého dne kultivace dosáhnul maxima také průměrný počet větví na jeden organoid. Organoidy v médiu s 2,5 nM FGF2 měly asi 2x více větví než organoidy v médiu s nižší koncentrací FGF2 (Graf 2).

Narozdíl od větvení dosáhla při kultivaci s FGF2 průměrná velikost organoidu maxima až devátého dne. V kontrolní skupině se průměrná velikost organoidu mírně snižovala již od



Graf 3: Plocha organoidů v médiu s FGF2 v průběhu devíti dnů kultivace.



Graf 4: Tloušťka stěny cysty v médiu s FGF2 v průběhu devíti dnů kultivace.

3.2. Vliv FGF1 na fenotyp organoidů

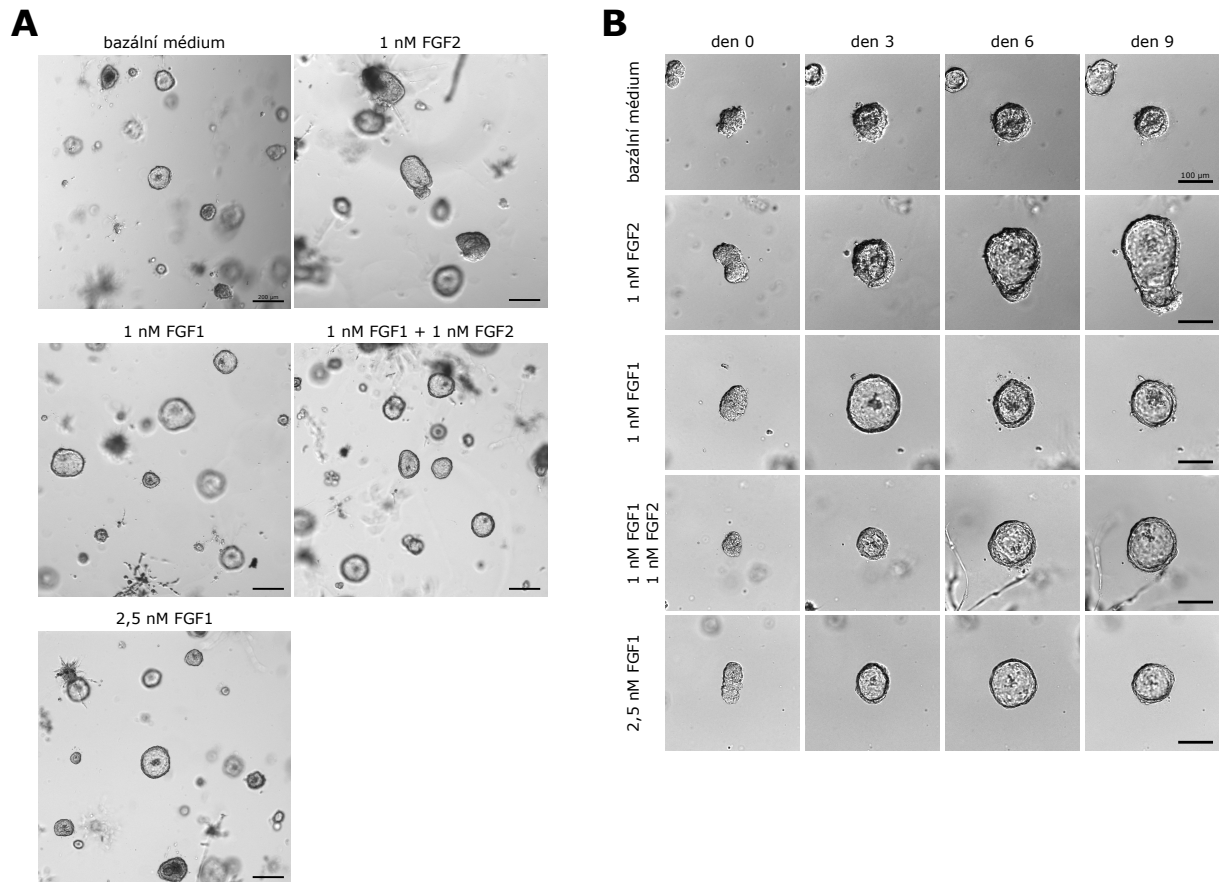
Při kultivaci organoidů s FGF1 odpovídalo nejvíce organoidů (až 80%) fenotypu cysty (Obr. 11). Dále byl zastoupen fenotyp none, větvení nenastalo ani při nižší, ani při vyšší koncentraci FGF1 v médiu. FGF1 neindukuje větvení v průběhu větvicí morfogeneze (Graf 5). Velikost organoidů kultivovaných s FGF1 byla pouze mírně vyšší než u organoidů z bazálního média (Graf 7). Také u průměrné tloušťky stěny cysty byl rozdíl oproti kontrolní skupině jen minimální, stěna cyst z média s FGF1 byla lehce užší než v bazálním médiu (Graf 8). Rozdíl ve vlivu různých koncentrací na fenotyp organoidů nebyl znatelný.

3.2.1. Kombinace FGF1 a FGF2

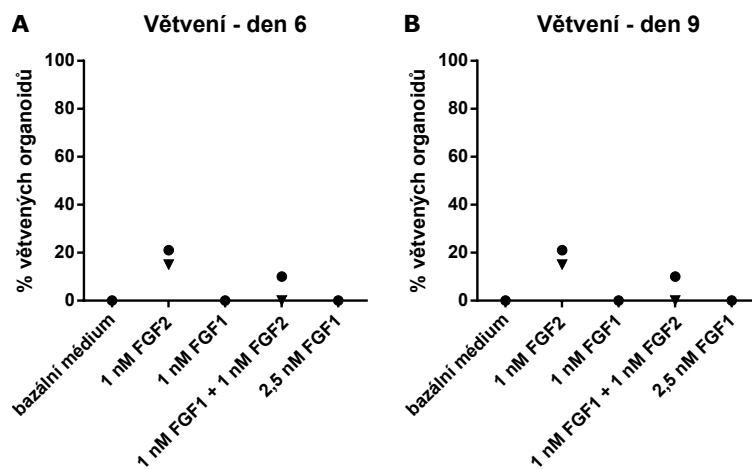
U organoidů kultivovaných s FGF2 bylo pozorováno větvení, zatímco u organoidů kultivovaných s FGF1 ne. Kombinací 1 nM FGF1 s 1 nM FGF2 došlo ke snížení počtu větvených organoidů oproti počtu větvených organoidů v médiu s FGF2, nejvíce zastoupeným fenotypem byla cista, podobně jako při kultivaci s FGF1 (Graf 5). Stejně tak měly větvené organoidy v kombinaci FGF1 a FGF2 v porovnání s organoidy pouze v FGF2 méně větví (Graf 6). FGF1 tak zřejmě negativně ovlivňuje větvení indukované FGF2.

Velikost organoidů v kombinaci faktorů oproti organoidům v FGF2 znatelně poklesla. Jejich velikost byla přibližně stejná jako velikost organoidů pouze v FGF1 (Graf 7). FGF1 zřejmě zabránil stimulaci růstu prostřednictvím FGF2.

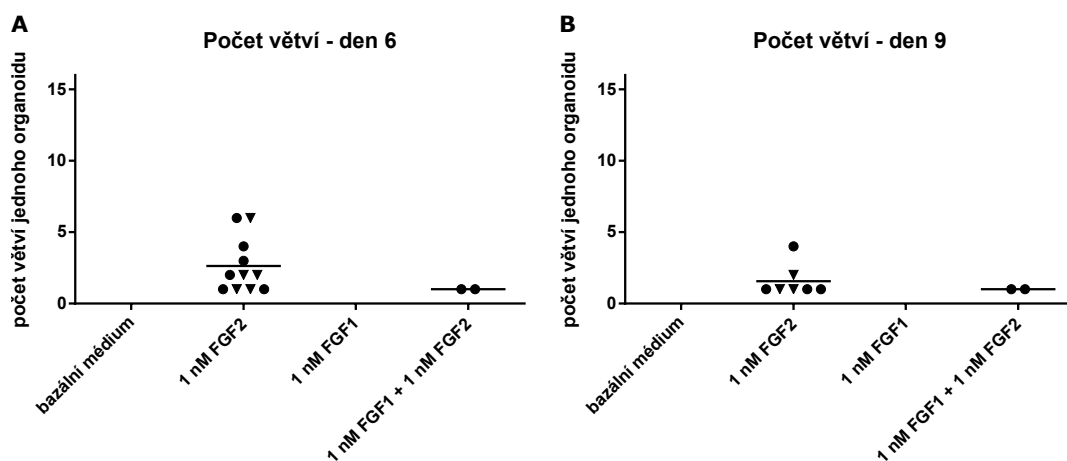
U tloušťky stěny cysty došlo k mírnému zúžení oproti organoidům v médiu s FGF2, tloušťka byla srovnatelná s tloušťkou stěny cysty pozorované u kontrolní skupiny (Graf 8).



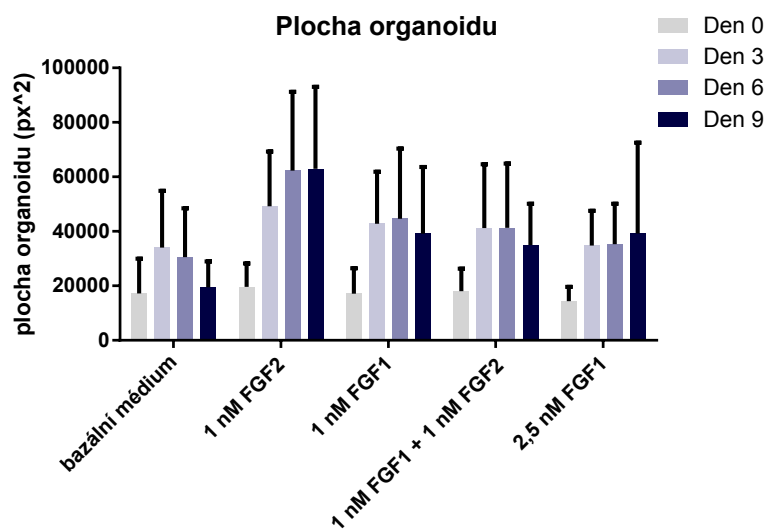
Obr. 11: Srovnání organoidů v médiu s FGF1 a kombinací s FGF2. A - Celkový pohled na kulturu na konci devítidenní kultivace. Měřítka: 200 μm . B - Měřítka: 100 μm .



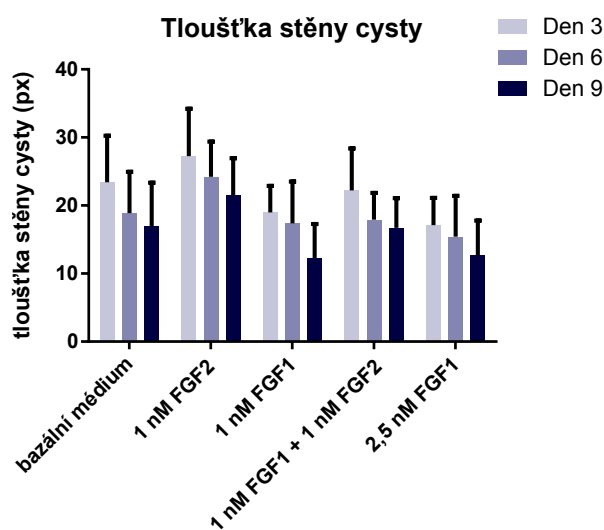
Graf 5: Větvení organoidů v médiu s FGF1 a kombinací s FGF2 v průběhu devíti dnů kultivace. A - den 6. B - den 9.



Graf 6: Počet větví větvených organoidů v médiu s FGF1 a kombinací s FGF2 v průběhu devíti dnů kultivace. A - den 6. B - den 9.



Graf 7: Plocha organoidů v médiu s FGF1 a kombinací s FGF2 v průběhu devíti dnů kultivace.



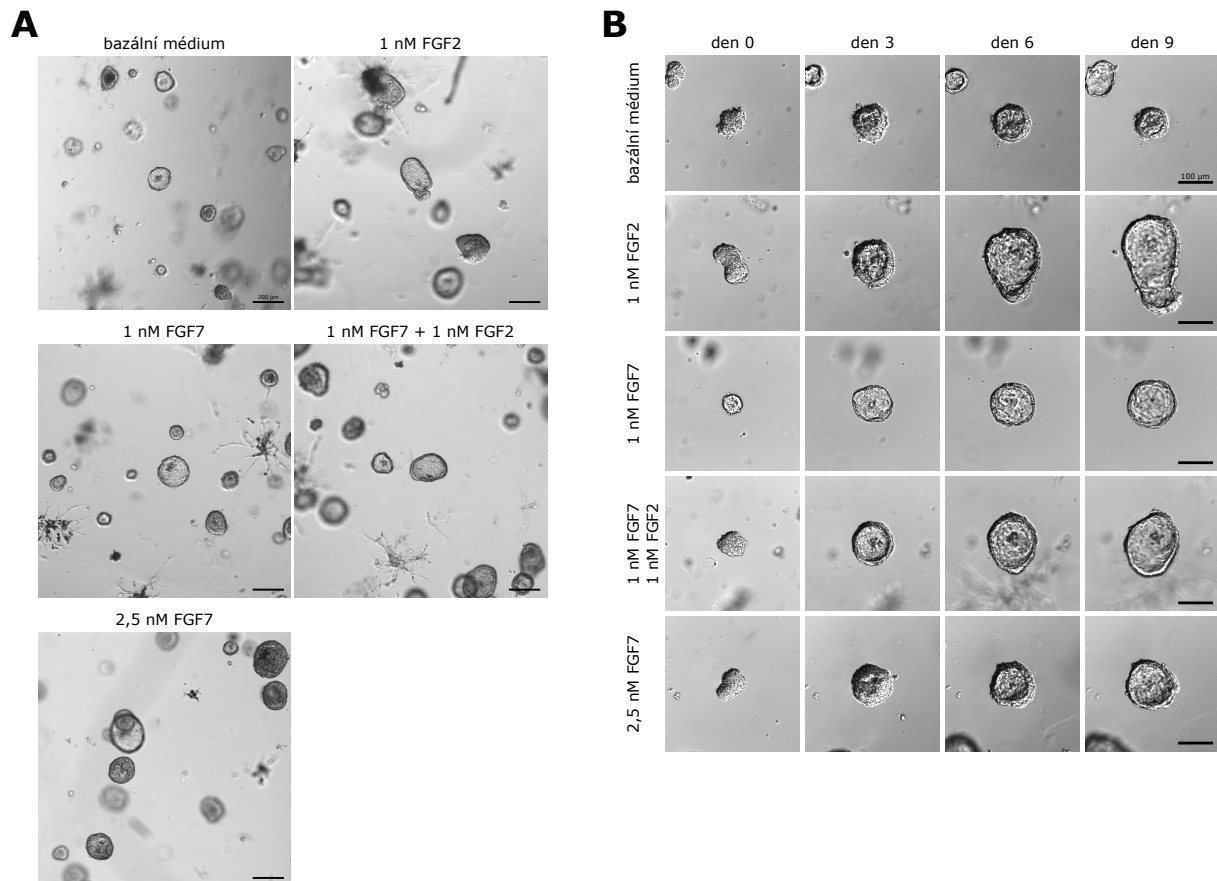
Graf 8: Tloušťka stěny cysty v médiu s FGF1 a kombinací s FGF2 v průběhu devíti dnů kultivace.

3.3. Vliv FGF7 na fenotyp organoidů

Nejčastějším fenotypem v médiu s FGF7 byla tlustostěnná cysta (Obr. 12). Tloušťka stěny organoidů z nižší koncentrace FGF7 odpovídala tloušťce stěny cysty z bazálního média, zatímco ve vyšší koncentraci FGF7 dosáhla tloušťka stěny dokonce tloušťky stěny cysty z média s 1 nM FGF2 (Graf 12).

Velikost organoidů se působením FGF7 oproti kontrolní skupině mírně zvyšovala, organoidy však nedosáhly takové velikosti jako v 1 nM FGF2 (Graf 11).

Větvení nebylo při kultivaci s FGF7 dosaženo, a to jak při nižší, tak při vyšší koncentraci tohoto faktoru (Graf 9).



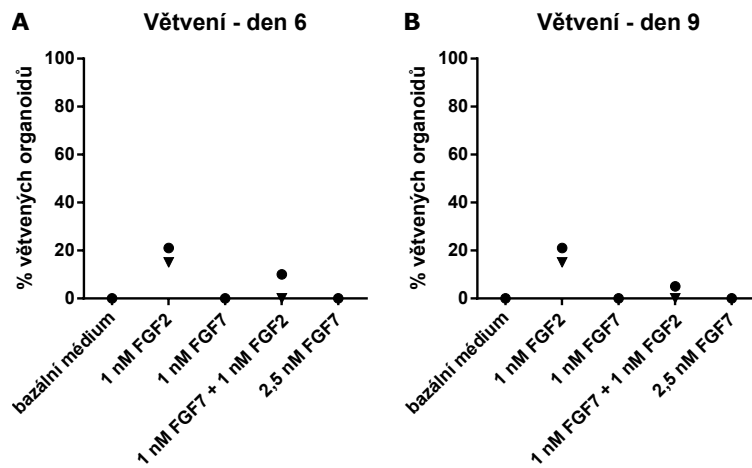
Obr. 12: Srovnání organoidů v médiu s FGF7 a kombinací s FGF2. A - Celkový pohled na kulturu na konci devítidenní kultivace. Měřítka: 200 μ m. B - Měřítka: 100 μ m.

3.3.1. Kombinace FGF7 a FGF2

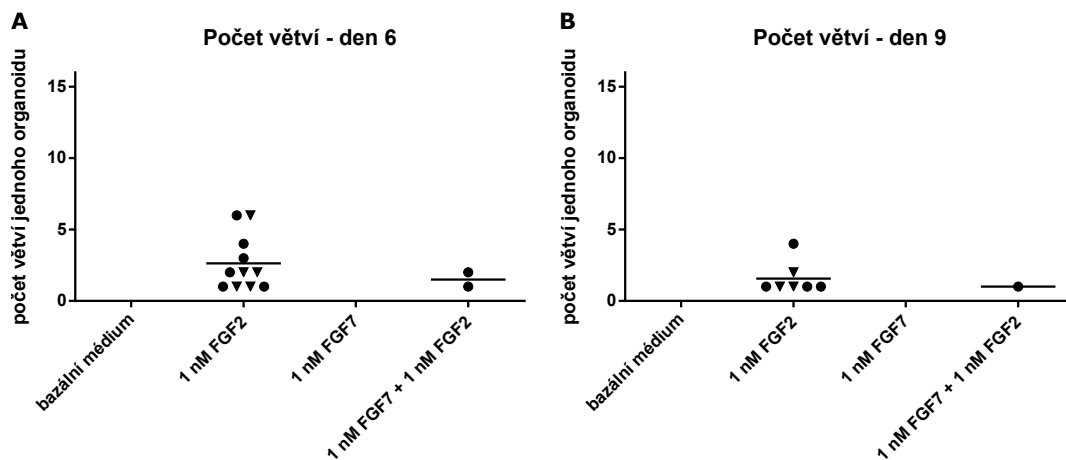
Při kombinaci faktorů FGF7 a FGF2 zůstala tloušťka stěny přibližně stejná jako u 1 nM FGF2 (Graf 12).

Maximální průměrná velikost organoidu, dosažená devátého dne, byla přibližně stejná jako v 1 nM FGF2, tak v kombinaci FGF7 a FGF2. Rozdíl spočíval v rychlosti dosažení tohoto maxima. V 1 nM FGF2 se organoid už od začátku rapidně zvětšoval, maxima dosáhl již šestého dne a do devátého dne se na něm udržel. Naproti tomu v kombinaci 1 nM FGF2 a 1nM FGF7 docházelo k dosažení maxima spíše pozvolněji (Graf 11).

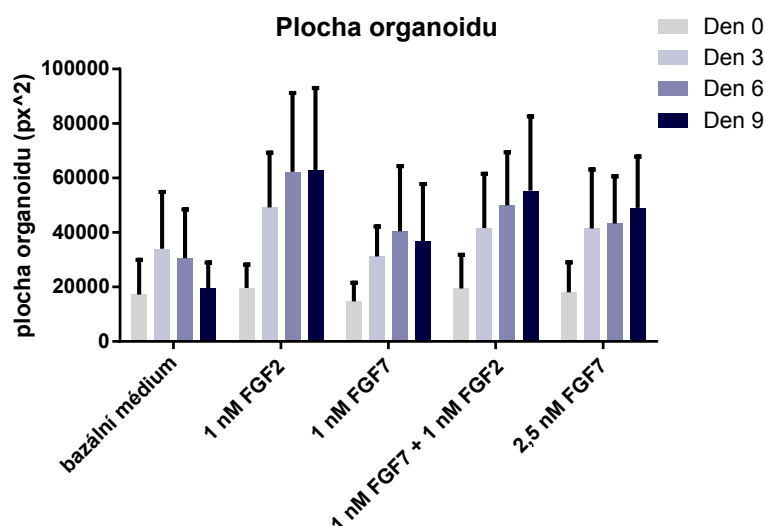
V médiu s kombinací FGF7 a FGF2 došlo k významnému poklesu počtu větvících organoidů oproti 1 nM FGF2 (Graf 9). Také průměrný počet větví jednoho organoidu se snížil (Graf 10). Celkově to naznačuje, že FGF7 podobně jako FGF1 působí proti FGF2 a negativně ovlivňuje vznik větví u organoidů mléčné žlázy.



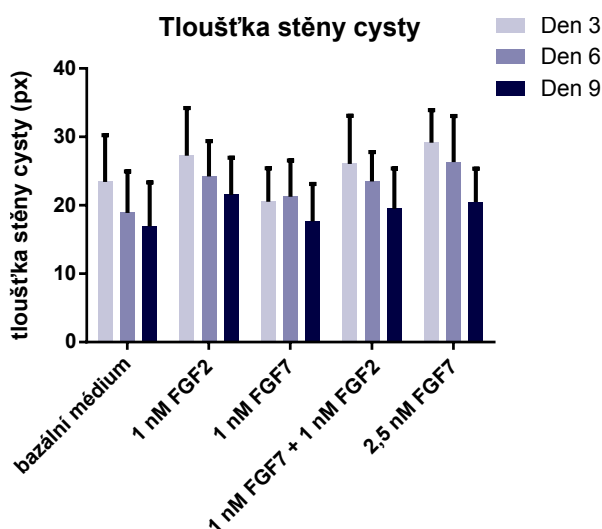
Graf 9: Větvení organoidů v médiu s FGF7 a kombinací s FGF2 v průběhu devíti dnů kultivace. A - den 6. B - den 9.



Graf 10: Počet větví větvených organoidů v médiu s FGF7 a kombinací s FGF2 v průběhu devíti dnů kultivace. A - den 6. B - den 9.



Graf 11: Plocha organoidů v médiu s FGF7 a kombinací s FGF2 v průběhu devíti dnů kultivace.



Graf 12: Tloušťka stěny cysty v médiu s FGF7 a kombinací s FGF2 v průběhu devíti dnů kultivace.

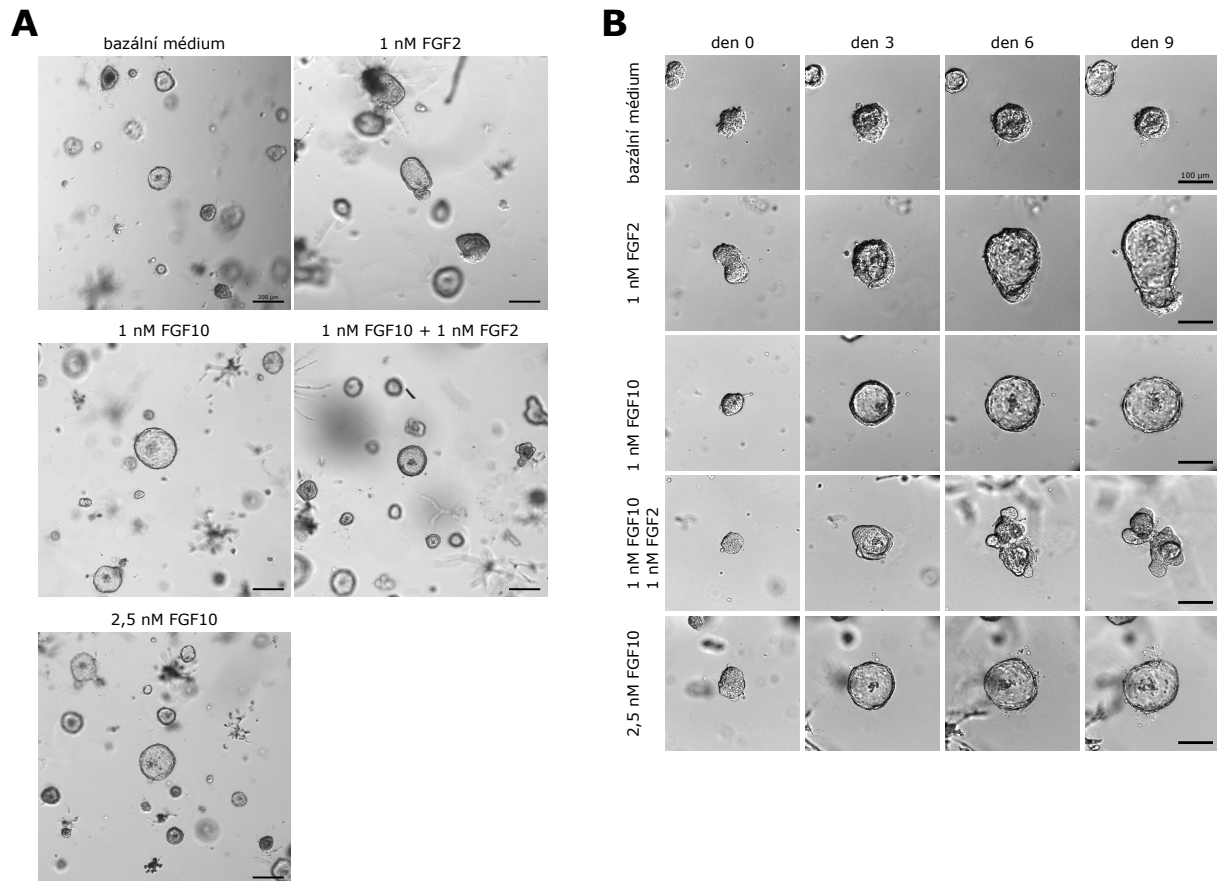
3.4. Vliv FGF10 na fenotyp organoidů

Organoidy kultivované v médiu s FGF10 opět nejčastěji vykazovaly fenotyp cysty, zde se ale jednalo o cystu tenkostěnnou (Obr. 13). Průměrná tloušťka stěny cysty organoidu z média s FGF10 (nižší i vyšší koncentrace) byla skoro dvakrát menší než u organoidů z kontrolní skupiny (Graf 16).

Velikost organoidů v FGF10 byla velmi různorodá, obecně se pohybovala mezi velikostí kontrolní skupiny a skupiny v FGF2. Narozdíl od FGF2, kde velikost dosáhla maxima až devátého (případně šestého) dne, bylo u FGF10 možné pozorovat největší organoidy už ve

třetím a šestém dni a poté často docházelo k regresi, podobně jako u organoidů v bazálním médiu (Graf 15).

FGF10 samo o sobě větvení neindukovalo, k větvení docházelo pouze v několika zanedbatelných případech (Graf 13).

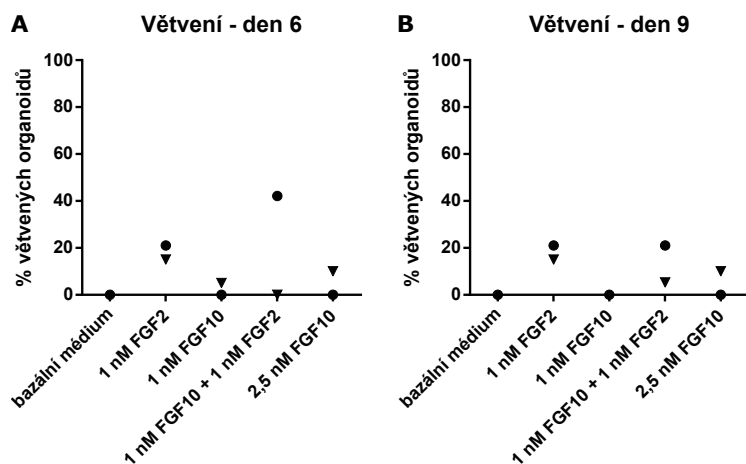


Obr. 13: Srovnání organoidů v médiu s FGF10 a kombinací s FGF2. A - Celkový pohled na kulturu na konci devítidenní kultivace. Měřítko: 200 μm . B - Měřítko: 100 μm .

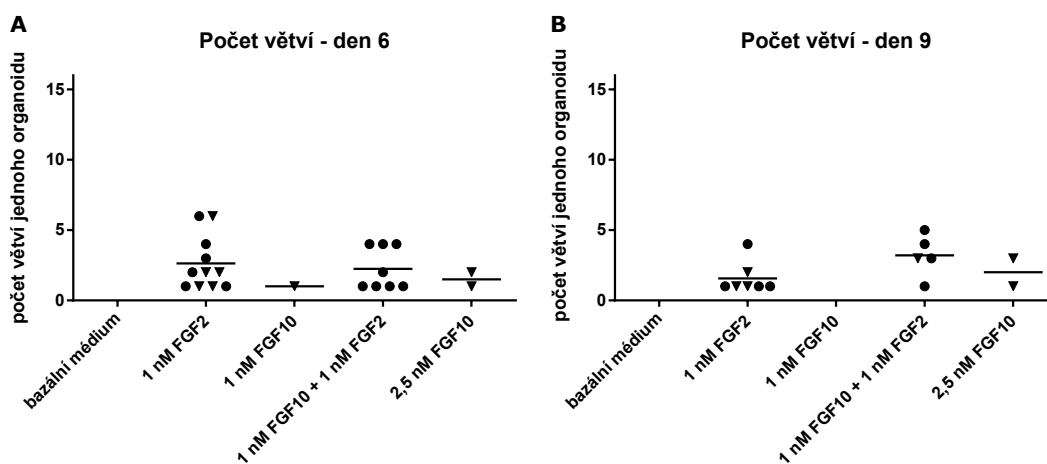
3.4.1. Kombinace FGF10 a FGF2

Zatímco organoidy v FGF2 se vyznačovaly velmi silnou stěnou, organoidy v FGF10 velmi tenkou. Kombinace způsobila zúžení stěny oproti FGF2 a naopak rozšíření oproti FGF10. Výsledná tloušťka stěny cysty odpovídala přibližně tloušťce stěny organoidu kultivovaného v bazálním médiu (Graf 16).

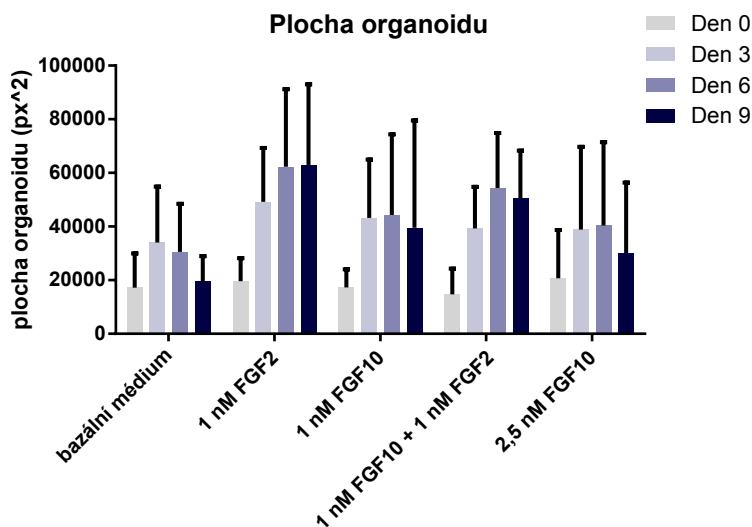
Organoidy v kombinaci faktorů dosáhly téměř stejné velikosti, jako organoidy kultivované v 1 nM FGF2. Po šestém dni, kdy byla jejich velikost nejvyšší, však docházelo k mírné regresi, podobně jako tomu bylo u organoidů kultivovaných v FGF10 (Graf 15).



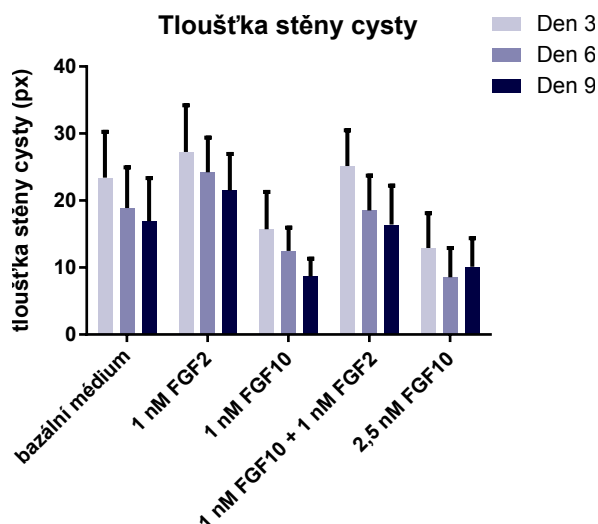
Graf 13: Větvení organoidů v médiu s FGF10 a kombinací s FGF2 v průběhu devíti dnů kultivace. A - den 6. B - den 9.



Graf 14: Počet větví větvených organoidů v médiu s FGF10 a kombinací s FGF2 v průběhu devíti dnů kultivace. A - den 6. B - den 9.



Graf 15: Plocha organoidů v médiu s FGF10 a kombinací s FGF2 v průběhu devíti dnů kultivace.



Graf 16: Tloušťka stěny cysty v médiu s FGF10 a kombinací s FGF2 v průběhu devíti dnů kultivace.

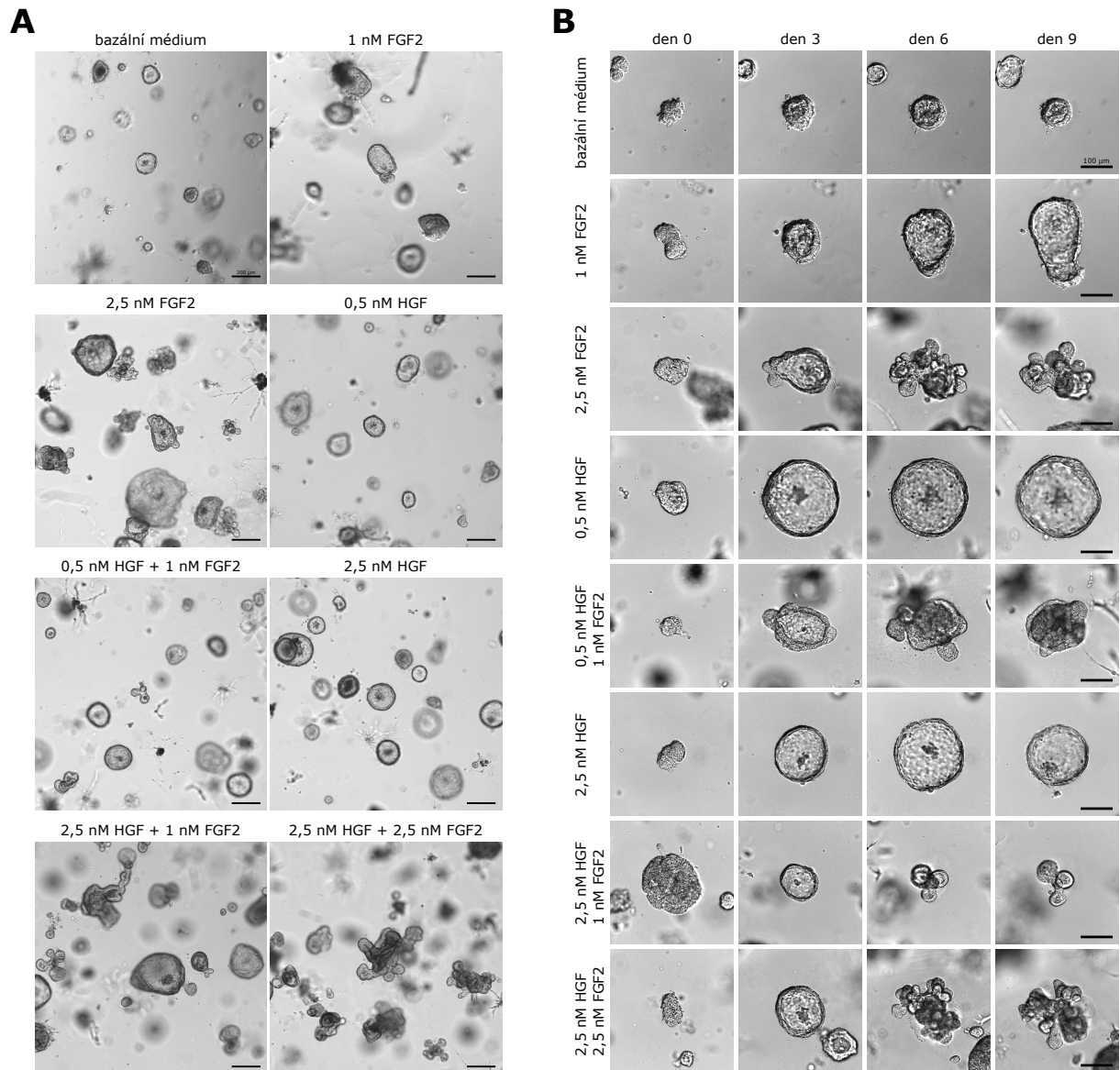
K větvení docházelo s přibližně stejnou frekvencí jako při kultivaci s 1 nM FGF2 (Graf 13). Průměrný počet větví u organoidů kultivovaných s FGF2 i FGF10 byl také podobný, devátého dne dokonce vyšší než při kultivaci s 1 nM FGF2 (Graf 14).

3.5. Vliv HGF na fenotyp organoidů

Nejčastěji pozorovaným fenotypem organoidů v HGF byla cysta (Obr. 14). Při nižší koncentraci HGF (0,5 nM) v médiu byla průměrná tloušťka její stěny k devátému dni stejná jako u organoidů z bazálního média. Zatímco se však v kontrolní skupině stěna v průběhu kultivace ztenčovala až do devátého dne (kdy byla nejtenčí), při kultivaci s HGF zůstávala tloušťka stěny po třetím dni přibližně stejně velká, snižovala se jen mírně. Ve vyšší koncentraci HGF (2,5 nM) byla stěna oproti kontrole a nižší koncentraci HGF mírně nižší, stejně jako v 0,5 nM HGF udržovala svoji tloušťku po třetím dnu přibližně stejnou (Graf 20).

Organoidy kultivované v médiu s HGF obou koncentrací byly na konci experimentu asi dvakrát větší než organoidy v kontrolní skupině. V 0,5 nM HGF rostly organoidy až do šestého dne, kdy dosáhly svého maxima, načež jejich průměrná velikost v devátém dni poklesla. V 2,5 nM HGF však k největšímu, skokovému růstu docházelo v prvních třech dnech kultivace. Třetího dne již většina organoidů dosáhla maxima a poté se jejich velikost snižovala. Ačkoli byla devátého dne velikost organoidů z médií s 0,5 nM a 2,5 nM HGF stejná, ve vyšší koncentraci HGF dosáhly organoidy vyšší maximální velikosti než v nižší koncentraci (Graf 19).

K větvení docházelo při kultivaci s HGF pouze v několika málo případech v rámci jednoho experimentu (Graf 17). Vliv HGF na větvení organoidů tedy nebyl prokázán.

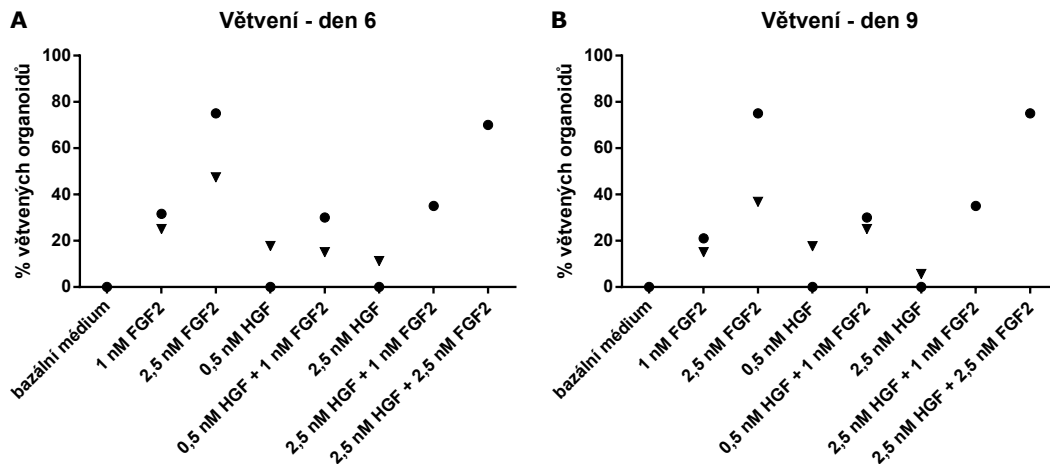


Obr. 14: Srovnání organoidů v médiu s HGF a kombinací s FGF2. A - Celkový pohled na kulturu na konci devítidenní kultivace. Měřítka: 200 µm. B - Měřítka: 100 µm.

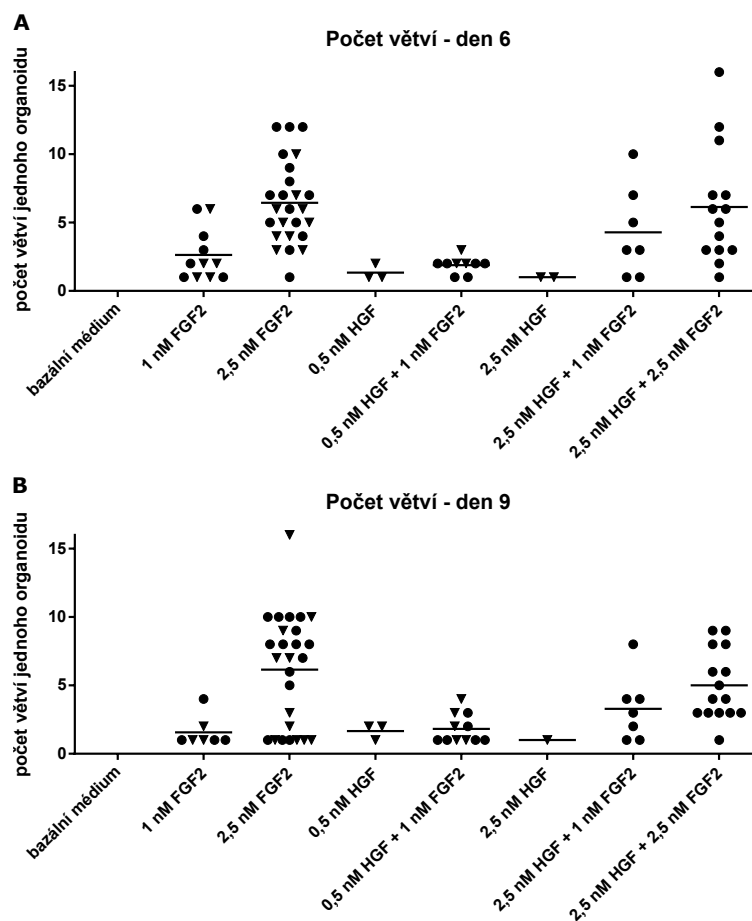
3.5.1. Kombinace HGF a FGF2

Ve všech kombinacích HGF s FGF2 se objevily fenotypy větvení (Obr. 14). V kombinaci 0,5 nM HGF a 1 nM FGF2 bylo procento větvených organoidů zhruba stejné jako v médiu s 1 nM FGF2, počet větví byl také srovnatelný. Při zvýšení koncentrace HGF (v kombinaci 2,5 nM HGF a 1 nM FGF2) se toto procento mírně zvýšilo, stejně tak i počet větví. V kombinaci 2,5 nM HGF s 2,5 nM FGF2 se větvení vyskytovalo u většiny organoidů a průměrný počet větví přesahoval šest, podobně jako v médiu s 2,5 nM FGF2 (Graf. 17, 18).

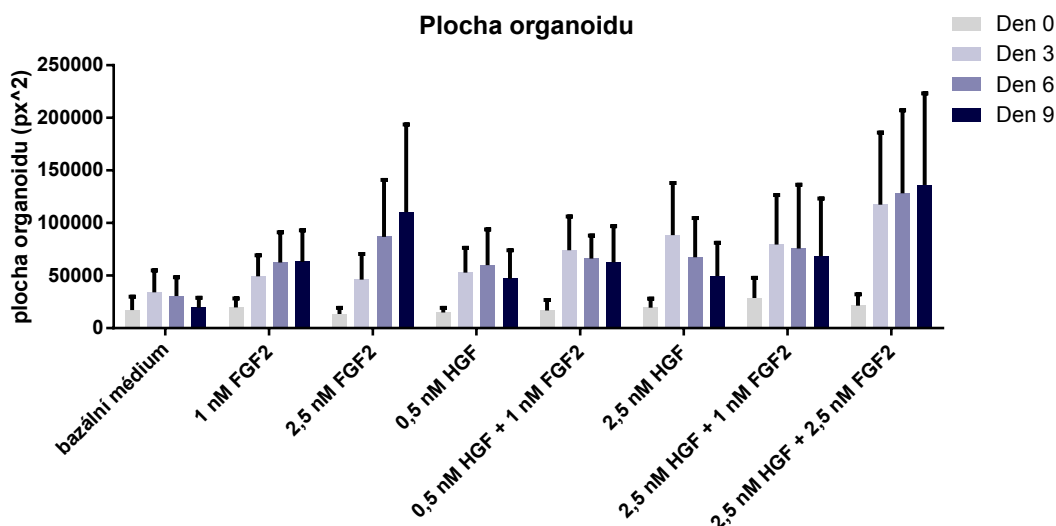
Některé organoidy v kombinaci HGF (obou koncentrací) s 2,5 nM FGF2 měly větve obzvláště dlouhé a široké, jak lze vidět na obrázku 14A. Tento fenotyp se u samotného FGF2 nevyskytoval.



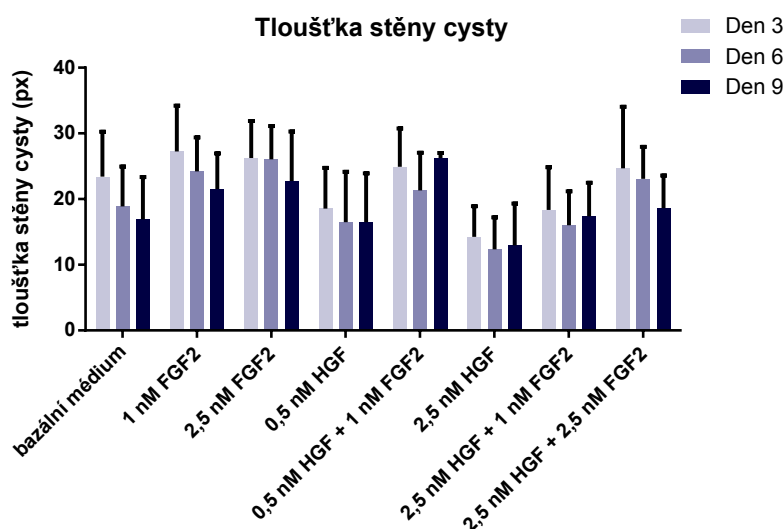
Graf 17: Větvení organoidů v médiu s HGF a kombinací s FGF2 v průběhu devíti dnů kultivace. A - den 6. B - den 9.



Graf 18: Počet větví větvených organoidů v médiu s HGF a kombinací s FGF2 v průběhu devíti dnů kultivace. A - den 6. B - den 9.



Graf 19: Plocha organoidů v médiu s HGF a kombinací s FGF2 v průběhu devíti dnů kultivace.



Graf 20: Tloušťka stěny cysty v médiu s HGF a kombinací s FGF2 v průběhu devíti dnů kultivace.

Velikost organoidů v kombinaci 0,5 nM HGF a 1 nM FGF2 byla na konci experimentu srovnatelná s velikostí organoidů z média s 1 nM FGF2. U kombinace HGF s FGF2 ale šlo pozorovat rychlejší nástup maxima, neboli větší skok v růstu mezi nultým a třetím dnem. V kombinaci 2,5 nM HGF s 1 nM FGF2 dosáhly organoidy podobné velikosti jako organoidy v médiu s 2,5 nM HGF. Narozdíl od nich však zůstávala velikost od třetího do devátého dne konstantní, případná regrese byla velmi pomalá. V kombinaci 2,5 nM HGF s 2,5 nM FGF2 byl největší růst pozorován také mezi nultým a třetím dnem. Třetího dne již byly organoidy této kombinace stejně velké jako organoidy z média s 2,5 nM FGF2 v jejich růstovém maximu (devátého dne). Po dobu dalších šesti dnů velikost organoidů kombinace ještě mírně

stoupala, devátého dne byly organoidy kultivované v 2,5 nM HGF a 2,5 nM FGF2 asi pětkrát větší než kontrolní skupina (Graf 19).

Průměrná tloušťka stěny cysty organoidů kultivovaných v médiu s 0,5 nM HGF a 1 nM FGF2 byla srovnatelná s průměrnou tloušťkou stěny cysty v 1 nM FGF2. Zatímco ale v 1 nM FGF2 tloušťka stěny od třetího do devátého dne klesala, u v kombinaci s 0,5 nM HGF dosáhla minima šestého dne a devátého dne byla opět větší. V kombinaci 2,5 nM HGF a 1 nM FGF2 byla stěna tlustší než v samotném 2,5 nM HGF, tloušťky cysty v 1 nM FGF2 ale nedosáhla. V médiu s kombinací 2,5 nM HGF a 2,5 nM FGF2 byla tloušťka stěny organoidů podobná jako v samotném 2,5 nM FGF2, v průběhu experimentu ale docházelo k výraznějšímu ztenčování než v případě 2,5 nM FGF2 (Graf 20).

3.6. Vliv FGF9 na fenotyp organoidů

Při kultivaci organoidů s FGF9 byla nejčastěji pozorovaným fenotypem tenkostěnná cysta (Obr. 15). Organoidy kultivované v obou koncentracích FGF9 měly stěnu asi dvakrát tenčí než v bazálním médiu. V nižší koncentraci se stěna v průběhu celé kultivace snižovala, až devátého dne dosáhla minima. Oproti tomu dosáhla tloušťka stěny ve vyšší koncentraci FGF9 minima již šestého dne a dále se příliš neměnila (Graf 24).

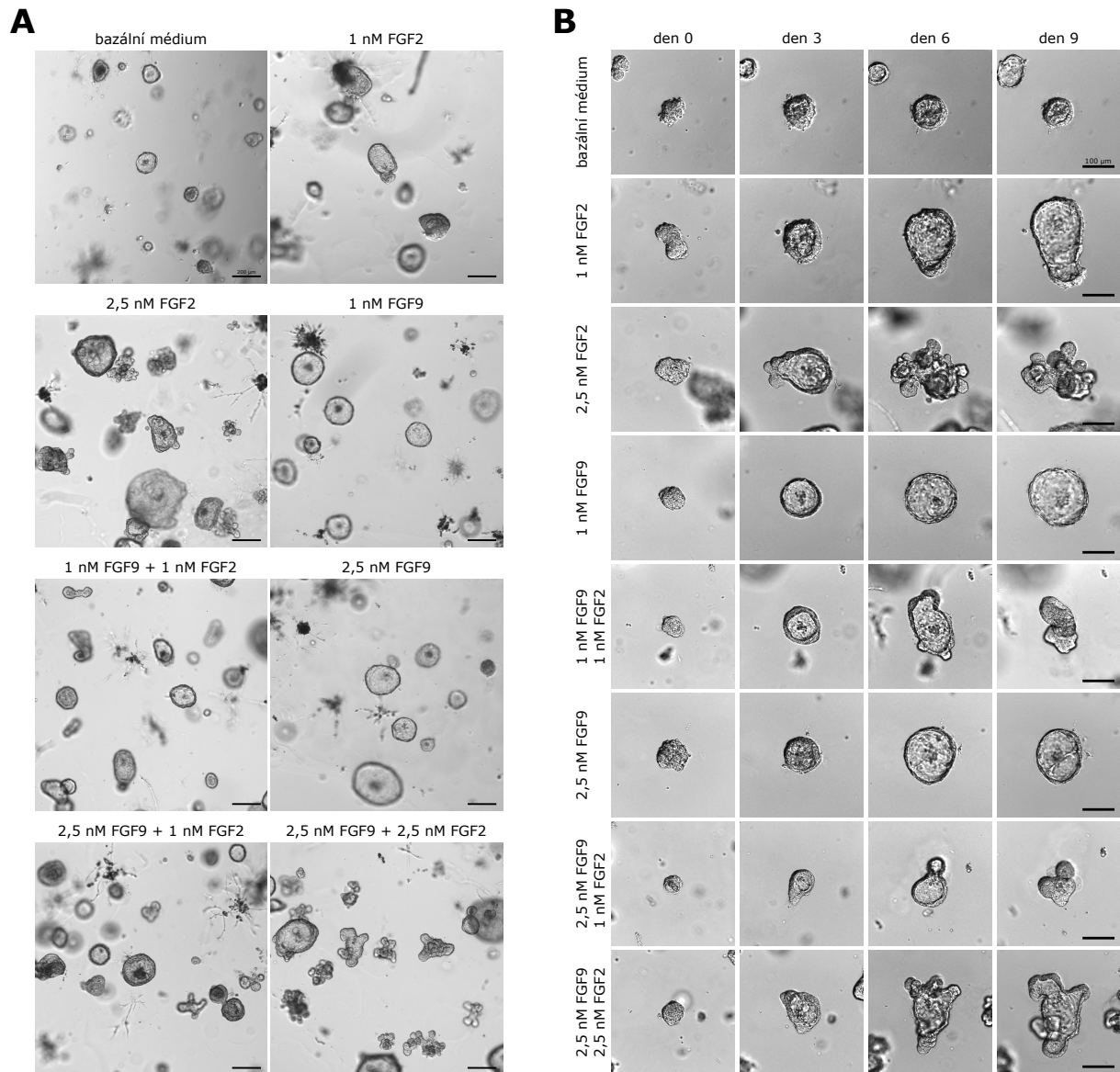
Velikost organoidů se působením FGF9 zvětšovala. Organoidy v obou koncentracích FGF9 byly na konci experimentu přibližně dvakrát větší než organoidy kontrolní skupiny, maximální velikosti bylo dosaženo šestého dne (Graf 23).

FGF9 nestimuloval organoidy k tvorbě větví při nižší ani při vyšší koncentraci (Graf 21).

3.6.1. Kombinace FGF9 a FGF2

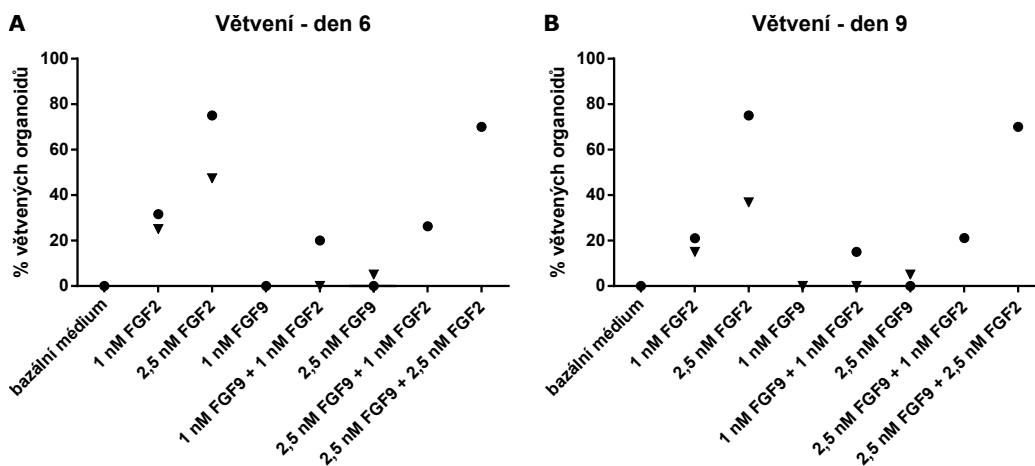
Ve všech kombinacích FGF9 a FGF2 bylo určité procento větvících organoidů. Jestliže organoidy větvaly, tvořily nejčastěji větvenou cystu. V 1 nM FGF9 a 1 nM FGF2 větvalo organoidů méně než v 1 nM FGF2, průměrný počet větví byl ale stejný. Stejné procento větvených organoidů (okolo 30% šestého dne, kdy větvení dosáhlo maxima) se vyskytovalo v 1 nM FGF2 i kombinaci 1 nM FGF2 s 2,5 nM FGF9. Počet větví byl mírně vyšší u organoidů z kombinace FGF2 s FGF9. V kombinaci 2,5 nM FGF9 a 2,5 nM FGF2 se

větvení vyskytovalo stejně často jako v 2,5 nM FGF2, počet větví byl ale mírně nižší v kombinaci faktorů. (Graf 21, 22)

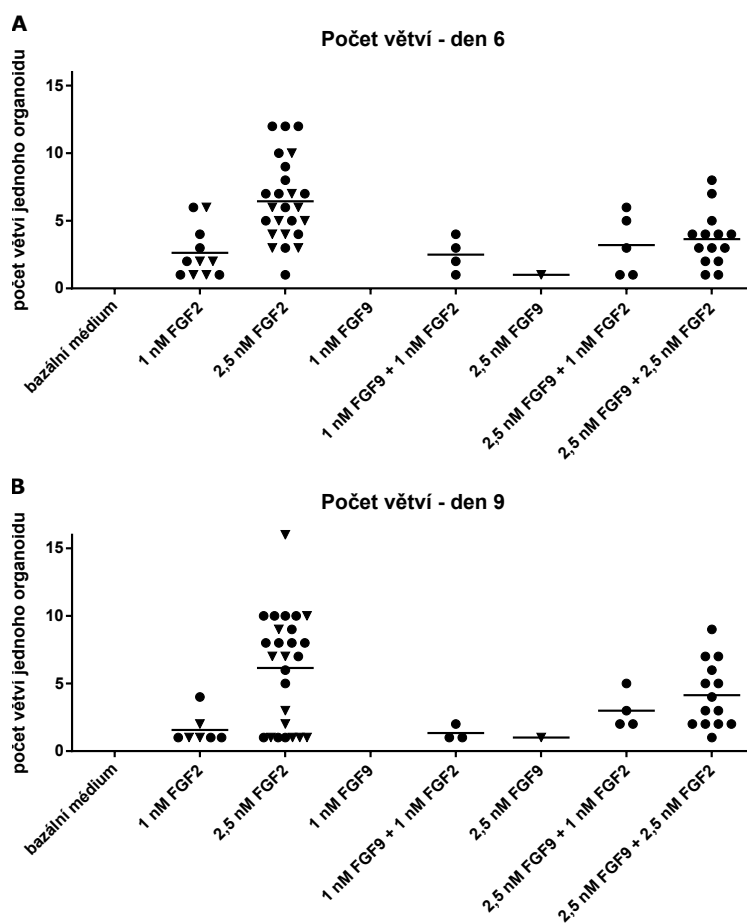


Obr. 15: Srovnání organoidů v médiu s FGF9 a kombinací s FGF2. A - Celkový pohled na kulturu na konci devítidenní kultivace. Měřítko: 200 μm . B - Měřítko: 100 μm .

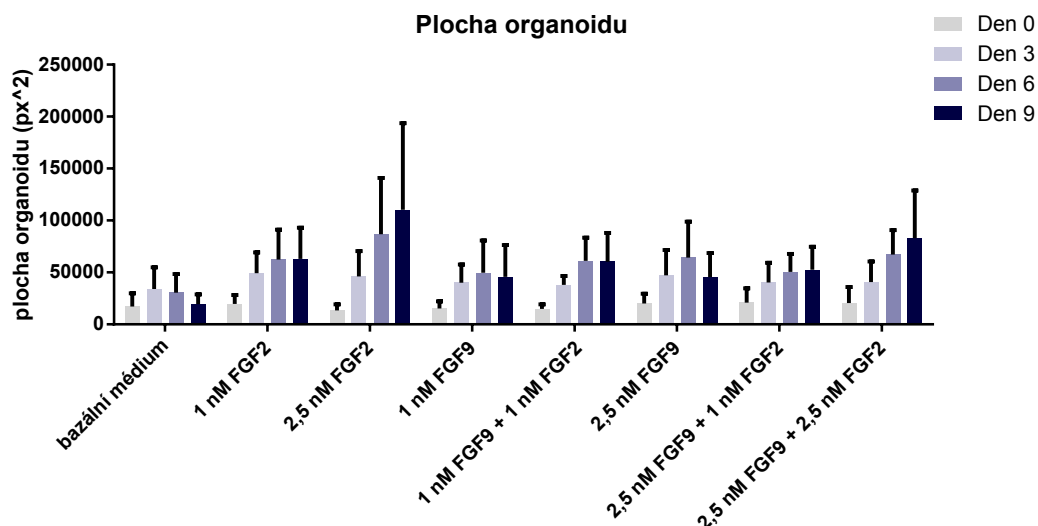
Velikost organoidů byla v kombinaci 1 nM FGF2 s oběma koncentracemi FGF9 stejná jako u 1 nM FGF2. Kombinace 2,5 nM FGF9 a 2,5 nM FGF2 vedla ke zmenšení organoidu oproti 2,5 nM FGF2, ale ke zvětšení oproti organoidům z média s 2,5 nM FGF9. Narozdíl od organoidů kultivovaných s 2,5 nM FGF9 však velikost organoidů kultivovaných s 2,5 nM FGF9 a 2,5 nM FGF2 dosáhla maxima až devátého dne, podobně jako ve 2,5 nM FGF2 (Graf 23).



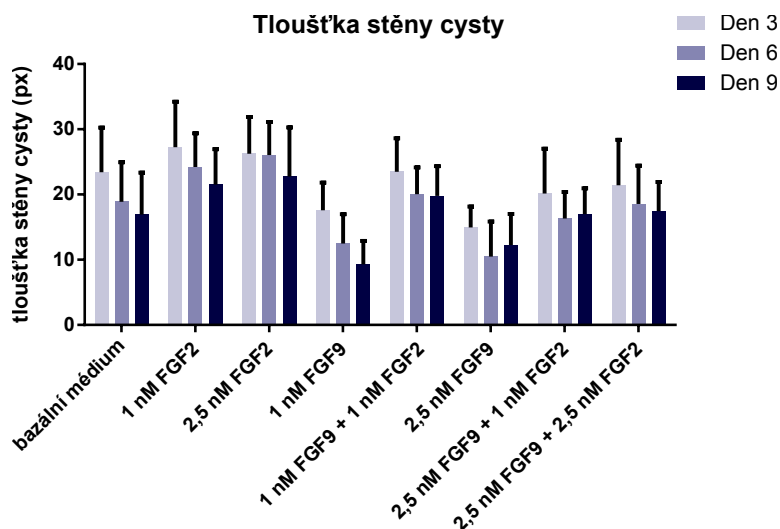
Graf 21: Větvení organoidů v médiu s FGF9 a kombinací s FGF2 v průběhu devíti dnů kultivace. A - den 6. B - den 9.



Graf 22: Počet větví větvených organoidů v médiu s FGF9 a kombinací s FGF2 v průběhu devíti dnů kultivace. A - den 6. B - den 9.



Graf 23: Plocha organoidů v médiu s FGF9 a kombinací s FGF2 v průběhu devíti dnů kultivace.

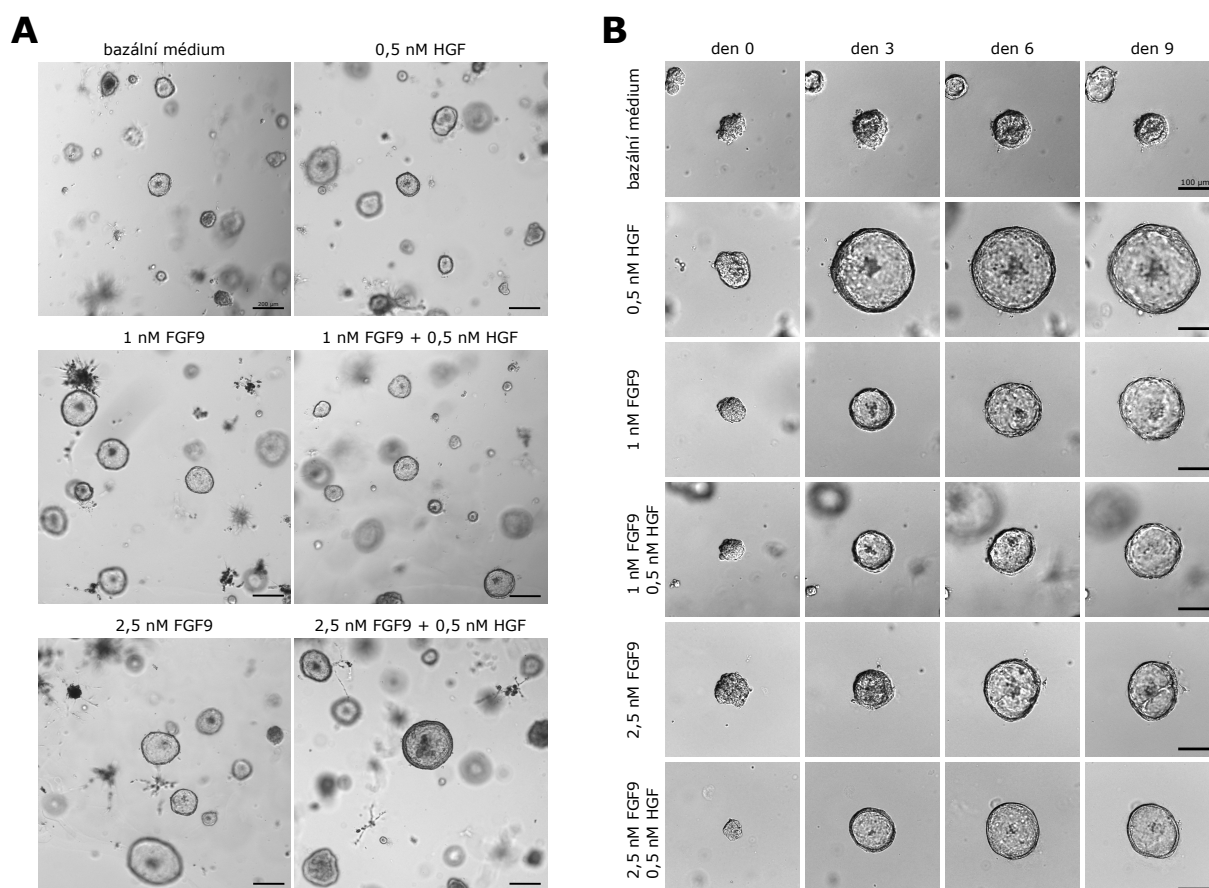


Graf 24: Tloušťka stěny cysty v médiu s FGF9 a kombinací s FGF2 v průběhu devíti dnů kultivace.

Při kultivaci organoidů s 1 nM FGF9 a 1 nM FGF2 byla průměrná tloušťka stěny cysty v devátém dni srovnatelná s organoidy z média s 1 nM FGF2. Vyšší koncentrace FGF9 v kombinaci s FGF2 (2,5 nM FGF9 a 1 nM FGF2) vedla k mírnému ztenčení stěny cysty. V obou kombinacích se stěna cysty ztenčovala do šestého dne, poté zůstávala konstantní. V kombinaci 2,5 nM FGF9 a 2,5 nM FGF2 byla průměrná tloušťka stěny cysty v posledním dni experimentu stejná jako v kombinaci 2,5 nM FGF9 a 1 nM FGF2, neboli větší než ve 2,5 nM FGF9, ale zároveň menší než v 2,5 nM FGF2 (Graf 24).

3.6.2. Kombinace FGF9 a HGF

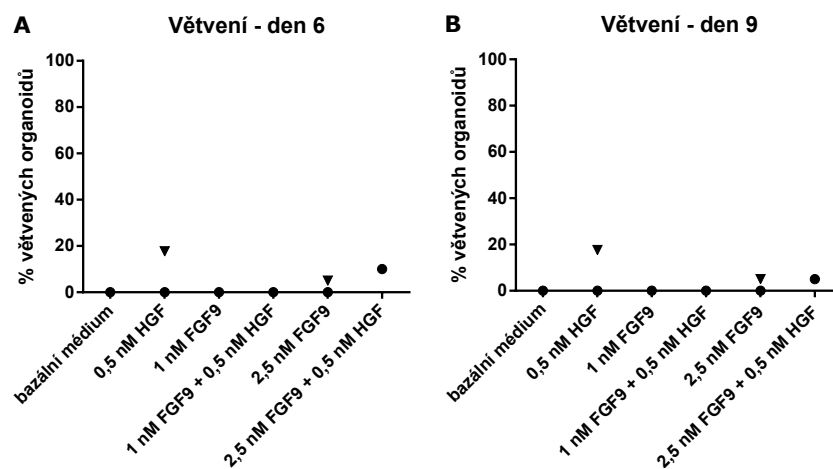
Stejně jako samotné FGF9 a samotné HGF u organoidů větvení neindukovaly, ani jedna kombinace FGF9 a HGF výrazně nestimulovala větvení u organoidů (Graf 25, 26). Nejčastějším fenotypem byla cysta, jak lze vidět na obrázku 16.



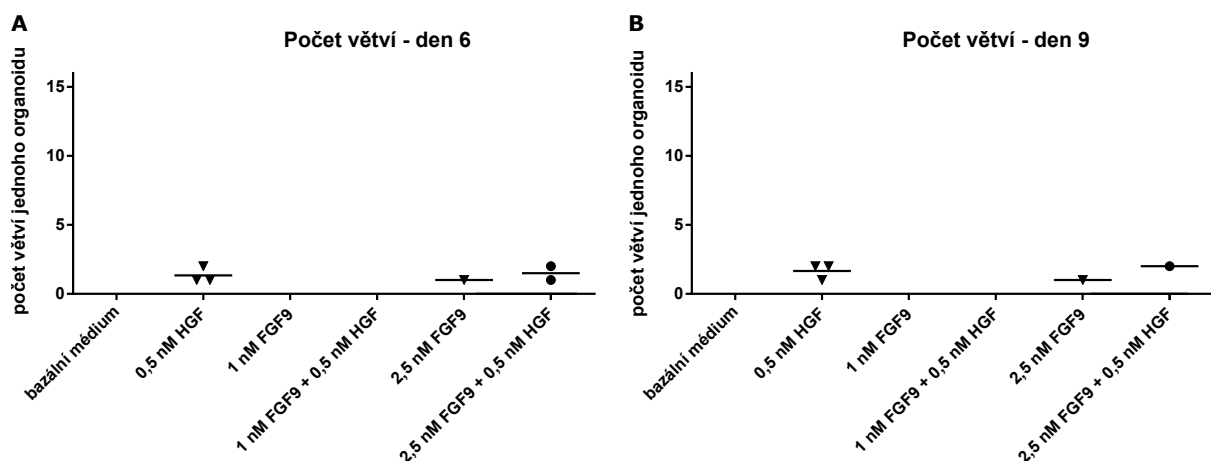
Obr. 16: Srovnání organoidů v médiu s FGF9 a kombinací s HGF. A - Celkový pohled na kulturu na konci devítidenní kultivace. Měřítka: 200 µm. B - Měřítka: 100 µm.

Velikost organoidů z médií s kombinacemi FGF9 a HGF byla asi dvakrát větší než velikost organoidů v bazálním médiu, oproti organoidům kultivovaných pouze v FGF9 či HGF se však příliš nezměnila (Graf 27). Organoidy v kombinaci 1 nM FGF9 a 0,5 nM HGF vykazovaly téměř úplnou shodu s organoidy z 0,5 nM HGF, včetně dosažení maxima v šestém dni, zároveň byla velikost srovnatelná i s organoidy z 1 nM FGF9. Organoidy v kombinaci faktorů 2,5 nM FGF9 a 0,5 nM HGF se lišily oproti organoidů kultivovaných pouze v 2,5 nM FGF9 a pouze v 0,5 nM HGF dosažením maxima už ve třetím dni. U této kombinace byla velikost organoidů od třetího dne udržována stejná, případně mírně klesala. Maximální velikost organoidů v kombinaci 2,5 nM FGF9 a 0,5 nM HGF byla rovněž mírně nižší než maximální velikosti organoidů z 2,5 nM FGF9 či 0,5 nM HGF.

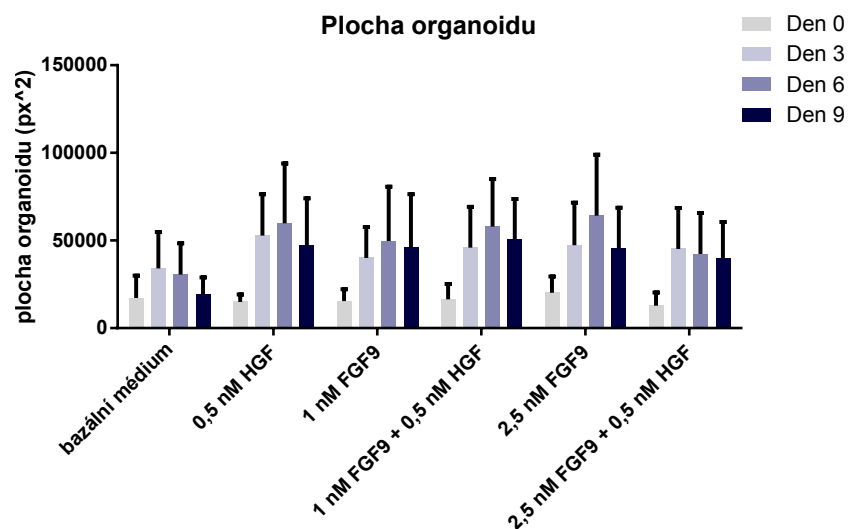
Tloušťka stěny cysty organoidů v kombinacích FGF9 s HGF byla srovnatelná nebo mírně nižší než u organoidů v 0,5 nM HGF a zároveň kopírovala trend pozorovaný u příslušné koncentrace FGF9 (Graf 28). V kombinaci 1 nM FGF9 s 0,5 nM HGF byla stěna nejtlustší třetího dne a v průběhu kultivace se ztenčovala, podobně jako tomu bylo vidět u organoidů ve většině ostatních médií a také. V 1 nM FGF9. V kombinaci 2,5 nM FGF9 se však tloušťka stěny cysty ztenčovala pouze do šestého dne a devátého dne došlo k jejímu mírnému rozšíření. Podobně tomu bylo i v kombinaci 1 nM FGF9 a 0,5 nM HGF, zde bylo však ztlustění po šestém dni markantnější.



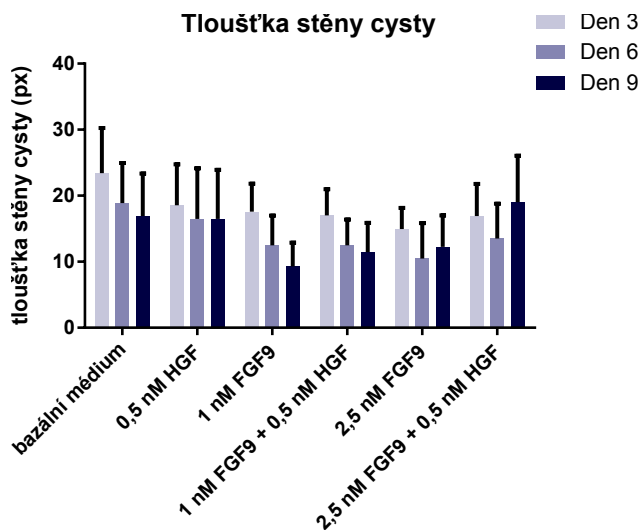
Graf 25: Větvení organoidů v médiu s FGF9 a kombinací s HGF v průběhu devíti dnů kultivace. A - den 6. B - den 9.



Graf 26: Počet větví větvených organoidů v médiu s FGF9 a kombinací s HGF v průběhu devíti dnů kultivace. A - den 6. B - den 9.



Graf 27: Plocha organoidů v médiu s FGF9 a kombinací s HGF v průběhu devíti dnů kultivace.



Graf 28: Tloušťka stěny cysty v médiu s FGF9 a kombinací s HGF v průběhu devíti dnů kultivace.

4. DISKUZE

V této práci byly učovány vlivy FGF1, FGF2, FGF7, FGF9, FGF10 a HGF na epitel mléčné žlázy. V práci bylo zjištěno, že různé růstové faktory mají rozdílný vliv na morfogenezi epitelu mléčné žlázy.

Větvení organoidů

Stimulace organoidů k větvení fibroblastovým růstovým faktorem 2 je v souladu s výsledky předchozích studií (Ewald et al., 2008). Čím vyšší koncentrace FGF2 byla v médiu přítomna, tím vyšší procento organoidů vytvořilo fenotyp větvení. Vyšší aktivita FGF2 v médiu s vyšší koncentrací tohoto faktoru byla potvrzena také nárůstem průměrného počtu větví organoidu oproti nižší koncentraci FGF2.

Přestože FGF7 dokáže stimulovat větvení během embryonálního vývoje (Sternlicht et al., 2005), měl FGF7 negativní vliv na větvení epitelu pubertálních myší. Nejenže sám větvení neindukoval, ale v kombinaci s FGF2 snižoval procento větvených organoidů. S tím korespondoval také průměrný počet větví případných větvených organoidů, který byl v kombinaci s FGF7 nižší než v samotném FGF2. Již dříve bylo ukázáno, že FGF7 má v dospělosti negativní vliv na větvení indukované $TGF\alpha$ (transformující růstový faktor α), přestože oba faktory spouští signální dráhu MAP kinázové kaskády (Fata et al., 2007). Rozdíl spočíval v délce aktivace této signální dráhy. Patnáctiminutová aktivace FGF7 zřejmě nestačila k rozvinutí větvení, zatímco $TGF\alpha$, který aktivoval signální dráhu MAPK přes jednu hodinu, stimuloval epitel k větvení (Fata et al., 2007). Vzhledem k tomu, že i FGF2 využívá při své signalizaci signální dráhu MAPK (Forsten-Williams et al., 2005), způsob zamezení větvení v kombinaci FGF7 a FGF2 může také souviset s dynamikou buněčné signalizace.

Organoidy s FGF1 vykazovaly podobnou odpověď jako s FGF7 a i zde je možné uvažovat o důsledcích dynamiky buněčné signalizace.

Podobně jako FGF7 hraje FGF10 (signalizující skrze stejný receptor) roli v prenatálním vývoji mléčné žlázy. U myší s chybějícím genem pro FGF10 nebo jeho receptor FGFR2IIIb nedojde k vytvoření mléčného pupene (Mailleux et al., 2008). V pubertální mléčné žláze však FGF10 nemá vliv na větvení epitelu (Zhang et al., 2014). Výsledky tohoto experimentu

potvrzují tuto teorii, neboť u organoidů v kultuře se samotným FGF10 nebyly vyvinuty větve a v kombinaci s FGF2 bylo dosaženo stejného výsledku jako s FGF2 samotným.

HGF sice sám větvení u organoidů nestimuloval, v kombinaci s FGF2 však zřetelně měnil fenotyp organoidů. V kombinaci HGF a FGF2 byly vzniklé větve značně delší a masivnější než v samotném FGF2. Na druhou stranu byl dříve v kolagenu typu I pozorován rozvoj větvení v odpovědi na stimulaci samotným HGF (Niranjan et al., 1995; Zhang et al., 2002). V Matrigelu se však větvení epitelu neobjevovalo, z čehož lze usoudit, že složení a tuhost ECM jsou velmi důležité činitele podílející se na celkové odpovědi epitelu na stimulaci růstovými faktory.

U FGF9 nebyl prokázán přímý vliv na větvení epitelu mléčné žlázy, z předchozích studií je však známo, že FGF9 indukuje větvení epitelu nepřímo, skrze fibroblasty mléčné žlázy (Sumbal a Koledova, 2019). Pro budoucí studium efektů FGF na morfogenezi mléčné žlázy by se tudíž jako jedna z možností nabízelo vytvořit kokultury organoidů s fibroblasty a zde účinky FGF dále zkoumat.

Růst organoidů

Pozitivní vliv na růst organoidů a proliferaci buněk byl v určité míře pozorován u všech testovaných růstových faktorů, což je v souladu s údaji uváděnými v literatuře (Imagawa et al., 1994; Fata et al., 2007; Zhang et al., 2014, Cui a Li, 2013; Niranjan et al., 1995). Největší maximální velikosti dosahovaly organoidy obvykle šestého až devátého dne, jediné HGF však vyvolávalo u organoidů skokový růst. Největší velikosti bylo mnohdy dosaženo již třetího dne kultivace.

V kombinaci faktorů s FGF2 byla velikost organoidu často srovnatelná se samotným FGF2, pouze u kombinace FGF1 a FGF2 jednoznačně převážil fenotyp organoidů stimulovaných FGF1.

Tloušťka stěny cysty

Faktory, u kterých byl jednoznačně ukázán vliv na ztenčování stěny organoidu a tvorbu cysty byly FGF9 a FGF10. U FGF9 je toto tvrzení v souladu také s tím, že v kombinaci vysokých koncentrací FGF2 a FGF9 tvořila většina organoidů větvené cysty. Při vyšší koncentraci se na

ztenčování stěny organoidu podílely také FGF1 a HGF. U FGF2 a FGF7 zůstávala tloušťka stěny přibližně stejná jako u organoidů v bazálním médiu, případně byla mírně větší.

Souvislost tloušťky stěny organoidu s rozvojem větvení

Jednou z možných souvislostí v rámci vlivu růstových faktorů na morfogenezi epitelu mléčné žlázy je souvislost tloušťky stěny s rozvojem větvení u organoidů. U organoidů s výrazně tenkou stěnou, které se vyskytovaly především při kultivaci s FGF9 a FGF10, nikdy nedocházelo k větvení. Naopak pokud se v médiu s FGF2 indukujícím větvení vytvořila cysta, jednalo se zpravidla o cystu tlustostěnnou a v průběhu kultivace mohlo dojít k jejímu vyvětvení.

Pro bližší studium tohoto fenoménu by bylo vhodné vytvořit řezy organoidů, které by byly imunofluorescenčně nabarveny. Takto by bylo možné získat data týkající se strukturního uspořádání organoidů.

ZÁVĚR

Cílem této Středoškolské odborné činnosti bylo určit vliv několika růstových faktorů, konkrétně FGF1, FGF2, FGF7, FGF9, FGF10 a HGF na epitel mléčné žlázy. Pro tyto účely byla využita 3D kultivace organoidů mléčné žlázy pubertálních myší v Matrigelu a technika pseudo time-lapse při mikroskopickém snímání živých buněk.

Bylo potvrzeno, že FGF2 má přímý vliv na rozvoj větvící morfogeneze epitelu mléčné žlázy.

FGF1 a FGF7 byly identifikovány jako faktory mající negativní vliv na větvící morfogenezi mléčné žlázy v období puberty.

FGF9, FGF10 a HGF neindukovaly větvení organoidů, ale v kombinaci s FGF2 mu ani nezabraňovaly.

FGF1, FGF2, FGF7, FGF9, FGF10 i HGF způsobovaly proliferaci buněk a růst organoidu.

FGF9 a FGF10 vytvářely tenkostěnné cysty, u kterých nedocházelo k rozvoji větvení.

Tato práce přispěla k pochopení problematiky signalizace fibroblastových růstových faktorů mléčné žlázy a jejího vlivu na epitel mléčné žlázy. Správné pochopení těchto procesů je velmi žádoucí, neboť jejich deregulace může vést ke vzniku a progresi nádorů. Výsledky práce mohou být základem ke studiu dalších vlivů růstových faktorů na morfogenezi mléčné žlázy a k porozumění celkové regulace postnatálního vývoje mléčné žlázy.

SEZNAM PRAMENŮ

Anderson, Steven M, Michael C. Rudolph, James L. McManaman a Margaret C. Neville. (2007) Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis! *Breast Cancer Research*, 9(1), 204.

Beenken, Andrew a Moosa Mohammadi. (2009) The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(3), 235-253.

Belov, A. A. a M. Mohammadi. (2013) Molecular Mechanisms of Fibroblast Growth Factor Signaling in Physiology and Pathology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(6), a015958-a015958.

Cardiff, Robert D. a Sefton R. Wellings. (1999) The Comparative Pathology of Human and Mouse Mammary Glands. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 4(1), 105-122.

Casci, T., Vinós, J., & Freeman, M. (1999). Sprouty, an intracellular inhibitor of Ras signaling. *Cell*, 96(5), 655-665.

Cowin, P. a J. Wysolmerski. (2010). Molecular Mechanisms Guiding Embryonic Mammary Gland Development: Roles in Normal Development and in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(6), a003251-a003251.

Cui, Yingjun a Qingzhang Li. (2013) Expression and Functions of Fibroblast Growth Factor 10 in the Mouse Mammary Gland. *International Journal of Molecular Sciences*. 14(2), 4094-4105.

Ewald, A. J., Brenot, A., Duong, M., Chan, B. S., & Werb, Z. (2008). Collective Epithelial Migration and Cell Rearrangements Drive Mammary Branching Morphogenesis. *Developmental Cell*, 14(4), 570–581.

Fata, Jimmie E., Hidetoshi Mori, Andrew J. Ewald, Hui Zhang, Evelyn Yao, Zena Were a Mina J. Bissell. (2007) The MAPKERK-1,2 pathway integrates distinct and antagonistic signals from TGF α and FGF7 in morphogenesis of mouse mammary epithelium. *Developmental Biology*. 306(1), 193-207.

Forsten-Williams, Kimberly, Ceres C. Chua a Matthew A. Nugent. (2005) The kinetics of FGF-2 binding to heparan sulfate proteoglycans and MAP kinase signaling. *Journal of Theoretical Biology.* 233(4), 483-499.

Gusterson, Barry A. a Torsten Stein. (2012) Human breast development. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 23(5), 567-573.

Henninghausen, Lothar a Gertraud W. Robinson. (2005) Information networks in the mammary gland. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(9), 715-725.

Hens, Julie R. a John J. Wysolmerski. (2005). Key stages of mammary gland development: Molecular mechanisms involved in the formation of the embryonic mammary gland. *Breast Cancer Research*, 7(5), a003251-a003251.

Hovey, Russell C., Josephine F. Trott a Barbara K. Vonderhaar. (2002) Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7(1), 17-38.

Howard, B. A., & Lu, P. (2014). Stromal regulation of embryonic and postnatal mammary epithelial development and differentiation. *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 25, pp. 43-51).

Hynes, N. E. a C. J. Watson. (2010) Mammary Gland Growth Factors: Roles in Normal Development and in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(8), a003186-a003186.

Imagawa, W., G.R. Cunha, P. Young a S. Nandi. (1994) Keratinocyte Growth Factor and Acidic Fibroblast Growth Factor Are Mitogens for Primary Cultures of Mammary Epithelium. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 204(3), 1165-1169.

Inman, J. L., Robertson, C., Mott, J. D., & Bissell, M. J. (2015). Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Development*, 142(6), 1028-1042.

Javed, Asma a Aida Lteif. (2013) Development of the Human Breast. *Seminars in Plastic Surgery*, 27(01), 005-012.

Koledova, Zuzana a Pengfei Lu. (2017) A 3D Fibroblast-Epithelium Co-culture Model for Understanding Microenvironmental Role in Branching Morphogenesis of the Mammary Gland. *Mammary Gland Development: Methods and Protocols*, 1501, 217-231.

Lu, P., Ewald, A. J., Martin, G. R., & Werb, Z. (2008). Genetic mosaic analysis reveals FGF receptor 2 function in terminal end buds during mammary gland branching morphogenesis. *Developmental Biology*, 321(1), 77-87.

Macias, H., & Hinck, L. (2012). Mammary gland development. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1(4), 533-557.

Mailleux, A. A., Spencer-Dene, B., Dillon, C., Ndiaye, D., Savona-Baron, C., Itoh, N., Kato, A., Dickson, C., Thiery, J. P., & Bellusci, S. (2002). Role of FGF10/FGFR2b signaling during mammary gland development in the mouse embryo. *Development*, 129(1), 53-60.

Niranjan B., Buluwela L., Yant J., Perusinghe N., Atherton A., Phippard D., Dale T., Gusterson B., Kamalati T. (1995) HGF/SF: a potent cytokine for mammary growth, morphogenesis and development. *Development*. 121(9), 2897–2908.

Ornitz, D. M., & Itoh, N. (2015). The fibroblast growth factor signaling pathway. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 4(3), 215-266.

Richert, M. M., Schwertfeger, K. L., Ryder, J. W., & Anderson, S. M. (2000). An atlas of mouse mammary gland development. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 5(2), 227-241.

Sternlicht M.D., Sunnarborg S.W., Kouros-Mehr H., Yu Y., Lee D.C., Werb Z. (2005) Mammary ductal morphogenesis requires paracrine activation of stromal EGFR via ADAM17-dependent shedding of epithelial amphiregulin. *Development*. 132(17), 3923–3933.

Sumbal, Jakub a Zuzana Koledova. FGF signaling in mammary gland fibroblasts regulates multiple fibroblast functions and mammary epithelial morphogenesis. *Development*. 2019, 146(23).

Touat, M., Ileana, E., Postel-Vinay, S., André, F., & Soria, J. C. (2015). Targeting FGFR signaling in cancer. *Clinical cancer research*, 21(12), 2684-2694.

Tsang, M. a I. B. Dawid. (2004) Promotion and Attenuation of FGF Signaling Through the Ras-MAPK Pathway. *Science Signaling*, 2004(228), pe17-pe17.

Turner, N., & Grose, R. (2010). Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nature Reviews Cancer*, 10(2), 116.

Veltmaat, J. M., Mailloux, A. A., Thiery, J. P., & Bellusci, S. (2003). Mouse embryonic mammaryogenesis as a model for the molecular regulation of pattern formation. *Differentiation*, 71(1), 1-17.

Zhang, Hong-Zheng, Jessica M. Bennett, Kyle T. Smith, Nityanand Sunil a Sandra Z. Haslam. (2002) Estrogen Mediates Mammary Epithelial Cell Proliferation in Serum-Free Culture Indirectly via Mammary Stroma-Derived Hepatocyte Growth Factor. *Endocrinology*. 143(9), 3427-3434.

Zhang, Xiuqin, Omar A. Ibrahimi, Shaun K. Olsen, Hisashi Umemori, Moosa Mohammadi a David M. Ornitz. (2006) Receptor Specificity of the Fibroblast Growth Factor Family. *Journal of Biological Chemistry*, 281(23), 15694-15700.

Zhang, X., Martinez, D., Koledova, Z., Qiao, G., Streuli, C. H., & Lu, P. (2014). FGF ligands of the postnatal mammary stroma regulate distinct aspects of epithelial morphogenesis. *Development*, 141(17), 3352–3362.