

Maitorauhasen 3D rakenteen ja soluväliaineen tutkiminen ihmisen rintakudosnäytteistä

Pro gradu -tutkielma

Turun yliopisto

Bioteknologian laitos

Biokemia

maaliskuu 2023

Ella Tammelin

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

TURUN YLIOPISTO

Biokemian laitos

TAMMELIN, ELLA: Maitorauhasen 3D rakenteen ja soluväliaineen tutkiminen ihmisen rintakudoksenäytteistä

Pro gradu -tutkielma, 49 s.

Biokemia

maaliskuu 2023

Maitorauhasen toimintaa ja kehitystä ohjaa sitä ympäröivä soluväliaine, jonka tiedetään vaikuttavan rauhasolujen kasvuun ja erilaistumiseen. Maitorauhasen soluväliainetta on kuitenkin tutkittu suhteellisen vähän, ja pääasiassa hiirellä tehdyt tutkimukset on tehty lähinnä kaksiulotteisesti. Soluväliaineen komponenttien sijainnin ja itse rauhasen haaroittumisen kannalta on kuitenkin tärkeää tarkastella kokonaisuutta kolmiulotteisesti. Lisäksi hiiren ja ihmisen maitorauhaset eroavat merkittävästi toisistaan sekä rakenteellisesti että toiminnallisesti, joten rintasyöpätutkimuksen kannalta on tärkeää tehdä tutkimusta ihmisen kudoksella. Tutkimuksessa olikin tarkoitus selvittää maitorauhasen haaroittumista ja mittasuhteita sekä soluväliaineen komponenttien sijaintia ja määrää kudoksessa ja lopulta vertailla näitä normaalin ja rintasyöpäkudoksen välillä. Ihmisen maitorauhaskudos kirkastettiin kolmiulotteista *light sheet* -mikroskopiaa varten CUBIC-kudoskirkastusmenetelmällä, minkä jälkeen kuvia analysoitiin Imaris-ohjelmalla. Lisäksi kudoksesta tehtyjä jääleikkeitä värjätettiin immunohistokemiallisesti konfokaalimikroskopiaa varten. Tulosten perusteella maitorauhasta voidaan kuvantaa kolmiulotteisesti kehitetyllä menetelmällä ja kuvista voidaan kvantitoida rauhasen haaroittumista. Lisäksi havaittiin, että soluväliaineen fibronektiiniä ilmentyy enemmän rauhasrakkuloiden kuin tiehyiden ympärillä. Kehitettyä menetelmää voidaan siis hyödyntää tulevissa tutkimuksissa maitorauhasen haaroittumisen laajempaan tutkimiseen sekä selvittämään soluväliaineen osuutta rauhasen kehityksessä. Lisäksi tämän tutkielman alustavien tulosten pohjalta voidaan lähteä selvittämään, vaikuttaako fibronektiinin sijainti tiehyiden suurempaan rintasyöpäriskiinkin rauhasrakkuloihin verrattuna.

Avainsanat: maitorauhanen, soluväliaine, fibronektiini, *light sheet* -mikroskopia

Kiitos ohjaajalleni Emilia Peuhulle mielenkiintoisesta projektista ja ohjauksesta.

Kiitos PeuhuLabille, erityisesti Markukselle teknisestä avusta ja Defnelle tuesta.

Kiitos Ciaranille avusta light sheetin kanssa.

Kiitos Rikulle henkisestä tuesta.

Sisällys

Lyhenteet	3
1. Kirjallisuuskatsaus	5
1.1 Johdanto	5
1.2 Maitorauhanen	5
1.2.1 Rakenne ja toiminta	5
1.2.2 Kehitys ja erilaistuminen	7
1.2 Rintasyöpä.....	9
1.3.1 Rintasyövän luokittelu	9
1.3.2 Rintasyövän kehittyminen	10
1.4 Soluväliaine	11
1.4.1 Soluväliaineen rakenne ja tehtävät.....	12
1.4.2 Soluväliaineen komponentit	13
1.4.3 Merkitys maitorauhasessa	14
1.4.4 Merkitys rintasyövässä.....	16
1.5 Kudospalojen kuvantaminen	17
2. Työn tavoitteet.....	21
3. Materiaalit ja menetelmät	22
3.1 Kudosnäytteet.....	22
3.2 Kudoskirkastus ja <i>light sheet</i> -mikroskopia.....	22
3.2.1 Näytteen valmistus	22
3.2.2 <i>Light sheet</i> -mikroskopia	23
3.3 Jääleikkeiden valmistus, värjäys ja kuvantaminen.....	24
3.3.1 PLP-fiksaus, OCT-pakastus ja jääleikkeet	24
3.3.2 IHC-värjäys ja kuvaus	24
4. Tulokset.....	26
4.1 Jääleikkeitä värjäämällä voidaan visualisoida maitorauhasen kaksiulotteista rakennetta	26
4.2 CUBIC-kudoskirkastus mahdollistaa ihmisen maitorauhasen kolmiulotteisen kuvantamisen <i>light sheet</i> -mikroskoopilla	29
4.3 <i>Light sheet</i> -kuvista voidaan kvantitoida maitorauhasen haaroittumista	31
4.4 Hyaluronihappo ja fibronektiini keskittyvät TDLU-yksiköiden ulommaisten rauhasrakkuloiden ympärille	32
4.5 Fibronektiiniä ilmentyy enemmän rauhasrakkuloiden kuin tiehyiden ympärillä	33
4.6 Fibronektiiniä ilmentyy enemmän rintasyöpäkudoksen rauhasrakkuloiden ympärillä kuin normaalin rintakudoksen ympärillä	35

5. Tulosten tarkastelu	38
5.1 CUBIC-menetelmä soveltuu ihmisen rintakudoksen optiseen kirkastamiseen.....	38
5.2 Ihmisen TDLU-rakenteen <i>light sheet</i> -kuvantaminen paljastaa tiehyiden mittasuhteet ..	40
5.3 Soluväliaineen fibronktiinitasot vaihtelevat ihmisen TDLU-rakenteen eri osissa	41
6. Yhteenveto	43
7. Lähteet.....	44

Lyhenteet

<u>Lyhenne</u>	<u>Suomeksi</u>	<u>Englanniksi</u>
α SMA	sileälihasaktiini alfa	alpha smooth muscle actin
BMI	painoindeksi	body mass index
BSA	naudan seerumialbumiini	bovine serum albumin
CUBIC	kirkas ja esteetön aivokuvantamisseos	clear, unobstructed brain imaging cocktails
DAPI	4',6-diamidino-2-fenyyli-indoli	4',6-diamidino-2-phenylindole
DCIS	intraduktaalinen karsinooma	ductal carcinoma <i>in situ</i>
EMT	epiteeli-mesenkyymi transiatio	epithelial to mesenchymal transition
ER	estrogenireseptori	estrogen receptor
FLASH	vasta-ainevärjättyjen elinten nopea valomikroskooppinen analyysi	fast light-microscopic analysis of antibody-stained whole organs
FN	fibronektiini	fibronectin
GAG	glykosaminoglykaani	glycosaminoglycan
HA	hyaluronihappo	hyaluronic acid
HAS2	hyaluronihapposyntaasi 2	hyaluronan synthase 2
HE	hematoksyliini-eosiini	hematoxylin-eosin
HER-2	ihmisen epidermaalisen kasvutekijän reseptori 2	human epidermal growth factor receptor 2
IDC	invasiivinen tiehytperäinen karsinooma	invasive ductal carcinoma
IGF-1	insuliinin kaltainen kasvutekijä 1	insulin-like growth factor-1
IHC	immunohistokemia	immunohistochemistry
ILC	invasiivinen rauhasrakkulaperäinen karsinooma	invasive lobular carcinoma
K8	keratiini-8	keratin-8
LCIS	intralobulaarinen karsinooma	lobular carcinoma <i>in situ</i>
LP	tietyn aallonpituuden yläpuolelta transmittoiva optinen filtti	long pass
NaCl	natriumkloridi	sodium chloride

o/n	yön yli	over night
OCT	optimaalisen leikkauslämpötilan yhdiste	optimal cutting temperature compound
PBS	fosfaattipuskuroitu suolaliuos	phosphate-buffered saline
PFA	paraformaldehydi	paraformaldehyde
PLP	perjodaatti-lysiini-paraformaldehydi	periodate-lysine- paraformaldehyde
PR	progesteronireseptori	progesterone receptor
PSF	mikroskoopin aiheuttamaa optista vääristymistä kuvaava matemaattinen funktio	point spread function
RT	huoneenlämpötila	room temperature
TDLU	ihmisen maitorauhasen toiminnallinen yksikkö	terminal ductal lobular unit
TEB	terminaalinen päätesilmu	terminal end bud

1. Kirjallisuuskatsaus

1.1 Johdanto

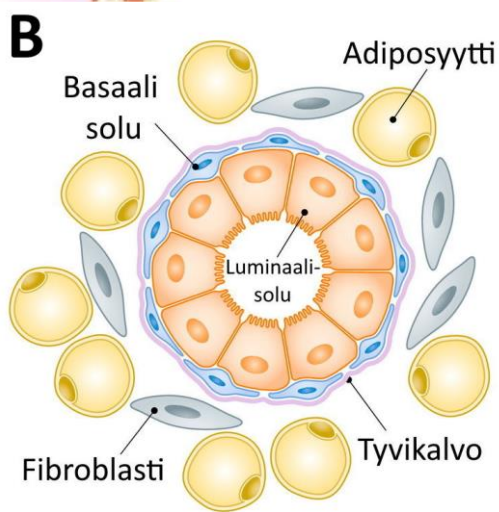
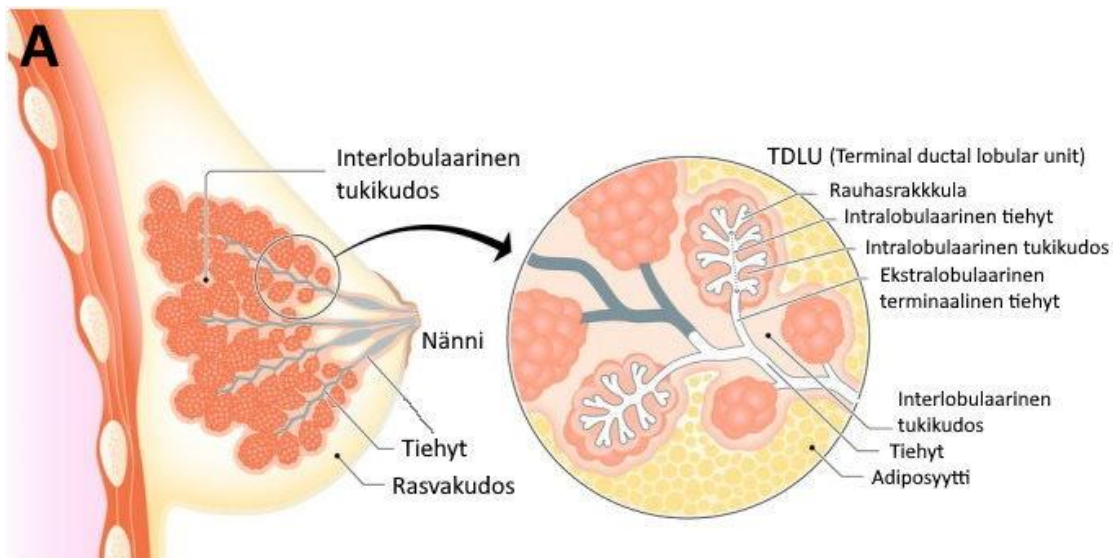
Maitorauhanen on nisäkkäiden maidontuotannosta vastaava elin, joka käy läpi suuria rakenteellisia muutoksia erityisesti raskauden ja imetyksen aikana. Soluväliaineen sisällön ja järjestäytymisen tiedetään vaikuttavan näihin muutoksiin, mutta muutosten taustalla vaikuttavia mekanismeja on vielä tutkittava tarkemmin. Näiden mekanismien ymmärtäminen on myös tärkeää pahanlaatuisten kasvaimien syntyminen ja hoitamisen kannalta.

Ihmisen maitorauhasen kolmiulotteista rakennetta ja soluväliainetta on tutkittu suhteellisen vähän, mikä on johtunut pitkälti teknisistä rajoitteista. Maitorauhaskudoksen rasvaisuus ja suuret rakenteet ovat tehneet sen kuvantamisesta haastavaa. Erilaiset kudostarkastusmenetelmät, kolmiulotteisen kuvantamisen kehittyminen sekä mikroskooppikuvien laatuun ja analysointiin vaikuttavat tietokoneohjelmat ovat kuitenkin mahdollistamassa tutkimusta.

1.2 Maitorauhanen

1.2.1 Rakenne ja toiminta

Maitorauhanen on useista eri solutyypeistä, kuten epiteelisoluista, adiposyyteistä, fibroblasteista ja immuunisoluista rakentuva avoeritteinen rauhanen. Maitorauhasen epiteeli koostuu sisemmistä luminaalisista epiteelisoluista ja ulommista basaalisista myoepiteelisoluista, jotka yhdessä muodostavat rauhasrakkuloita ja tiehyitä (kuva 1A). Rauhasrakkuloiden luminaaliset solut ovat vastuussa maidontuotannosta ja basaaliset solut sen erityksestä (kuva 1B). Basaalisten solujen supistuessa maito työntyy rauhasrakkuloista ulos tiehyisiin ja edelleen nänneihin. (Inman *et al.*, 2015)

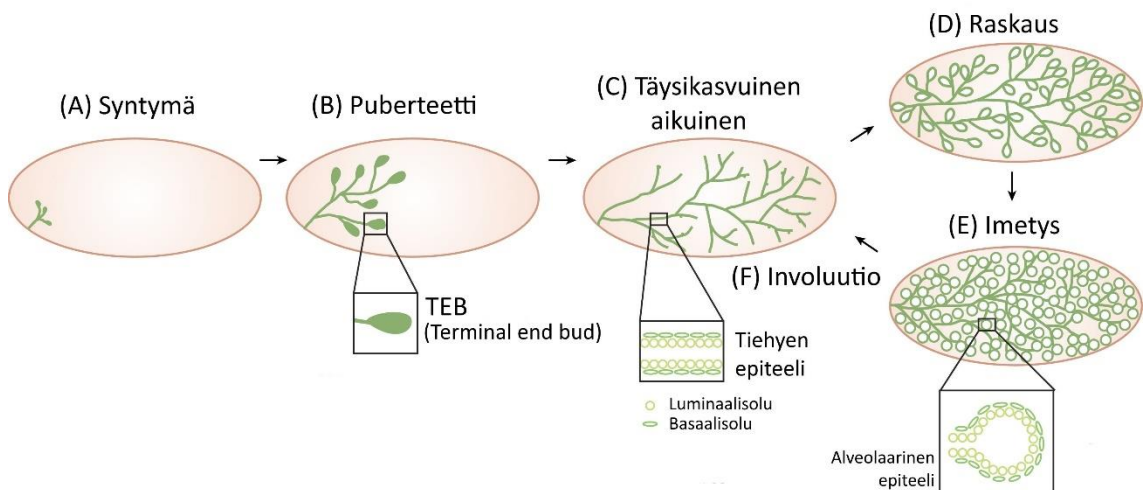


Kuva 1. (A) Ihmisen maitorauhasen rakenne koostuu tiehyistä ja rauhasrakkuloista, jotka ovat järjestäytyneet TDLU-yksiköiksi. Muokattu kuvasta: (Tharmapalan *et al.*, 2019) **(B) Maitorauhasepiteelin yleisimmän solutyypit** ovat maitoa tuottavat luminaaliset solut sekä supistuvat basaaliset solut. Poikkileikkaus maitorauhastiehyestä. Muokattu kuvasta: (Pellacani *et al.*, 2019)

Maitorauhasen epiteeli muodostuu osasta ihoa, joka työntyy ja haaroittuu rasvakudoksen sisälle. Tätä tapahtumaa säätelevät systeemiset hormonit sekä ympäröivän kudoksen solut, jotka erittävät erilaisia kasvutekijöitä. Rasvakudos sisältää myös immuunisoluja, kuten makrofageja ja eosinofiileja, sekä fibroblasteja, jotka ovat tärkeitä maitorauhasessa tapahtuvien muutosten kannalta. Fibroblastit myös erittävät muun muassa soluväliaineen komponentteja, kuten kollageeneja, proteoglykaaneja ja fibronektiiniä, jotka vaikuttavat muun muassa ympäristön jäykkyyteen. (Inman *et al.*, 2015)

1.2.2 Kehitys ja erilaistuminen

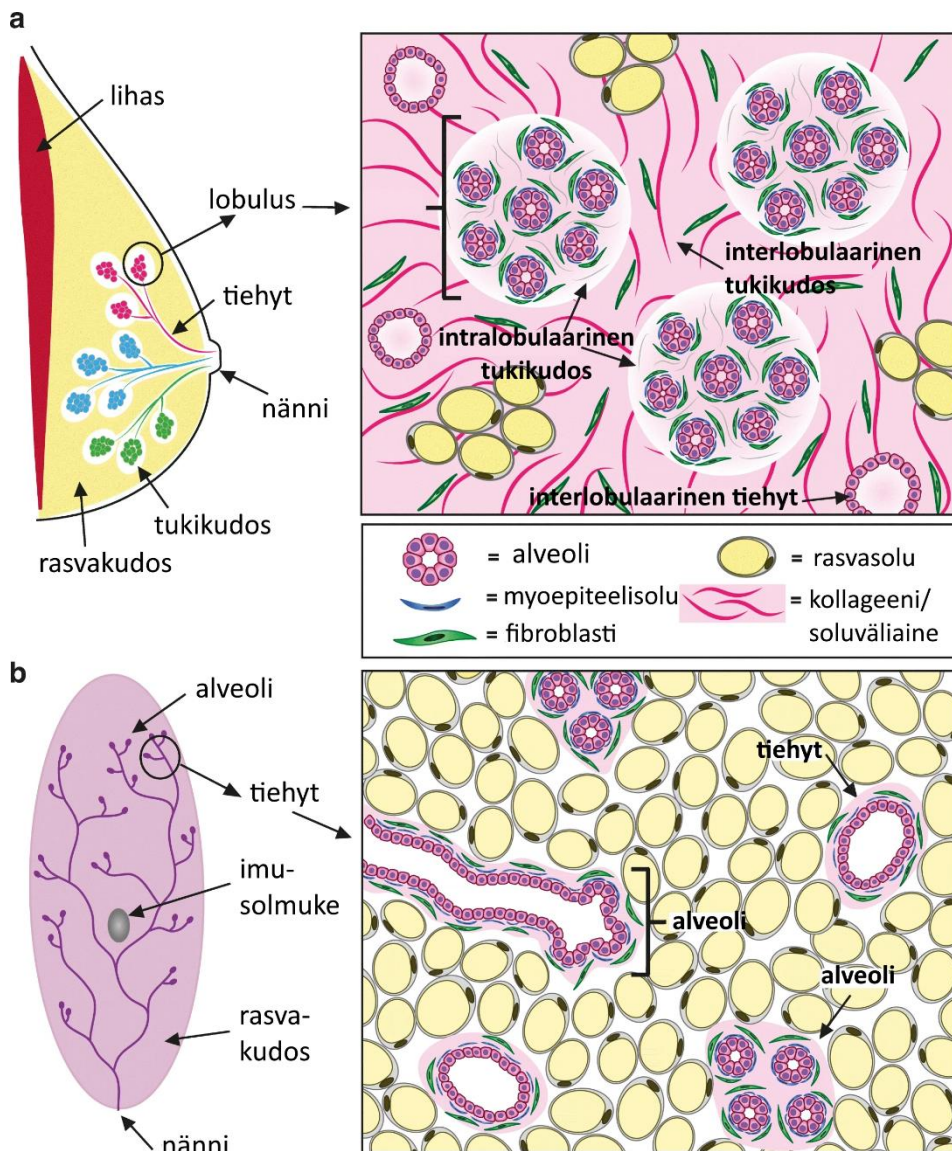
Alkeellinen maitorauhanen syntyy rasvakudoksen sisälle sikiökehityksen aikana (kuva 2A). Se koostuu vain muutamasta pienestä tiehyestä, jotka jatkavat kehitystään vasta murrosiässä (kuva 2B). Kasvuhormonin, estrogeenin ja IGF1:n (insuliinin kaltainen kasvutekijä 1, engl. *insulin-like growth factor 1*) erityks murrosiässä käynnistävät maitorauhasen haaroittumisen ja tiehyet täyttävät rasvakudoksen (kuva 2C). Raskauden aikana progesteroni ja prolaktiini saavat aikaan alveolien syntymisen (kuva 2D), jotka imetyksen aikana tuottavat maitoa (kuva 2E). Kun maitoa ei enää tarvita, maitorauhanen palaa alkuperäiseen rakenteeseensa ennen raskautta niin sanotun involuution kautta (kuva 1F). (Macias and Hinck, 2012)



Kuva 2. Maitorauhasen kehitys hiirellä. (A) alkeellinen maitorauhanen, (B) toiminnallisten yksiköiden, eli terminaalisten päätesilmujen (TEB) muodostuminen, (C) täysin haaroittunut rauhanen, (D) maitoa tuottavan epiteelin muodostuminen, (E) maidon tuotanto, (F) palautuminen ennen raskautta olleeseen rakenteeseen. Muokattu kuvasta: (Lloyd-Lewis *et al.*, 2017)

Suurin osa maitorauhasen tutkimuksesta on tehty hiirellä, mutta hiiren ja ihmisen rauhaset eroavat merkittävästi toisistaan sekä rakenteeltaan että kehitykseltään (kuva 3). Ihmisen maitorauhasen toiminnallista yksikköä kutsutaan TDLU:ksi (engl. *terminal ductal lobular unit*), joka koostuu runsaasti haaroittuneista tiehyistä, jotka päättyvät rauhasrakkuloihin. Hiiren maitorauhanen taas on lievästi haaroittunut ja toiminnalliset yksiköt ovat tiehyiden päässä sijaitsevia kantasolurikkaita rakenteita, terminaalisia

päätesilmuja (TEB, engl. *terminal end bud*) (Dontu and Ince, 2015). Ihmisen maitorauhasen soluja ympäröi erikoistunut strooma, joka koostuu kollageenista, hyaluronihaposta ja muista matriksin proteiineista (Dontu and Ince, 2015). Strooma sisältää myös erikoistuneita fibroblasteja, jotka erittävät rinnan kehitykselle tärkeitä entsyymejä ja sytokiineja (Atherton *et al.*, 1998). Hiiren maitorauhasen soluja ympäröi suoraan rasvakudos eikä sillä ole tällaista erikoistunutta stroomaa (Cardiff and Wellings, 1999).



Kuva 3. (A) Ihmisen maitorauhanen on runsaasti haaroittunut TDLU-yksiköistä rakentuva erikoistuneet strooman ympäröimä rauhanen. **(B) Hiiren maitorauhanen** on lievästi haaroittunut TEB-yksiköistä rakentuva rasvakudoksen ympäröimä rauhanen. Muokattu kuvasta: (Houthuijzen and Jonkers, 2018)

Hiiren maitorauhanen on erittäin vähän haaroittunut ennen raskautta, ja sen kehittyminen on hyvin yhtenäistä (Cardiff and Wellings, 1999). Ihmisen maitorauhanen on jo ennen raskautta erittäin haaroittunut, eikä sen kehittyminen ole synkronoitua (Gusterson and Stein, 2012). Esimerkiksi imetyksen aikana rauhasessa voi olla suuriakin rakenteita, jotka eivät tuota maitoa ollenkaan (Dontu and Ince, 2015). Raskauden aikana hiiren maitorauhanen haaroittuu laajasti, mutta palaa takaisin lievästi haaroittuneeseen rakenteeseensa imetyksen jälkeen. Ihmisen maitorauhanen taas pysyy runsaasti haaroittuneessa rakenteessaan, eikä yhtä vahvaa involuutiota nähdä kuin hiirellä. (Cardiff and Wellings, 1999)

Ihmisen maitorauhasen kolmiulotteinen rakenne vaihtelee kehitysvaiheen lisäksi myös esimerkiksi iän ja raskauden vaikutuksesta. Niiden onkin osoitettu aiheuttavan muutoksia maitorauhasen epiteelisolujen DNA-metylaatioissa, mikä vaikuttaa solujen fenotyyppiin ja toimintaan (Huh *et al.*, 2015). Lisäksi kuukautiskierron on osoitettu vaikuttavan maitorauhasepiteelin proliferaatioon (Ferguson and Anderson, 1981) sekä soluväliaineen määrään ja sijaintiin (Ferguson *et al.*, 1992). Näiden lisäksi muun muassa lasten määrä ja painoindeksi pitäisikin ottaa huomioon tutkimuksia tehtäessä.

1.2 Rintasyöpä

Suurin osa rintasyövistä on karsinomia, eli ne ovat lähtöisin tiehyiden tai rauhasrakkuloiden epiteelisoluista. On myös olemassa muualta rinnasta kehittyneitä syöpiä, kuten tukikudosperäiset sarkoomat ja imusolmukeperäiset lymfoomat.

1.3.1 Rintasyövän luokittelu

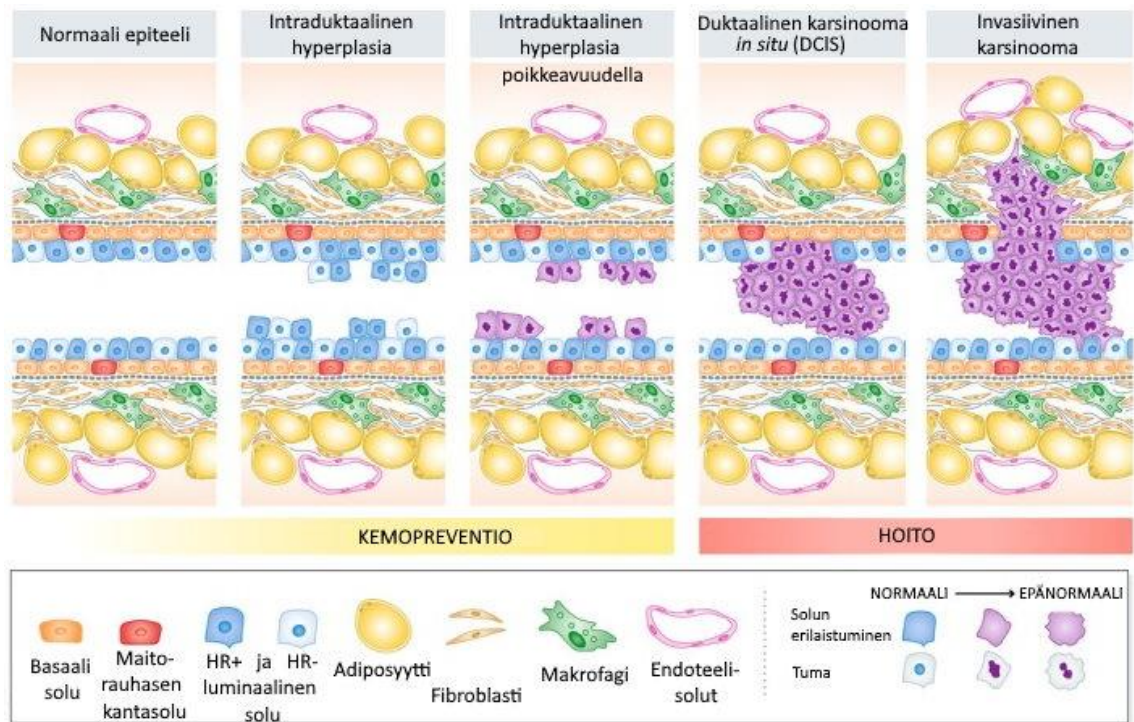
Rintasyövät voidaan jakaa kahteen eri tyyppiin sen perusteella, ovatko ne levinneet ympäröivään kudokseen (invasiivinen) vai eivät (ei-invasiivinen). DCIS (engl. *ductal carcinoma in situ*) eli intraduktaalinen karsinoma on tiehyen epiteelisoluista lähtöisin oleva ei-invasiivinen rintasyöpätyyppi. Syöpäsolut eivät siis ole levinneet, minkä takia DCIS luokitellaankin syövän esiasteeksi, mutta hoitamattomana syöpäsolut voivat ajan myötä kehittyä ja muodostaa invasiivisen syövän. Rauhasrakkuloista peräisin olevaa ei-invasiivista karsinomiaa, LCIS (engl. *lobular carcinoma in situ*) ei yleisesti luokitella

rintasyöpätyypiksi, vaan se kertoo potilaan suuremmasta riskistä saada rintasyöpä tulevaisuudessa. Siksi sitä kutsutaankin usein neoplasiaksi, eli epänormaalien solujen kertymäksi, eikä karsinoomaksi. (Akram *et al.*, 2017)

Invasiivinen tiehytperäinen karsinooma, IDC (engl. *invasive ductal carcinoma*) on yleisin rintasyöpätyyppi. Syöpäsolut ovat kehittyneet tiehyiden epiteelisoluista, josta ne ovat levinneet tiehyiden sisältä ympäröivään kudokseen. ILC (engl. *invasive lobular carcinoma*) taas on rauhasrakkuloiden epiteelisoluista levinnyt rintasyöpätyyppi. IDC:n ennusteen ja hoidon määrittämiseen käytetään laajasti ER (engl. *estrogen receptor*), PR (engl. *progesterone receptor*) ja HER-2 (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*) immunohistokemiallisia leimauksia. ER-positiivisen rintasyövän solut sisältävät estrogeenireseptoreja, PR-positiivisen progesteronireseptoreja ja HER-2-positiivisen normaalia enemmän syöpäsolujen kasvua edistävää HER-2-proteiinia, joten näissä tapauksissa syöpää voidaan hoitaa estämällä estrogeeni-/progesteronihormonin/HER-2-proteiinin vuorovaikutusta reseptorinsa kanssa. (Akram *et al.*, 2017)

1.3.2 Rintasyövän kehittyminen

Rintasyövän kehittymiseen vaikuttavat monet eri tekijät kuten perimä, hormonaaliset tekijät, elintavat ja ympäristö, joiden vuoksi maitorauhasen soluihin kertyy ajan myötä mutaatioita. Jos nämä mutaatiot vaikuttavat esimerkiksi apoptoosiin tai solunjakautumiseen, voi solu alkaa jakautua hallitsemattomasti muodostaen tiehyen tai rauhasrakkulan sisään ei-invasiivisen kasvaimen, joka täyttää luumenin (kuva 4). Syöpä muuttuu invasiiviseksi, jos syöpäsolut kykenevät leviämään tiehyestä tai rauhasrakkulasta ympäröivään kudokseen. Invasiivinen rintasyöpä voi levitä rintakudoksesta edelleen imusolmukkeisiin, joiden kautta voi muodostua etäpesäkkeitä muualle elimistöön. (Akram *et al.*, 2017)



Kuva 4. Rintasyövän kehittyminen alkaa hallitsemattomasta solunjakautumisesta, joka synnyttää lumeniin ei-invasiivisen kasvaimen. Syöpäsolujen levitessä ympäröivään kudokseen puhutaan invasiivisesta syövästä. Muokattu kuvasta: (Tharmapalan *et al.*, 2019)

1.4 Soluväliaine

Soluväliaineen tärkeä tehtävä on tukea sitä ympäröivää kudosta. Erilaiset soluväliaineen komponentit, kuten proteiinit, proteoglykaanit ja glykoproteiinit toimivat tarttumapintana solun pintareseptoreille, jotka edelleen välittävät viestejä solun sisään tai sieltä ulos. Nämä tarttumakohdat eli adheesiot vaikuttavat muun muassa solujen selviytymiseen, erilaistumiseen ja migraatioon. Soluväliaineen signalointi on tarkasti säädelty normaalin maitorauhasen kehityksen aikana, koska sillä on tärkeä rooli yksilönkehityksen, murrosiän, raskauden ja involuution aikana tapahtuvien muutosten kannalta. Virheet soluväliaineen toiminnassa voivatkin edesauttaa pahanlaatuisten kasvaimien syntymistä. (Zhu *et al.*, 2014)

1.4.1 Soluväliaineen rakenne ja tehtävät

Soluväliaine on erilaisten solunsisäisten rakenteiden välityksellä yhteydessä tumaan asti. Solun pinnalla on reseptoreja, jotka voivat tarttua soluväliaineeseen. Erilaiset reseptorit tarttuvat eri soluväliaineen komponentteihin, esimerkiksi solun yleisimmistä pintareseptoreista integriineistä $\alpha1\beta1$ sitoutuu kollageeniin, mutta $\alpha3\beta1$ laminiiniin. Integriinit ovat erilaisten adaptor- ja signaalointiproteiinien välityksellä yhteydessä myös solun aktiinitukirankaan, joka on edelleen erilaisten proteiinien välityksellä yhteydessä tumakalvoon (engl. *nuclear lamina*). Näin soluväliaineeseen tarttumisesta ja siihen kohdistuvien vetovoimien kautta välittyvä mekaaninen voima siirtyy tumaan asti aiheuttaen muutoksia muun muassa tumakalvon läpäisevyydessä tai kromatiinirakenteessa, mikä edelleen vaikuttaa geenien transkriptioon ja lopulta muuttaa solun käyttäytymistä. (Isomursu *et al.*, 2019)

Soluväliaineella on tärkeä rooli sekä yksilönkehityksen että kudoksen arkkitehtuurin ylläpitämisen kannalta. Se ei pelkästään anna tukea kudokselle vaan myös ohjaa solujen kasvua, erilaistumista ja migraatiota sekä tarjoaa niille tarttumapinnan, mikä on useimpien solujen selviytymisen kannalta välttämätöntä. Soluväliaine sisältää lukuisia rakenteeltaan erilaisia komponentteja, jotka aktivoivat reseptorien välittämiä, solun kasvua, jakautumista, liikkumista ja selviytymistä sääteleviä signaalipolkuja. Lisäksi niiden eri tavoin välittämät mekaaniset voimat määrittävät solun vasteen kasvutekijöihin ja sytokiineihin ja näin ohjaavat solun kohtaloa. (Kass *et al.*, 2007)

Soluväliaineet voidaan jaotella kahteen ryhmään, jotka eroavat toisistaan rakenteeltaan ja komponenteiltaan; solujen välissä oleviin (engl. *interstitial matrix*) ja solua ympäröiviin soluväliaineisiin (engl. *pericellular matrix*). Jälkimmäiseen ryhmään kuuluu muun muassa epiteeli- ja tukikudoksen välissä sijaitseva tyvikalvo (engl. *basement membrane*), joka on signaaloinnin ja rakenteen kannalta tärkeää tukea antava soluväliainetyyppi. Yleisiä komponentteja, joista tyvikalvo koostuu, ovat muun muassa kollageeni ja laminiini. (Theocharis *et al.*, 2016)

1.4.2 Soluväliaineen komponentit

Soluväliaineen rakenteeseen ja ominaisuuksiin vaikuttaa se, millaisista komponenteista se koostuu. Solut vuorovaikuttavat pintareseptoriensa avulla niitä ympäröivän soluväliaineen komponenttien kanssa, ja nämä vuorovaikutukset ohjaavat solun käyttäytymistä ja toimintaa. Täten soluväliaineen koostumus ja rakenne ovat suoraan yhteydessä soluun ja siinä tapahtuviin muutoksiin. (Theocharis *et al.*, 2016)

Proteoglykaanit ovat tärkeitä kudosten rakennetta ja toimintaa tukevia komponentteja, joita löytyy solujen sisältä ja pinnalta sekä soluväliaineesta. Ne muodostuvat ydinproteiinista ja siihen kovalenttisesti sitoutuneista glykosaminoglykaaniketjuista (GAG), jotka koostuvat erilaisista disakkarideista. Erilaiset GAG-ketjut tekevät proteoglykaaneista erittäin heterogeenisen ryhmän, mikä mahdollistaa vuorovaikutuksen lukuisten kasvutekijöiden, sytokiinien, kemokiinien, solun pintareseptorien ja muiden soluväliaineen komponenttien kanssa. Proteoglykaanit osallistuvatkin muun muassa solujen signalointiin, jakautumiseen, migraatioon, erilaistumiseen, apoptoosiin, adheesioihin ja soluväliaineen järjestäytymiseen. (Theocharis *et al.*, 2010)

Hyaluronihappo on lineaarinen N-asetyyli-D-glukosamiini- ja D-glukuronihappoyksiköistä rakentuva GAG, joka syntetisoidaan solukalvolla, toisin kuin muut Golgin laitteessa syntetisoitavat GAG:t. Sitä esiintyy soluväliaineessa sekä vapaana, että kiinnittyneenä proteoglykaaneihin. Hyaluronihappo pystyy sitomaan itseensä suuria määriä vettä, minkä takia sitä esiintyykin erityisesti uudelleenjärjestäytyvissä kudoksissa esimerkiksi yksilönkehityksen aikana. (Theocharis *et al.*, 2016)

Kollageenit ovat pääosin fibroblastien syntetisoimia ja erittämiä soluväliaineen komponentteja, jotka koostuvat erilaisista polypeptidiketjuista. Erilaisia kollageenityyppejä on yhteensä 28, jotka voidaan jakaa rakenteensa ja ominaisuuksiensa perusteella seitsemään ryhmään. Näistä yleisimpiä osat säiemäiset (engl. *fibrillar*) sekä verkostoja muodostavat (engl. *network-forming*) kollageenit. Säiemäiset kollageenit (tyypit I, II, III, V, XI, XXIV ja XXVII) tuovat kudoksiin vetolujuutta, ja vaikuttavat muun muassa solumigraatioon, ja -adheesioon, angiogeneesiin sekä kudosten kehitykseen ja korjaukseen. Verkostoja muodostavat kollageenit (tyypit IV, VIII

ja X) ovat joustavia ja pystyvät vuorovaikuttamaan toistensa ja muiden soluväliaineen komponenttien kanssa muodostaen laajoja verkostoja. (Kadler *et al.*, 2007)

Laminiinit ovat glykoproteiineja, eli proteiineja, joihin on liittynyt hiilihydraattiryhm(i)ä, ja ne muodostavat tärkeän osan tyvikalvoa. Ne koostuvat kolmesta ketjusta, joiden perusteella ne nimetään, esimerkiksi laminiini-111 rakentuu α 1, β 1 ja γ 1 ketjuista. Laminiinit vuorovaikuttavat toistensa ja muiden soluväliaineen komponenttien kanssa vaikuttaen soluväliaineen järjestäytymiseen ja soluadheesioon. Niillä on myös vaikutus solujen erilaistumiseen ja migraatioon. Ne ovat myös välttämättömiä kudosten kunnossapidon ja selviytymisen kannalta auttamalla vaurioituneen epiteelin korjauksessa. Laminiineilla on myös tärkeä rooli varhaisessa yksilönkehityksessä ja organogeneesissä. (Durbeej, 2010)

Fibronectiini on pääosin fibroblastien tuottama glykoproteiini, joka saa toiminnallisen säiemäisen muotonsa, kun se eritetään solun ulkopuolelle. Fibronectiini voi vuorovaikuttaa muun muassa integriinien ja kollageenien kanssa, ja sillä onkin tärkeä rooli muun muassa solujen adheesiossa, kasvussa, migraatiossa ja erilaistumisessa. Fibronectiini on myös välttämätön yksilönkehityksen kannalta. (Theocharis *et al.*, 2016)

1.4.3 Merkitys maitorauhasessa

Solväliaineen sisältö ja järjestäytyminen vaikuttaa maitorauhasen solujen kasvuun, migraatioon ja erilaistumiseen, joten soluväliaineen signaloinnin säätely on erityisen tärkeää normaalin maitorauhasen kehityksen ja toiminnan kannalta (Zhu *et al.*, 2014). Soluväliaineessa tapahtuvat muutokset vaikuttavat muun muassa maitorauhasen epiteelisolujen hormonivasteeseen, mikä edelleen ohjaa tiehyiden haaroittumista murrosiässä, rauhasrakkuloiden muodostumista raskauden aikana ja involuutiota eli rauhasen palautumista ennen raskautta olleeseen muotoonsa (Kass *et al.*, 2007).

Tiehyiden haaroittumisen kannalta erittäin tärkeä soluväliaineen komponentti maitorauhasessa on tyypin I kollageeni, jonka orientaatio saattaa ohjata epiteelisolujen migraatiota ja invaasiota tässä prosessissa (Brownfield *et al.*, 2013). Myös fibronectiinin määrä soluväliaineessa kasvaa tämän murrosiässä tapahtuvan tiehyiden haaroittumisen aikana (Woodward *et al.*, 2001). Tyvikalvon komponenteista tyypin IV kollageeni,

laminiini ja hyaluronihappo ovat myös tärkeitä. Muodostuvan tiehyen kärjessä sijaitseva tyvikalvo on ohuempi ja epäyhtenäinen ja sen on havaittu sisältävän erityisen paljon hyaluronihappoa, toisin kuin tiehyttä ympäröivän tyvikalvon, joka koostuu pääosin tyypin IV kollageenista, laminiinista ja proteoglykaaneista (Fata, Werb and Bissell, 2004). Lisäksi tyvikalvo ja erityisesti sen sisältämä laminiini-111 on välttämätön kehittyneen maitorauhasen epiteelisolujen polaaraisuutta ylläpitävä komponentti, mikä on havaittu ihmisen kudoksella tehdyistä tutkimuksista (Gudjonsson *et al.*, 2002).

Maitorauhasen rakenteessa tapahtuu dramaattisia muutoksia raskauden, imetyksen ja involuution aikana. Näiden muutosten kannalta tärkeitä komponentteja ovat integriinit, jotka ovat solujenvälisiä tai solujen ja soluväliaineen välisiä adheesioita välittäviä transmembraaneja reseptoreita (Hynes, 2002). Integriinit ovat dimeerejä, joiden α - ja β -alayksiköt määrittävät, mihin ligandiin ne voivat solunulkoisilla osillaan kiinnittyä aiheuttaen solun sisällä erilaisten signaalireittien aktivoitumisen. Integriinit $\alpha 5\beta 1$ (fibronektiinireseptori), $\alpha 2\beta 1$ (kollageeni- ja laminiinireseptori) ja $\alpha v\beta 3$ (vitronektiinireseptori) ovat raskauden aikana tärkeitä tekijöitä maitorauhasen rauhasrakkuloiden muodostumisen kannalta (Woodward *et al.*, 2001). Muodostuneiden rauhasrakkuloiden tyvikalvossa oleva laminiini ja siihen sitoutuvat integriinit ($\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 6\beta 1$) taas ovat myös imetykselle välttämättömiä komponentteja, sillä ne vastaavat maitoa tuottavien epiteelisolujen erilaistumisesta ja niissä tapahtuvasta maitoproteiinin ilmentymisestä (Keely, Wu and Santoro, 1995; Xu *et al.*, 2009). Myös fibronektiinin määrä maitorauhasen soluväliaineessa on korkea raskauden ja imetyksen aikana (Woodward *et al.*, 2001). Involuutio taas johtaa säikeisen kollageenin määrän kasvuun, sekä laminiinin ja tyypin IV kollageenin hajotukseen (Schedin *et al.*, 2007).

Soluväliaine on keskeisessä osassa normaalia maitorauhasen kehitystä ja toimintaa, joten siinä tapahtuvat häiriöt voivatkin edistää pahanlaatuisten kasvainten syntyä. Tyypillisesti nämä häiriöt johtavat tyvikalvon hajoamiseen ja soluväliaineen jäykistymiseen, mikä edelleen lisää solujen kasvua, häiritsee kudostekennettä sekä edistää solujen invaasiota ja selviytymistä (Kass *et al.*, 2007).

1.4.4 Merkitys rintasyövässä

Soluväliaineen signaloinnissa tapahtuvat häiriöt voivat johtua muun muassa muutoksista soluväliaineen komponenteissa, niiden suhteissa ja rakenteessa tai niihin sitoutuvien reseptorien ilmentymisessä. Nämä muutokset voivat johtaa siihen, että soluväliaineen säätely ei toimi normaalisti, mikä voi lisätä sen määrää soluväliaineessa. Esimerkiksi kollageenin, fibronektiinin ja hyaluronihapon lisääntyneen määrän on todettu edistävän pahanlaatuisten kasvainten kehittymistä maitorauhasessa (Oskarsson, 2013). Mainitut komponentit ovat yleisiä myös involuutiassa, mikä voikin osin selittää raskauden ja hetkellisesti kasvaneen rintasyöpäriskin välisen yhteyden (Schedin, 2006). On myös havaittu, että lisääntynyt soluväliaineen geeniekspressio voi huonontaa ennustetta rintasyöpäpotilailla (Jinga *et al.*, 2006).

Rintasyöpäkasvaimen yleinen tuntomerkki on jäykempi kudoserakenne verrattuna ympäröivään terveeseen kudokseen (Huang and Ingber, 2005). Tärkeä kudoksen jäykkyyttä lisäävä tekijä on kollageeni ja sen muodostamat yhteydet toisiin soluväliaineen komponentteihin (Paszek and Weaver, 2004). Jäykempi maitorauhaskudos vaikuttaa muun muassa epiteelisolujen muotoon ja jakautumiseen (Emerman *et al.*, 1977), mikä edelleen edistää kasvainten kehittymistä (Paszek *et al.*, 2005). Lisääntynyt kollageeni myös heikentää tyvikalvoa, joka estää syöpäsolujen invaasiota eli leviämistä ympäröivään kudokseen (Provenzano *et al.*, 2008). Jos syöpäsolu pääsee tyvikalvon läpi, se käyttää kollageenisäikeitä tarttumapintana liikkuessaan kohti verisuonia, joiden kautta se voi metastasoida eli muodostaa etäpesäkkeitä muualle kehoon (Condeelis and Segall, 2003).

Kudoksen jäykkyydestä johtuvaan epiteelisolujen lisääntymiseen vaikuttaa lisäksi fibronektiinin määrä, jonka kerääntyminen myös läheisen veri- ja imusuoniston ympärille edistää ihmisellä kasvaimen kehittymistä (Theocharis *et al.*, 2016). Fibronektiini on lisäksi osa niin sanottua EMT (engl. *epithelial to mesenchymal transition*) prosessia, jossa epiteelisolut muuttuvat enemmän mesenkymaaliseksi (Park and Schwarzbauer, 2014). EMT:ssä epiteelisolujen polaaraisuus ja solujen väliset adheesiot heikkenevät, mikä edistää solumigraatiota, invaasiota ja metastasointia (Kalluri and Weinberg, 2009).

Hyaluronihapon määrässä on myös havaittu merkittävä kasvu rintasyöpäkudoksissa. Erityisesti tietyn hyaluronihapon biosynteesiin tarvittavan entsyymin (HAS2, engl. *hyaluronan synthase 2*) on osoitettu ihmisellä edistävän kasvaimen etenemistä ja metastaasia (Okuda *et al.*, 2012), ja vastaavasti inhiboinnin hidastavan sitä (Udabage *et al.*, 2005). Hyaluronihapon määrä saattaa myös olla yhteydessä rintasyövän ennusteeseen (Auvinen *et al.*, 2013).

Laminiinit ovat tärkeitä kudorganisaatiota ylläpitäviä soluväliaineen komponentteja. Niistä laminiini-111 on tärkeä osa tyvikalvoa, ja sen määrän onkin havaittu ihmisellä vähenevän kasvaimen kehittyessä (Gudjonsson *et al.*, 2002). Muiden tyvikalvon komponenttien ja solun pintareseptoreiden kanssa vuorovaikuttava laminiini-332 taas edistää syöpäsolujen migraatiota, invaasiota ja selviytymistä ihmisen rintakudoksessa (Kwon *et al.*, 2012). Lisäksi metastaasia edistävä laminiini-511 on yhteydessä syövän asteeseen (Pouliot and Kusuma, 2013). Tietyillä laminiinin alayksiköillä (laminiini-111, -211 ja -411) näyttää myös olevan yhteys syövän aggressiivisuuteen ja huonoon potilasennusteeseen (Bergamaschi *et al.*, 2008).

Soluväliaineen komponenttien ei ole ainoastaan huomattu edistävän kasvaimen kehittymistä vaan myös huonontavan syövän hoitovastetta, ja tätä kautta laskevan ennustetta (Jinga *et al.*, 2006). Tyypin I kollageeni ja hyaluronihappo lisäävät syöpäsolujen resistenttiyttä kemoterapialle (Misra, Ghatak and Toole, 2005; Said *et al.*, 2012), laminiini-332 kohdennetuille terapioille (Yang *et al.*, 2010) sekä fibronektiini ja laminiini sädehoidolle (Cordes *et al.*, 2003). Soluväliaineen komponenttien inhibointi voi mahdollisesti hidastaa kasvaimen kehittymistä (Urakawa *et al.*, 2012). Tällaisia eri komponentteja inhiboivia lääkkeitä kehitetään parhaillaan, mutta soluväliaineen toiminta ja signalointi on niin laaja käsite, että sitä pitää tutkia ja ymmärtää vielä paremmin, ennen kuin tällaisia lääkkeitä voidaan käyttää rintasyövän hoidossa.

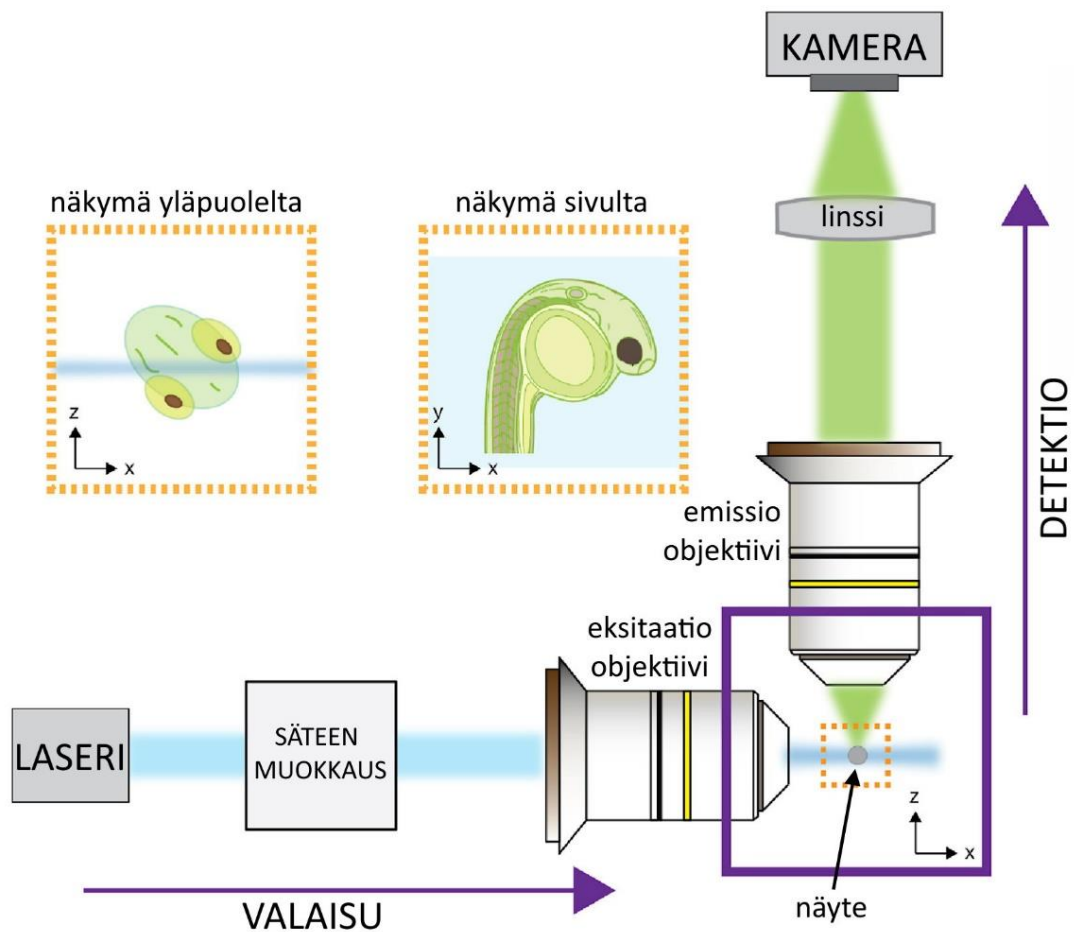
1.5 Kudospalojen kuvantaminen

Kolmiulotteisten näytteiden, kuten kokonaisten kudosten tai kudospalojen kuvantaminen on vaikeaa verrattuna esimerkiksi kudospaloista tehtyjen jääleikkeiden kaksiulotteiseen kuvantamiseen. Kuvantamista vaikeuttavat muun muassa

autofluoresenssi, valon sironna sekä erilaiset endogeeniset pigmentit. Esimerkiksi mitokondrio ja lysosomi emittoivat luonnollisesti absorboimaansa valoa, mitä kutsutaan autofluoresenssiksi, ja aiheuttavat näin ylimääräistä signaalia kuvantamiseen. Endogeeniset pigmentit, kuten hemi taas absorboivat voimakkaasti valoa häiriten kuvantamista. Koska kudoksesta koostuu erilaisista rakenteista, joilla on erilainen taitekerroin, valo siroaa ja kuvantaminen on hankalaa. Siksi kolmiulotteisessa kuvantamisessa täytyykin näytteen valmisteluun käyttää paljon enemmän aikaa kuin kaksiulotteisessa kuvantamisessa. Kudoksesta täytyy homogenisoida kudoksesta kirkastusmenetelmällä sironnan vähentämiseksi, mutta kirkastuksessa käytettävät reagenssit eivät saa vaikuttaa tutkittavien molekyylien määrään tai hajottaa niitä. Tutkittavien rakenteiden värjäyksessä täytyy varmistaa, että reagenssit pääsevät syvälle kudokseen eivätkä jää vain pintarakenteisiin. Lisäksi kolmiulotteisten rakenteiden kuvaaminen ja datan analysointi vievät yleensä enemmän aikaa kaksiulotteiseen verrattuna. (Tainaka *et al.*, 2016)

Rasvaisuutensa takia maitorauhaskudos pitää ennen kuvantamista kirkastaa optisen näkyvyyden parantamiseksi, jotta immunofluoresenssi-signaali saadaan detektoitua riittävän syvältä kudoksesta. Tässä tutkimuksessa kudoksesta kirkastusmenetelmäksi valittiin CUBIC (engl. *clear, unobstructed brain imaging cocktails*), joka on nimensäkin perusteella alun perin kehitetty aivojen kuvantamiseen, mutta sitä on käytetty myös hiiren maitorauhasen kirkastamiseen tehokkaan rasvanpoiston ansiosta (Susaki *et al.*, 2014). Kudoksesta kirkastuksen periaatteena on saada koko näytteen taitekerroin samaksi, jolloin kuvannettaessa havaitaan vain värjäytyt rakenteet (Richardson and Lichtman, 2015). Rasvan taitekerroin on suurempi ja veden pienempi kuin proteiinien, minkä takia kirkastuksen ensimmäisessä vaiheessa rasva poistetaan ja toisessa vaiheessa vesi korvataan korkeamman taitekerroimen liuoksella. CUBIC-menetelmän rasvanpoistovaiheesta vastaa CUBIC-1-reagenssin Triton-X100-detergentti. Lisäksi reagenssin natriumkloridi estää kudoksen turpoamista, urea permeabilisoi kudoksen ja Quadrol-reagenssi (engl. *N,N,N',N'-tetrakis[2-hydroxypropyl]ethylenediamine*) estää verisuonten näkymistä kuvannettaessa sitoutumalla hemoglobiinin hemiryhmään. Kirkastuksen ensimmäisen vaiheen jälkeen kudoksesta värjätään vasta-aineilla, ja toisen vaiheen veden korvauksesta vastaa sakkaroosi, joka saa CUBIC-2-reagenssin taitekerroimen nousemaan 1,49:ään. (Susaki *et al.*, 2014)

Light sheet -mikroskopia perustuu kahteen objektiiviin, joista toinen vastaa eksitaatio- ja toinen emissiovalosta (kuva 5). Ensimmäisestä tuleva valo virittää näytteen fotonit ohuen tason alueelta, ja toinen kerää tältä tasolta tulevan emissiovalon. Toisin kuin konfokaalimikroskoopissa, jossa koko näyte valaistetaan, mutta vain tietyltä tasolta tuleva emissiovalo kerätään *pinhopen* avulla, *light sheet* -mikroskoopissa vain ohut taso valaistetaan kerralla, jolloin fototoksisuus vähenee ja näytettä voidaan kuvata kauemmin ennen fluoresenssin häviämistä. *Light sheet* -mikroskopiassa näytettä kuvataan liuoksessa, joten mahdollisimman hyvän optisen näkyvyyden saavuttamiseksi tässä tutkimuksessa näyte kiinnitettiin näytepitimeen CUBIC-2-reagenssiin liuotetulla agarosilla ja kuvattiin CUBIC-2-reagenssissa. (Reynaud *et al.*, 2008)



Kuva 5. *Light sheet* -mikroskopia perustuu kahteen objektiiviin, jotka ovat toisiaan vasten 90 asteen kulmassa: eksitaatio-objektiivi valaisee näytteestä ohuen tason ja emissio-objektiivi kerää tasolta tulevan valon. Muokattu kuvasta: (Ricci *et al.*, 2022)

Optisen vääristymisen vähentämiseksi mikroskooppikuville voidaan tehdä dekonvoluutio. Mikroskoopin aiheuttamaa optista vääristymistä kuvaa matemaattinen funktio, *point spread function* (PSF). Tämä vääristyminen määritetään kuvaamalla fluoresoivia helmiä, joiden avulla saadaan selville kuvaussysteemin PSF. Tämän funktion avulla kuvien optista vääristymistä poistetaan, ja saadaan selvempiä kuvia. (Reynaud *et al.*, 2008)

2. Työn tavoitteet

Maitorauhasen kehityksen tutkimus on keskittynyt pääosin hiirillä tehtäviin kokeisiin, mutta ihmisen ja hiiren rauhaset eroavat merkittävästi toisistaan muun muassa rakenteeltaan. Tämän takia maitorauhasta haluttiin tutkia potilaista eristetyistä kudospaloista. Tavoitteena oli kuvantaa uudella tavalla ihmisen maitorauhasen rakennetta kolmiulotteisesti *light sheet* -mikroskopian avulla. Kuvantamista varten pyrittiin myös optimoimaan kirkastusmenetelmä ihmisen rintakudokselle immunofluoresenssisignaalin optisen havainnoinnin parantamiseksi. Saaduista mikroskooppikuviista haluttiin lisäksi kvantitoida maitorauhasen tiehyiden haaroittumista, sekä selvittää iän, synnytyksen määrän ja kuukautiskierron vaikutusta haaroittumiseen.

Maitorauhasen kolmiulotteisen rakenteen lisäksi tavoitteena oli tutkia ympäröivää soluväliainetta. Soluväliaineen tiedetään vaikuttavan maitorauhasen solujen kasvuun ja erilaistumiseen, mutta sen eri komponenttien sijainnista tai määrästä rauhasen eri osissa ei kuitenkaan ole tarkkaa tietoa kolmiulotteisista näytteistä. Tämän takia haluttiin rintakudospaloista värjätä soluväliaineen eri komponentteja sekä vertailla niiden määriä tiehyiden ja rauhasrakkuloiden ympärillä.

Ihmisen normaalin rintakudoksen tutkiminen on tärkeää, kun pyritään ymmärtämään rinnan pahanlaatuisissa kasvaimissa tapahtuvia muutoksia ja niiden mekanismeja. Viimeisenä tavoitteena olikin verrata normaalin rintakudoksen rakennetta ja sitä ympäröivän soluväliaineen määrää ja sijaintia rintasyöpäkuokseen.

3. Materiaalit ja menetelmät

3.1 Kudosnäytteet

Ihmisen rintakudos saatiin kliinisen yhteistyön kautta Turun yliopistollisesta keskussairaalaan tutkimukseen suostumuksensa antaneilta potilailta (Ethical approval ETKM 23/2018), joille tehtiin joko rintojenpienennysleikkaus (normaali terve rintakudos) tai rintasyöpäleikkaus (ei-invasiivinen rintasyöpäkudos). Terve kudos leikattiin muutaman senttimetrin kokoisiksi palasiksi ennen jatkokäsittelyä, ja rintasyöpäkudoksen dissektiosta vastasi patologi. Potilaat täyttivät lisäksi lomakkeen, josta saatiin tietää heidän perustietojensa lisäksi (*body mass index*; BMI, paino, lääkitys) lisääntymiseen liittyviä tietoja, kuten synnytysten määrä, imetyksen kesto, tupakointi, sekä tietoa heidän ehkäisystään ja kuukautiskierrosta. Keskeiset tiedot on esitetty tähän tutkimukseen kerättyjen näytteiden osalta taulukossa 1.

Taulukko 1. Potilastiedot.

ID	Ikä	Synnytysten määrä	BMI	Toimenpide
ID109	44	2	26,10	reduktiomammoplastia
ID110	55	1	29,05	reduktiomammoplastia
ID111	26	0	26,96	reduktiomammoplastia
ID112	23	0	24,01	reduktiomammoplastia
ID304	41	2	22,68	duktaalinen karsinooma <i>in situ</i>

3.2 Kudoskirkastus ja *light sheet* -mikroskopia

3.2.1 Näytteen valmistus

Kudos fiksattiin 4 % paraformaldehydillä (PFA) PBS:ssä +4 °C o/n. Kudos pestiin PBS:llä ja sitä säilytettiin käyttöön asti +4 °C:ssa PBS:ssä, johon oli lisätty penisilliini-

streptomysiini-antibioottia (1:100). CUBIC-kudoskirkastusta varten valmistettiin CUBIC 1 -reagenssia, joka sisältää ureaa (10 % [w/v], Promega), N,N,N',N'-tetrakis(2-hydroxypropyl)ethylenediamine -reagenssia (5 % [v/v], Merck), Triton-X100 (10/15 % [v/v], Sigma) sekä NaCl (25 mM) tislatussa vedessä. Kudos leikattiin pienemmiksi paloiksi (5 mm x 5 mm x 2 mm), joita kirkastettiin reagenssissa +37 °C:ssa 2-3 päivää. Kudos pestiin PBS:llä ja blokattiin värjäystä varten Triton-X100 (0,5 % [v/v], Sigma) sisältävällä *horse*-seerumilla (10 % [v/v], Gibco) PBS:ssä +4 °C:ssa o/n. Primäärivasta-aineet laimennettiin tähän blokkauspuskuriin ja kudosta värjättiin +4 °C:ssa 4 päivää. Kudosta pestiin PBS:llä (3 x 1 h, RT), jonka jälkeen sitä värjättiin blokkauspuskuriin liuotetuilla sekundäärivasta-aineilla +4 °C:ssa 2 päivää ja pestiin PBS:llä (3 x 1 h, RT). Värjäyksessä käytettiin seuraavia vasta-aineita: anti- α SMA (1:50, Alexa488 konjugoitu, Sigma), anti-Keratin-8 (1:100, Alexa594 konjugoitu, Hybridoma Bank, TROMA-1), anti-Fibronectin (1:50, Alexa488 konjugoitu, Sigma, F3648) ja anti-Hyaluronic acid (1:50, Alexa488 konjugoitu, Abcam, ab53842). Haluttaessa värjättiin vielä DAPI:lla (1:1500 PBS:ssä, Life Technologies) 3 h RT ja pestiin PBS:llä 10 min. Kudoskirkastusta jatkettiin CUBIC 2 -reagenssilla, joka sisältää sakkaroosia (44 % [w/v], Merck), ureaa (22 % [w/v], Promega), triethanolamine-reagenssia (9 % [v/v], Fisher Scientific) sekä Triton-X100 (0,1 % [v/v], Sigma) tislatussa vedessä. Kudosta kirkastettiin reagenssissa +37 °C:ssa 2-4 päivää, jonka jälkeen sitä säilytettiin reagenssissa kuvaukseen asti RT. Näytteet kuvattiin stereomikroskoopilla (Zeiss AxioZoom.V16, 112x/0.125 NA objektiivi) kokonaiskuvan saamiseksi ja parhaiden näytteiden valitsemiseksi *light sheet* -mikroskopiaa varten. Joitain näytteitä kuvattiin myös konfokaalimikroskoopilla (3i CSU-W1 Spinning disk, 20x/0.4 NA ja 40x/0.6 NA objektiivit).

3.2.2 *Light sheet* -mikroskopia

Light sheet -mikroskopiaa varten näytteet kiinnitettiin alustalle 1,2 % *low-melting-point*-agarosilla (Gibco) liuotettuna CUBIC 2 -reagenssiin. Näytteet myös kuvattiin CUBIC 2 -reagenssissa. Kuvaukset suoritettiin MSquared Aurora Airy Beam *Light Sheet* -mikroskoopilla 20-kertaisella objektiivilla taitekertoimen ollessa 1,49. Fibronectiini, hyaluronihappo ja α SMA kuvattiin 488 nm laserilla 500-540 nm emissio filterillä, ja keratiini-8 kuvattiin 568 nm laserilla 570 nm LP (engl. *long pass*) emissio filterillä.

Kameran pikselikoko oli 387 nm ja 3D kuvat kerättiin 400 nm optisen leikkeen paksuudella.

Dekonvoluutiota varten kuvattiin pelkät lasersäteet CUBIC 2 -reagenssissa sekä fluoresoivat helmet (1:10 000) liuotettuina 1,2 % *low-melting-point*-agaroosiin (Gibco) CUBIC 2 -reagenssissa. Kuville tehtiin dekonvoluutio Aurora Deconvolution -ohjelmalla (versio 0.5). Dekonvoluutiossa käytettiin fluoresoivilla helmillä selvitettyä PSF:ää (engl. *point spread function*) ja 100 iteraatiokertaa. Keratiini-8 kuvia analysoitiin Imaris-ohjelmalla käyttäen ensin *Surfaces creation* -toimintoa tiehytjuuston pinnan segmentoimiseen, minkä jälkeen puustosta muodostettiin binäärinen kuva, joka analysoitiin *Filament tracer* -toiminnolla haaroittumisen kvantitoimiseksi. Tuloksista poimittiin muun muassa haaroittumisen aste sekä haarojen halkaisija.

3.3 Jääleikkeiden valmistus, värjäys ja kuvantaminen

3.3.1 PLP-fiksaus, OCT-pakastus ja jääleikkeet

Kudos fiksattiin PLP (engl. *periodate-lysine-paraformaldehyde*) -puskurissa (1% *paraformaldehyde*, 0.01 M *sodium periodate*, 0.075 M *L-lysine* ja 0.0375 M *P-buffer* (0.081 M Na₂HPO₄ ja 0.019M NaH₂PO₄; pH 7,4) yli yön +4°C. Fiksauksen jälkeen kudokset pestiin kahdesti 0,1 M P-puskurilla, minkä jälkeen se laitettiin säilytykseen 30 % sukroosiliuokseen (0,1 M P-puskurissa) vähintään kahdeksi päiväksi (+4 °C), mutta korkeintaan kahdeksi viikoksi.

Pakastusta varten kudospalat upotettiin OCT-reagenssiin (engl. *optimal cutting temperature compound*), ja jäädytettiin kuivajäällä. Näytteitä säilytettiin pakastimessa (-80 °C), kunnes ne leikattiin jääleikkeiksi.

3.3.2 IHC-värjäys ja kuvaus

Ennen värjäystä sulaneet jääleikkeet permeabilisoitiin ja blokattiin (2 % BSA, 0,1 % Triton PBS:ssä) (20 min, RT). Primäärivasta-aineita (Sigma Anti-FN 1:400, Sigma Anti- α SMA 1:500, Hybridoma Bank Anti-K8 1:2000) inkuboitiin 1 h (RT, 2 % BSA:ssa

PBS:ssä), minkä jälkeen pestiin PBS:llä (3x 10 min). Sekundäärivasta-aineita (Invitrogen Donkey Anti-rabbit 488 1:400, Invitrogen Donkey Anti-mouse 647 1:400, Goat Anti-rat 568 1:400) inkuboitiin myös 1 h (RT, 2 % BSA:ssa PBS:ssä), minkä jälkeen pestiin PBS:llä (3x 10 min). Toiseen pesuun lisättiin DAPI (1:1000). Lopuksi pestiin vielä tislattulla vedellä 10 min, ja mountattiin (Moviol, DAPCO).

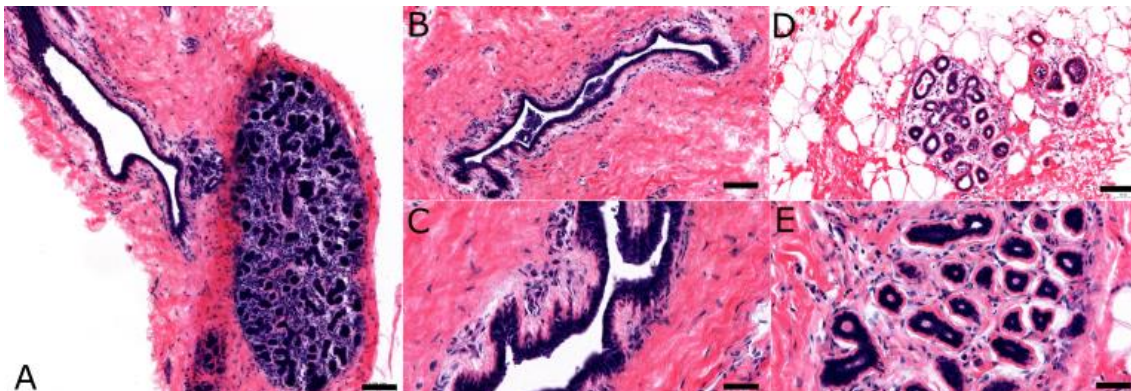
Näytteitä kuvattiin konfokaalimikroskoopilla (3i CSU-W1 Spinning disk) käyttäen 20x/0.4 NA ja 40x/0.6 NA objektiiveja sekä Slidebook ohjelmaa (versio 6.0), minkä jälkeen kuvia analysoitiin ImageJ ohjelmalla. Kuvista tunnistettiin α SMA värjäyksen perusteella tiehyet ja rauhasrakkulat, ja niiden ympäriltä kvantitoitiin vakioetäisyydeltä vakiokokoisten alueiden FN signaalin voimakkuus. Saatujen arvojen perusteella tehtiin kuvaajat, joissa näkyy vertailu FN signaalin suhteutetusta intensiteetistä rauhasrakkuloiden ja tiehyiden välillä eri potilasnäytteissä sekä yhdistettynä.

4. Tulokset

4.1 Jääleikkeitä värjäämällä voidaan visualisoida maitorauhasen kaksikulotteista rakennetta

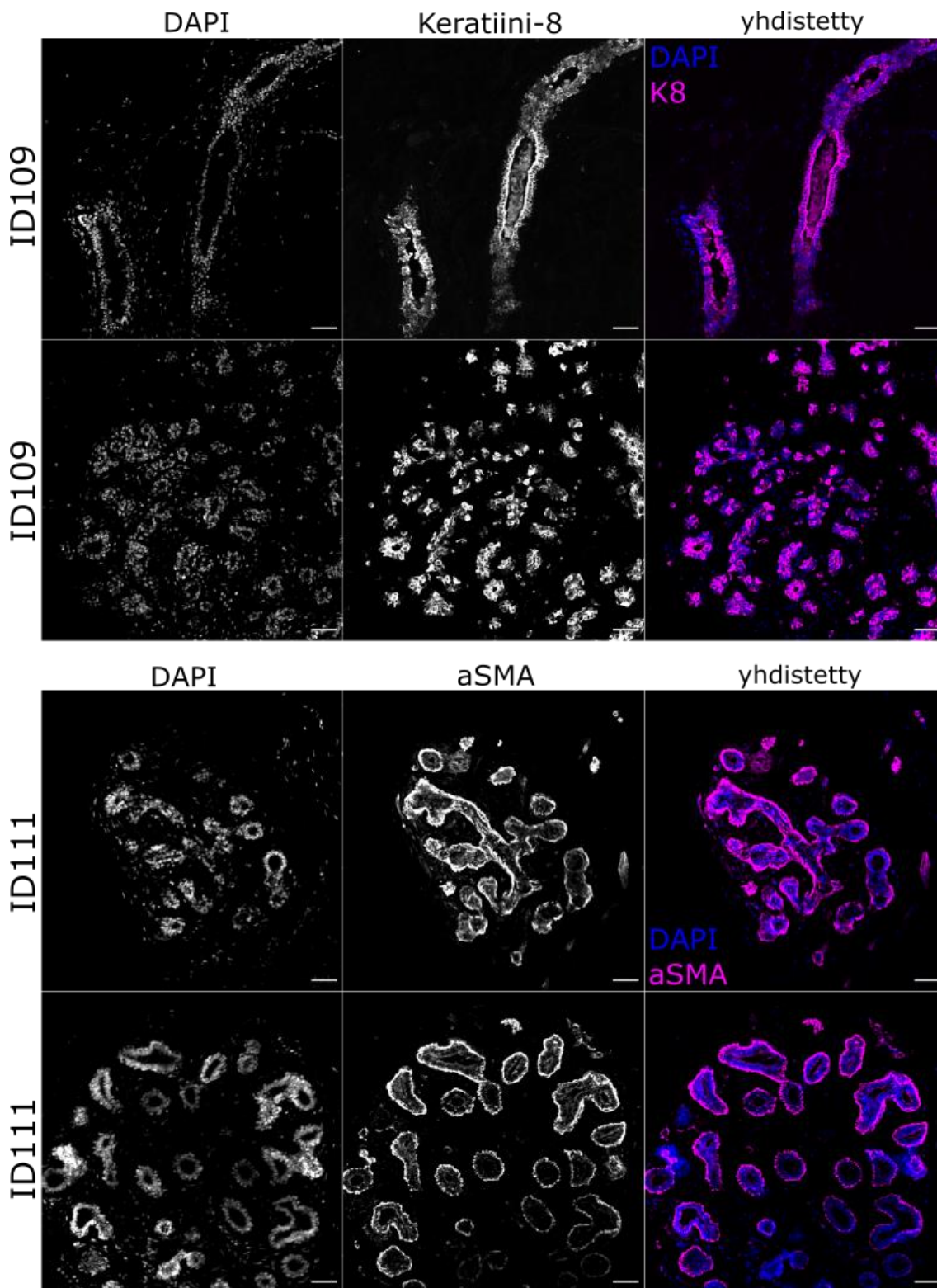
Työssä haluttiin ensin arvioida, sisältävätkö kudoksenäytteet maitorauhasen rakennetta, ja tunnistavatko käytetyt vasta-aineet oikeat solupopulaatiot. Ihmisen maitorauhasen kaksikulotteisen rakenteen tarkastelemiseksi rintojenpienennysleikkauksista saadut, fiksatut potilasnäytteet jäädytettiin upotettuina OCT-reagenssiin. Nämä jääblokit leikattiin ohuiksi jääleikkeiksi, jotka värjättiin hematoksyliini-eosiini-värjäyksellä (HE) tai immunohistokemiallisesti (IHC). HE-värjättyt jääleikkeet kuvattiin Panoramic slide scanner -laitteella ja IHC-värjättyt *spinning disk* -konfokaalimikroskoopilla.

HE-värjäys on yleisesti käytetty kudovärjäys, jossa hematoksyliini emäksisenä värjää happamat tumat violeteiksi ja eosini happamana emäksisen sytoplasman ja tukirakenteet punaisiksi (kuva 6) (Chan, 2014). Maitorauhasen solut näkyvät värjäyksessä violetteina, ympäröivä runsaasti kollageenia sisältävä kudos punaisena ja rasvakudos valkoisina pyöreinä alueina. Kudoksenäytteissä havaittiin maitorauhasen TDLU-rakenteita. Tiehyet näyttävät ontoilta putkilta (kuva 6A-C) ja rauhasrakkulat pieniltä pyöreiltä rykelmiltä (kuva 6A, D-E).



Kuva 6. Ihmisen maitorauhasen rakennetta kudostenleikkeissä. HE-värjättyissä jääleikkeissä tumat on visualisoitu violetilla ja sytoplasma sekä tukirakenteet punaisella. (A) Potilaan ID112 tiehyt ja rauhasrakkuloita. (B) Potilaan ID112 tiehyt. (C) Potilaan ID112 tiehyt (D) Potilaan ID109 rauhasrakkuloita. (E) Potilaan ID111 rauhasrakkuloita. Mittajana A, B, D 100 μm , C, E 50 μm .

Immunofluoresenssi (IHC) -värjäyksessä kudoksesta leimattiin vasta-aineilla. Maitorauhasen rakenteita värjättäessä hyödyllisiä vasta-aineita ovat muun muassa α SMA (engl. *alpha-smooth-muscle-actin*), joka värjää rauhasen basaaliset myoepiteelisolut, ja keratiini-8 (K8), joka värjää luminaaliset epiteelisolut (Böcker *et al.*, 2002). Mikroskooppikuvista (kuva 7) nähdään näiden vasta-aineiden olevan spesifisiä, koska K8-värjätyt solut ovat sisempänä kuin α SMA-värjätyt solut kuten maitorauhasessa luminaaliset solut ovat sisempänä ja basaaliset ulompana.



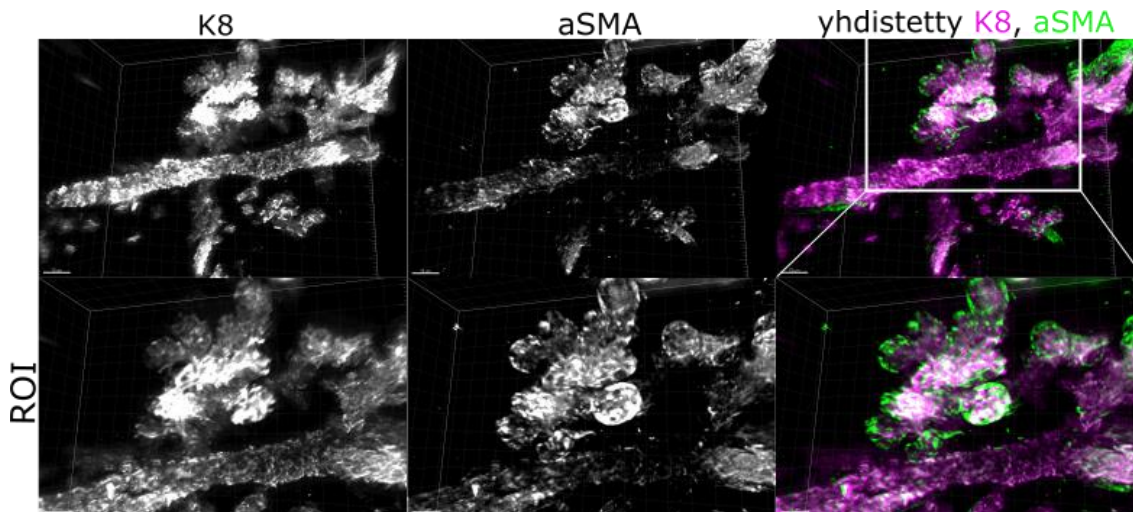
Kuva 7. Ihmisen maitorauhasen luminaalisten ja basaalisten solujen tunnistaminen immunohistokemialla. Jääleikkeistä on värjätty tumat (DAPI) sekä luminaaliset (K8) (ylempi paneeli) tai basaaliset (α SMA) maitorauhasen solut (alempi paneeli). Kuvat on otettu 20x objektiivilla spinning disk -konfokaalimikroskoopilla. Kuvat edustavat kolmesta eri potilasnäytteestä saatuja tuloksia. Mittajana 50 μ m.

4.2 CUBIC-kudoskirkastus mahdollistaa ihmisen maitorauhasen kolmiulotteisen kuvantamisen *light sheet* -mikroskoopilla

Ihmisen maitorauhasen rakennetta haluttiin kuvata myös kolmiulotteisesti käyttäen *light sheet* -mikroskooppia. *Light sheet* -mikroskopian kaksi erillistä objektiivia mahdollistavat pienemmän fototoksisuuden, mikä on merkittävä etu suurien kudoksenäytteiden kuvantamisessa (Reynaud *et al.*, 2008). Ihmisen maitorauhasen kolmiulotteisen rakenteen tarkastelemiseksi näytteet värjättiin α -SMA ja K8 vasta-aineilla vastaavasti basaalisten ja luminaalisten solujen havainnoimiseksi (Böcker *et al.*, 2002).

Rasvaisuutensa takia kudos haluttiin kirkastaa ennen kuvantamista optisen näkyvyyden parantamiseksi (Richardson and Lichtman, 2015). Tähän kehoitettiin CUBIC-menetelmää, jolla on aiemmin kirkastettu muita rasvapitoisia kudoksia kuten aivoja, ja joka perustuu kuvausta haittaavien komponenttien, kuten rasvan ja veden poistamiseen. CUBIC-1-reagenssin sisältämä Triton-X100-detergentti poistaa kudoksesta rasvan ja CUBIC-2-reagenssin sakkaroosi korvaa veden, jolloin koko kudoksen taitekerroin on sama kuin kuvattavien proteiinien (Susaki *et al.*, 2014). Koska näytettä kuvattiin CUBIC-2-reagenssiin upotettuna, näyte piti kiinnittää näytepitimeen CUBIC-2-reagenssiin liuotetulla agarosilla. Työssä kuvattiin 11 kudospalaa yhteensä 5 eri potilasnäytteestä. Kuvauksen jälkeen mikroskooppikuville tehtiin dekonvoluutio pelkkiä fluoresoivia mikrohelmiä sisältäneen näytteen perusteella optisen vääristymisen vähentämiseksi (Reynaud *et al.*, 2008). Kolmiulotteista rakennetta tarkasteltiin Imaris-ohjelman avulla.

Työssä havaittiin, että näytteet pystyttiin kirkastamaan kohtalaisen hyvin CUBIC-menetelmällä, sillä kuvissa nähtiin odotusten mukaisesti haaroittuneita tiehyt- ja rauhasrakkularakenteita (kuva 8). Kuvien perusteella käytetyt vasta-aineet myös tunnistivat basaalisia (α SMA) ja luminaalisia (KRT8) soluja (kuva 8), sillä luminaaliset solut näyttävät olevan sisempänä kuin basaaliset solut, kuten jääleikkeissäkin havaittiin (kuva 7).

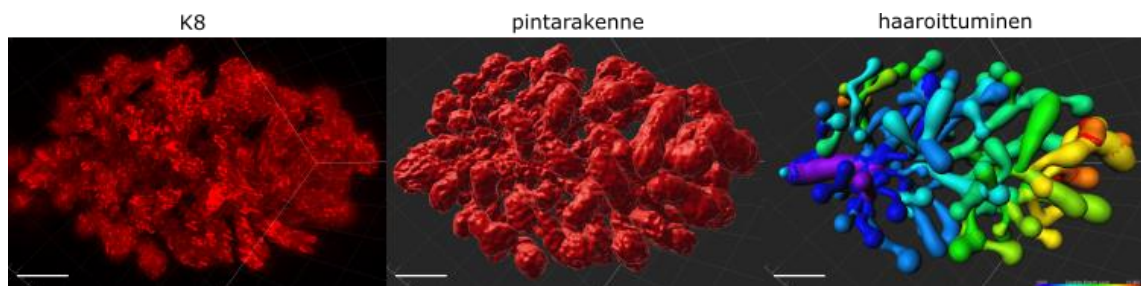


Kuva 8. *Light sheet* -mikroskooppikuva ihmisen maitorauhasesta (potilas ID109). Kudospalasta on värjätty luminaaliset (K8) ja basaaliset solut (α SMA). Mittapalkki ylärivillä 70 μ m ja alarivillä 50 μ m.

Näytteiden kuvaus oli aluksi työlästä, sillä hyvin kirkastuneiden oikeiden rakenteiden löytäminen oli hankalaa. Menetelmää kuitenkin kehitettiin koko ajan, ja kuvaus helpottui käyttämällä *overview*-toimintoa, joka kuvaa isomman alueen automaattisesti kuvakenttä kerrallaan ja liittää ne sitten yhteen. Tästä *overview*-kuvasta oli helppo paikantaa kuvattavat alueet ja siirtyä automaattisesti niiden koordinaatteihin. Kudokirkastuksen onnistuminen oli keskeisessä osassa, sillä huonosti kirkastuneista näytteistä otetut kuvat olivat sumeita, eikä niistä saanut ollenkaan hyödyllistä dataa. Myös näytteen kiinnittäminen näytepitimeen oli ratkaisevassa osassa, koska näytettä ei voinut kiinnittämisen jälkeen enää kääntää. Näytteitä pitikin valmistaa paljon ja niiden laatua tutkia ennen itse *light sheet* -kuvantamista, mutta yhdestä näytteestä saatiin lopulta keskimäärin kaksi kuvaa. Näytteiden valmistusta ja valmistelua *light sheet* -mikroskopiaa varten onkin tarkoitus vielä entisestään kehittää, jotta kuvantamisesta saadaan mahdollisimman tehokasta.

4.3 *Light sheet* -kuvista voidaan kvantitoida maitorauhasen haaroittumista

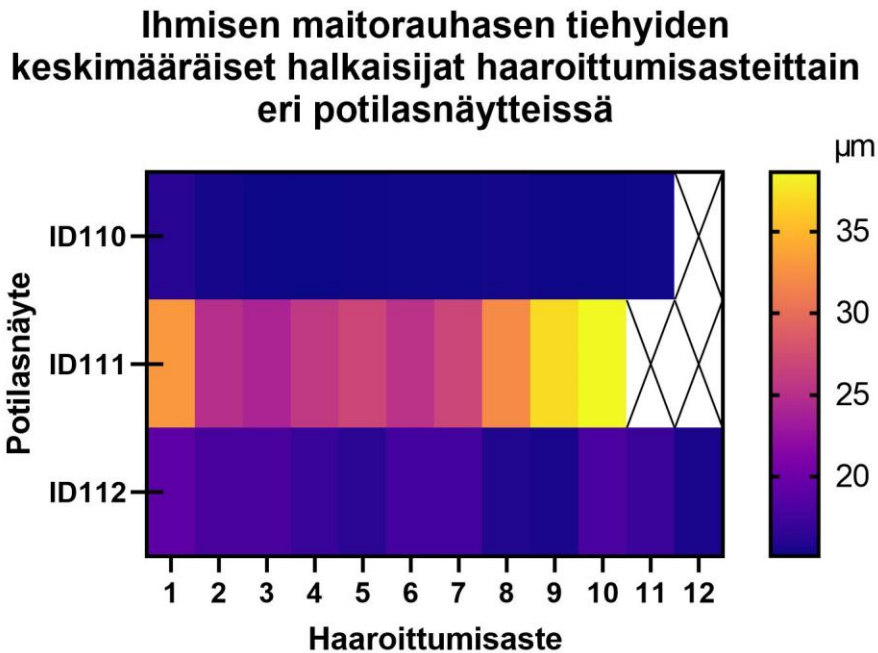
Vaikka ihmisen maitorauhasen rakenne tunnetaan pääpiirteissään kudosleikkeiden perusteella, haaroittumista ei ole ennen kvantitoitu kolmiulotteisista *light sheet* -mikroskooppikuvista. Onnistuimme rakentamaan *light sheet* -mikroskooppikuvista pintarakenteen näytteille, joista oli värjätty maitorauhasen luminaaliset solut. Tämä tehtiin Imaris-ohjelmalla, jolla edelleen pystyttiin luomaan rakenne tiehyiden haaroittumiselle (kuva 9). Rakenne kuvaa sitä, miten yksi tiehyt haarautuu ja nämä haarat edelleen haarautuvat, kunnes jokainen tiehyt päättyy lopulta rauhasrakkulaan. Tällaisesta tiehyitä ja rauhasrakkuloita sisältävästä kokonaisuudesta muodostuu kokonainen TDLU.



Kuva 9. Ihmisen maitorauhasen TDLU *light sheet* -mikroskoopilla kolmiulotteisesti kuvattuna (potilas ID111). Luminaaliset solut (K8) on värjätty rakenteen havainnollistamiseksi. Kuvasta on Imaris-ohjelman avulla tehty pintarakenne, jonka perusteella on muodostettu rakenne tiehyiden haarautumisesta. Väreillä on kuvattu haarautumisastetta yhdestä (violetti) kymmeneen (punainen). Mittapalkki 100 μm .

HaaroittumISRakenteen perusteella pystyttiin alustavasti kvantitoimaan muun muassa haarojen määrää ja halkaisijoita. Kvantitoiduissa potilasnäytteissä halkaisijat vaihtelivat 15-40 μm välillä siten, että TDLU:n ensimmäinen haara oli aina paksumpi kuin toinen (kuva 10). Potilasnäyte ID110 oli halkaisijoiltaan tasaisimmin ja ID111 epätasaisimmin jakautunut, siten että ensimmäisen vaihteluväli oli 1 μm ja jälkimmäisen 14,6 μm . Haaroittumisasteiden määrissä ei ollut suurta hajontaa (10-12). Näytteessä ID111 suurimpien haaroittumisasteiden tiehyet olivat paksumpia kuin keskivaiheen. Tämä selittyy todennäköisesti rauhasrakkuloilla, jotka ovat paksumpia kuin tiehyet. Yhdeksännen haaroittumisasteen tiehyt päättyy todennäköisemmin rauhasrakkulaan kuin neljännen, joka vielä jatkaa haaroittumistaan. Näin ollen suurempi määrä

rauhasrakkuloita yhdeksännessä haaroittumisasteessa kasvattaa keskimääräistä halkaisijaa enemmän kuin pienempi määrä neljännessä.

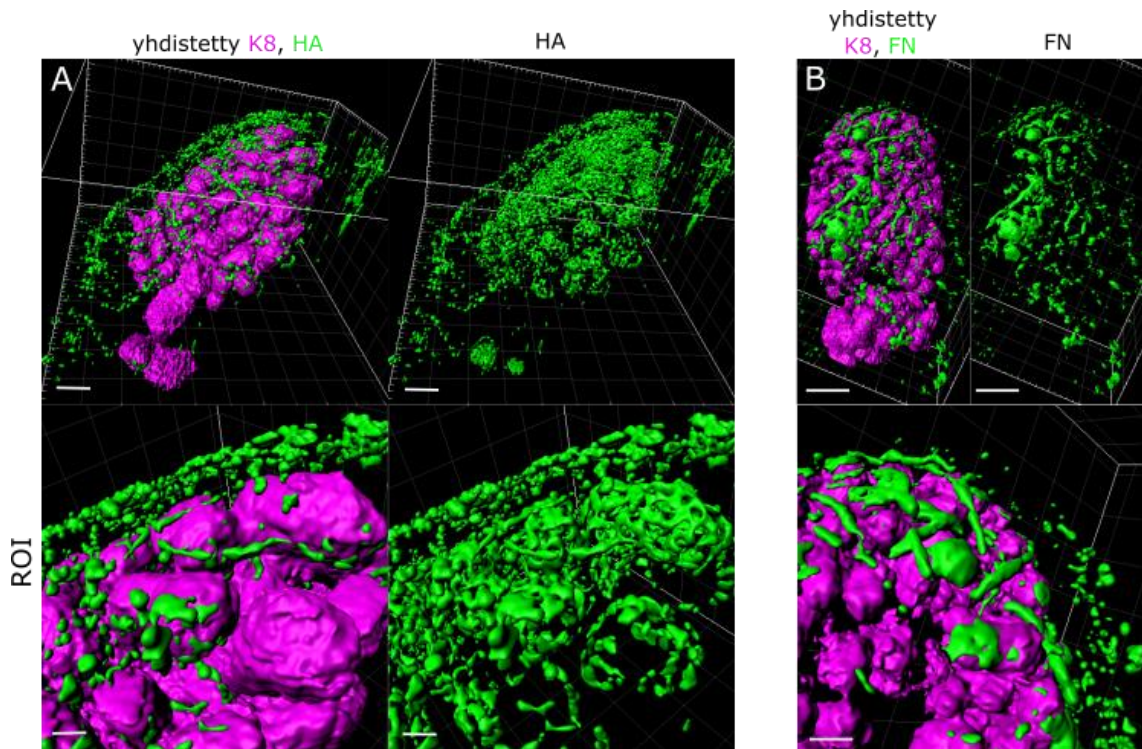


Kuva 10. Maitorauhasen tiehyiden halkaisijoiden kvantitointi. Keskimääräiset halkaisijat on esitetty kolmella eri potilasnäytteellä haaroittumisastetta kohti. Värit kuvaavat halkaisijoita 15 mikrometrinä (violetti) 40 mikrometriin (keltainen).

4.4 Hyaluronihappo ja fibronektiini keskittyvät TDLU-yksiköiden ulommaisten rauhasrakkuloiden ympärille

Soluväliaineen tiedetään vaikuttavan maitorauhasen solujen kasvuun ja erilaistumiseen (Zhu *et al.*, 2014), mutta sen eri komponenttien sijainnista tai määrästä rauhasen eri osissa ei kuitenkaan ole tarkkaa tietoa. Tämän takia haluttiin ihmisen rintakudosnäytteistä värjätä maitorauhasen solujen lisäksi erilaisia soluväliaineen komponentteja ja selvittää niiden kolmiulotteista sijaintia rauhasessa. Erityisesti fibronektiinin ja hyaluronihapon tunnistavat vasta-aineet näyttivät toimivan, koska ne kohdistuivat selkeästi tiettyihin kohtiin kudosta, eivätkä värjänneet tasaisesti koko kudosta. *Light sheet* -kuvien perusteella molemmat keskittyvät TDLU-yksiköiden pinnalle, jossa niitä on erityisesti yksikön ulommaisten rauhasrakkuloiden ympärillä (kuva 11). Hyaluronihappo on tasaisemmin jakautunut koko yksikön ympärille kuin

fibronektiini, jota on tietyissä kohdissa runsaasti, toisissa ei lainkaan. Nauhamaiset rakenteet fibronektiini-värjäyksessä ovat todennäköisesti verisuonia, joiden ympärillä fibronektiiniä ilmentyy runsaasti. Hyaluronihappo näyttää lisäksi osittain olevan yksikön sisällä, mutta tätä täytyy tarkastella tarkemmin, koska pintarakenteen luominen Imaris-ohjelmalla saattaa laajentaa luminaalisten solujen tilavuutta kuvassa.

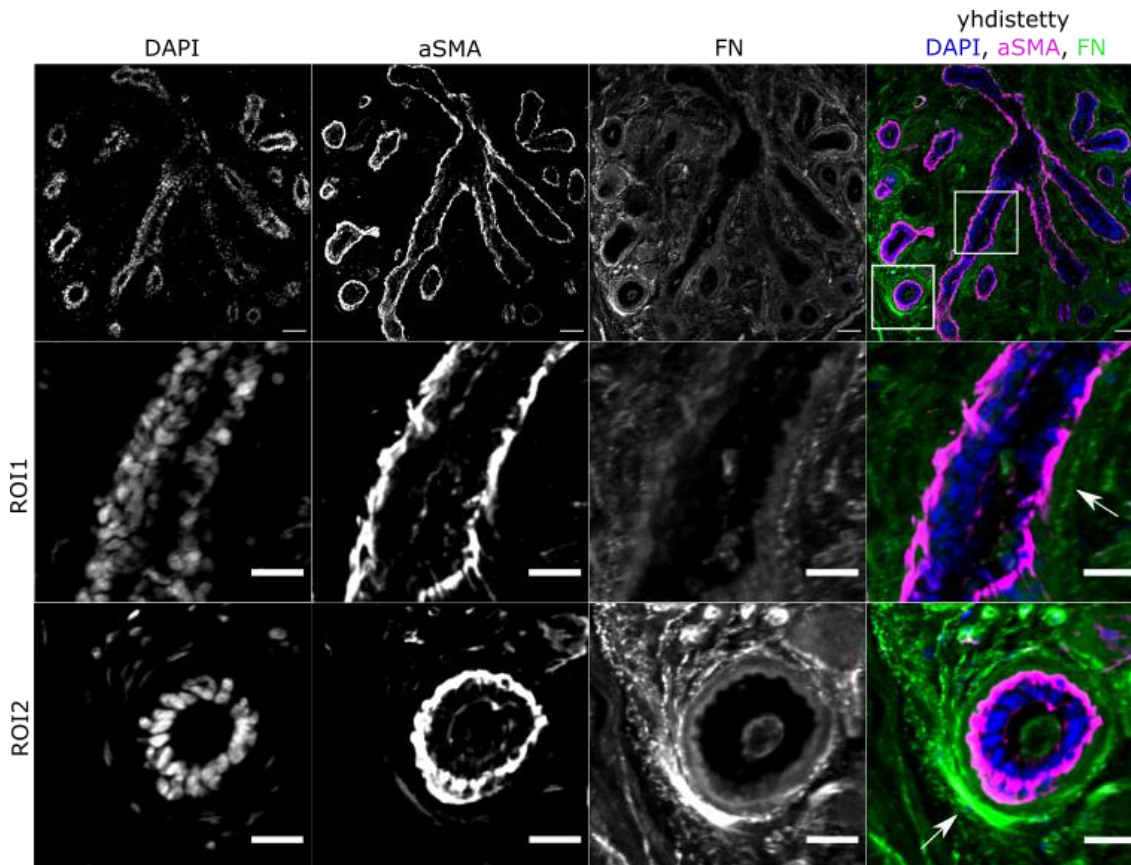


Kuva 11. Ihmisen maitorauhasen soluja ympäröivän soluväliaineen kolmiulotteinen kuvantaminen. *Light sheet* -mikroskooppikuvista on Imaris-ohjelman avulla tehty pintarakenteet värjäytyille rakenteille. (A) Hyaluronihappo (HA) värjätty luminaalisten solujen (K8) kanssa potilasnäytteestä ID111. (B) Fibronektiini (FN) värjätty luminaalisten solujen (K8) kanssa potilasnäytteestä ID112. Mittapalkki ylärivillä 100 μm ja suurennoksissa 40 μm .

4.5 Fibronektiiniä ilmentyy enemmän rauhasrakkuloiden kuin tiehyiden ympärillä

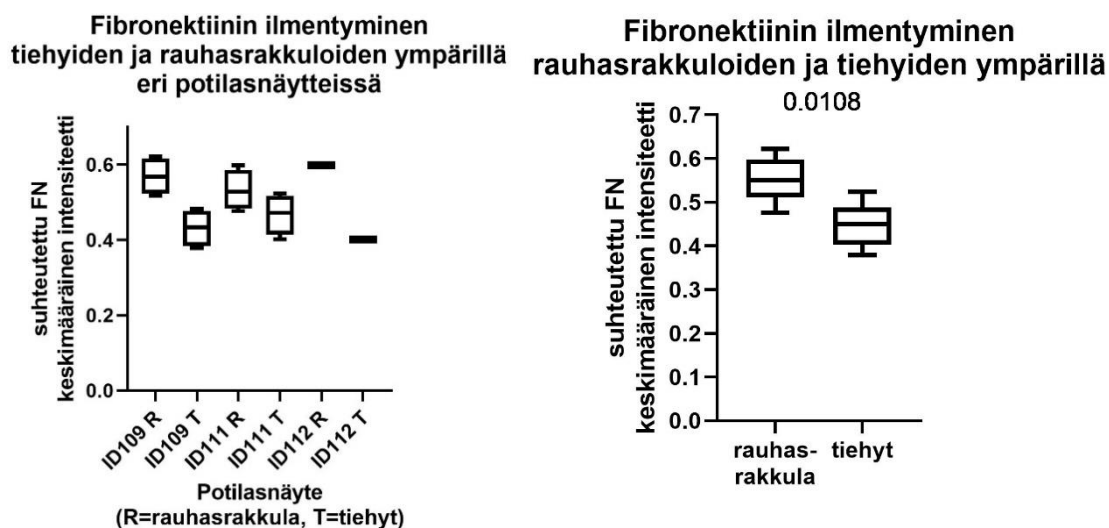
Light sheet -mikroskopiolla todetun onnistuneen värjäyksen ansiosta keskityttiin fibronektiinin sijainnin ja määrän analysoimiseen. Tätä varten kuvattiin immunohistokemiallisesti värjättyjä jääleikkeitä, joista oli fibronektiinin lisäksi värjätty

basaaliset maitorauhasen solut (kuva 12). Kuvista tunnistettiin tiehyiden ja rauhasrakkuloiden alueita α SMA-värjäyksen perusteella, ja niiden ympäriltä tarkasteltiin fibronektiinisignaalin voimakkuutta. Silmämääräisesti katsottuna fibronektiiniä näytti olevan enemmän rauhasrakkuloiden kuin tiehyiden ympärillä.



Kuva 12. Fibronektiinin sijainnin ja määrän analysointi maitorauhasessa IHC-värjätystä jääleikkeestä (potilas ID111). Leikkeestä on fibronektiinin (FN) lisäksi värjätty tumat (DAPI) ja basaaliset maitorauhasen solut (α SMA). Kun verrataan tiehyiden ja rauhasrakkuloiden ympärillä olevan fibronektiinin määrää, havaitaan sitä olevan enemmän rauhasrakkuloiden ympärillä, kuten nuolet osoittavat. Mittapalkki ylärivillä 50 μ m ja suurennoksissa 25 μ m.

Erot fibronektiinin määrissä varmistettiin vielä kvantitoimalla signaalin voimakkuus tiehyiden ja rauhasrakkuloiden ympäriltä. Eri potilaista saaduista leikkeistä mitattiin samalta etäisyydeltä samankokoisten alueiden fibronektiinisignaalin voimakkuus. Nämä arvot suhteutettiin toisiinsa, ja kerättiin kuvaajaksi (kuva 13). Myös tämän kvantitaation perusteella fibronektiini keskittyy enemmän rauhasrakkuloiden kuin tiehyiden ympärille sekä eri potilasnäytteissä että yhdistetyssä datassa.



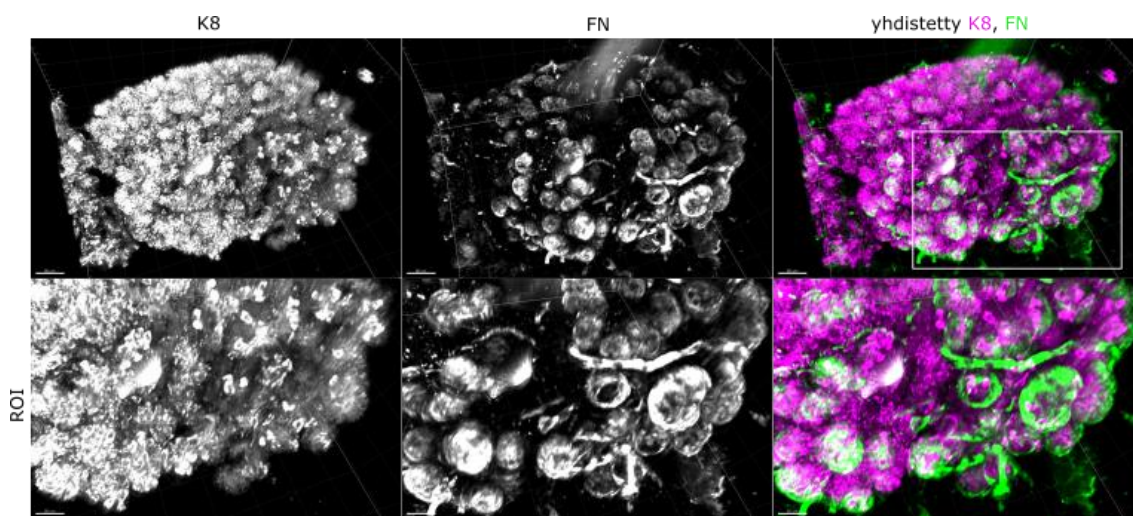
Kuva 13. Fibronektiinin sijainnin kvantitaatio ihmisen maitorauhasen solujen ympärillä. (A) Fibronektiinin suhteutettu intensiteetti rauhasrakkuloiden ja tiehyiden ympärillä eri potilasnäytteissä. (B) Fibronektiinin suhteutettu intensiteetti rauhasrakkuloiden ja tiehyiden ympärillä, kun potilasnäytteet on yhdistetty.

4.6 Fibronektiiniä ilmentyy enemmän rintasyöpäkudoksen rauhasrakkuloiden ympärillä kuin normaalin rintakudoksen ympärillä

Kuvasimme myös DCIS-rintasyöpäkudosta *light sheet* -mikroskopiolla, ja tarkastelimme kuvista maitorauhasen rakennetta, fibronektiinin määrää ja sijaintia sekä kvantitoimme tiehyiden haaroittumista. DCIS (engl. *ductal carcinoma in situ*) on ei-invasiivinen rintasyövän esiaste, joka on lähtöisin tiehyen epiteelisoluista, mutta sen syöpäsolut voivat kehittyä muodostaen invasiivisen syövän (Akram *et al.*, 2017). Fibronektiinin on todettu yliekpressoituvan rintasyöpäkudoksessa ja sen lisääntyneen määrän edistävän pahanlaatuisten kasvainten kehittymistä maitorauhasessa (Oskarsson, 2013).

Fibronectiinin on myös osoitettu yliekspressoituvan DCIS-kudoksessa ja mahdollisesti vaikuttavan invasiiviseksi syöväksi kehittymiseen (Hayward *et al.*, 2022).

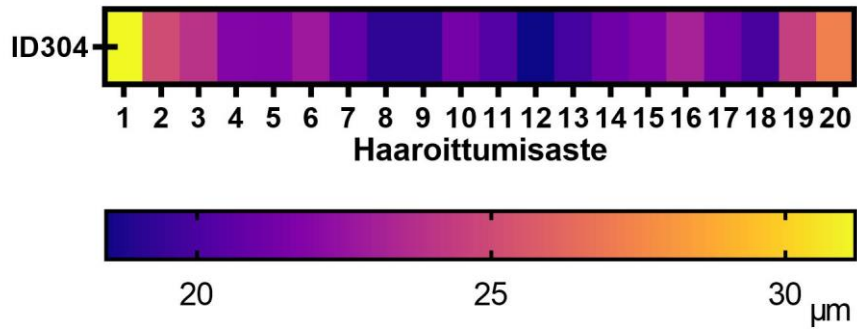
DCIS-kudos värjättiin luminaalisten maitorauhasen solujen ja fibronectiinin havainnollistamiseksi ja kuvattiin kolmiulotteisesti *light sheet* -mikroskoopilla (kuva 14). Kuvien perusteella fibronectiini keskittyy kudoksesta havaitun TDLU:n rauhasrakkuloiden ympärille kuten normaalissakin rintakudoksessa, mutta sitä näyttäisi olevan enemmän. Toisaalta kudoksenäyte oli otettu potilasnäytteen reunalta, eikä se näyttänyt varsinaiselta kasvaimelta, joten näyte saattoi olla myös normaalia rintakudosta.



Kuva 14. Ihmisen maitorauhasen solujen ja niitä ympäröivän fibronectiinin kolmiulotteinen kuvantaminen DCIS rintasyöpäkudoksesta (potilas ID304). Kudoksesta on fibronectiinin (FN) lisäksi värjätty luminaaliset solut (K8). Mittapalkki ylärivillä 80 μm ja suurennoksissa 50 μm .

TDLU:n haaroittumista kvantitoitiin DCIS-rintasyöpänäytteestä samalla tavalla kuten normaaliin rintakudosnäytteiden kohdalla (kuva 15). Kvantitoinnin perusteella havaittiin yhtäläisyyksiä ja eroavaisuuksia normaaliin näytteiden kanssa. Ensimmäinen ja viimeiset haarat olivat edelleen paksumpia kuin muut, mutta haaroittumisasteita oli enemmän (20) ja hajonta tiehyiden halkaisijoiden välillä suurempaa DCIS-näytteessä (vaihteluväli 12,7 μm).

**Ihmisen maitorauhasen tiehyiden
keskimääräiset halkaisijat haaroittumisasteittain
DCIS-potilasnäytteessä**



Kuva 15. Maitorauhasen tiehyiden halkaisijoiden kvantitointi DCIS-rintasyöpänäytteestä (potilas ID304). Keskimääräiset halkaisijat on esitetty haaroittumisastetta kohti 18 mikrometristä (violetti) 32 mikrometriin (keltainen).

5. Tulosten tarkastelu

Maitorauhasta tutkittaessa on käytetty lähinnä hiirinäytteitä, mutta koska hiiren maitorauhanen eroaa merkittävästi ihmisen maitorauhasesta (Dontu and Ince, 2015), haluttiin tässä tutkimuksessa käyttää potilaista eristettyjä näytteitä. Tutkimuksen tavoitteena oli kuvata ihmisen maitorauhasta kudostarkastuksen jälkeen kolmiulotteisesti *light sheet* -mikroskopiolla. Fluoresoivilla vasta-aineilla värjäytyistä näytteistä onnistuttiin kuvantamaan maitorauhasen epiteelisoluja sekä soluväliaineen komponentteja. Lisäksi näistä mikroskooppikuvista pystyttiin analysoimaan ihmisen maitorauhasen haaroittumista sekä fibronektiinin määrää ja sijaintia.

5.1 CUBIC-menetelmä soveltuu ihmisen rintakudoksen optiseen kirkastamiseen

Kudosta on ihanteellista kuvantaa kolmiulotteisesti, jotta saadaan mahdollisimman luotettava käsitys sen todellisesta rakenteesta ja muista ominaisuuksista. Kudostarkastuksen suuri koko on kuitenkin aiheuttanut ongelmia kuvantamiseen, sillä valo ei pääse kulkeutumaan paksujen kudostarkastusten läpi, eikä fluoresoivia leimoja ole saatu syvälle kudokseen, minkä takia näytteitä onkin pitänyt kuvata ohuina leikkeinä. Koska näistä on hankalaa selvittää kudoksen kolmiulotteista rakennetta, on kehitetty erilaisia kudostarkastusmenetelmiä, joiden tehtävä on parantaa kudoksen valonläpäisevyyttä.

Aiemmissä tutkimuksissa on vertailtu erilaisia menetelmiä hiiren maitorauhaskudoksen kirkastamiseksi. Lloyd-Lewis et al. (2016) vertaili neljän eri menetelmän vaikutusta muun muassa kudoksen valonläpäisevyyteen sekä fluoresenssisignaalin säilymiseen. Tulosten perusteella paras lopputulos saavutettiin SeeDB (engl. *see deep brain*) ja CUBIC (engl. *clear unobstructed brain imaging cocktails*) menetelmillä. Näistä CUBICin raportoitiin kirkastavan tehokkaammin, joten päätimme kokeilla sitä ihmisen maitorauhaskudoksen kirkastamiseen.

CUBIC-kudostarkastusmenetelmällä onnistuttiin tässä työssä kirkastamaan ihmisen maitorauhaskudosta niin hyvin, että pystyttiin kuvantamaan maitorauhasen epiteelisoluja sekä niitä ympäröiviä soluväliaineen komponentteja. Parhaat kuvat saatiin

kuitenkin kudoksenäytteiden reunoilta, eivätkä näytteiden keskiosat kirkastuneet kunnolla. Tätä yritettiin korjata käsittelemällä näytteitä kauemmin kirkastusreagenssissa, mutta merkittävää eroa ei havaittu. Pidemmät käsittelyajat olisivat lisäksi pidentäneet protokollaa entisestään ja edelleen rajoittaneet kuvattujen näytteiden määrää.

Kudosnäytteitä värjätessä huomattiin, että menetelmä vaatii paljon vasta-aineita, joten oli tärkeää selvittää toimivat vasta-aineet. Lloyd-Lewis et al. (2016) raportoi basaali- ja luminaalisolumarkkereiden (α SMA ja Keratiini-8) toimivan CUBIC-menetelmällä, joten kokeilimme niitä ensin. Tulosten perusteella luminaalimarkkeri toimi paremmin, joten päätimme käyttää sitä muiden vasta-aineiden kanssa. Lisäksi sillä saatiin yhtenäisemmät rakenteet kuin basaalimarkkerilla, jolloin rakenteiden segmentointi ja kvantitointi kuvista oli suoraviivaisempaa. Muista markkereista fibronectiiniä värjäävällä vasta-aineella saatiin lupaavia tuloksia, mutta vimentiniä ja β 1-integriiniä värjäävillä ei. Tämä voisi johtua jälkimmäisten pienemmästä määrästä kudoksessa tai siitä, että näiden vasta-aineiden sitoutuminen heikkeni CUBIC liuoksessa. Koska valmistaja lopetti hyaluronihappoa värjäävän vasta-aineen myymisen sen kyseenalaisen spesifisyyden vuoksi, tuloksia ei voi pitää luotettavina tämän soluväliaineen komponentin osalta. Tutkimus tulisi siis toistaa käyttämällä luotettavaa vasta-ainetta.

Onnistuimme lopulta kirkastamaan ihmisen maitorauhaskudosta varsin optimaalisesti CUBIC-menetelmällä, ja kuvaamaan haluttuja kudoserakenteita. Vielä parempi tulos kirkastuksessa ja vasta-aineleimauksessa voitaisiin mahdollisesti saavuttaa pienentämällä näytepalojen kokoa, mutta tämä taas riskeeraisi kiinnostavien rakenteiden säilymisen kokonaisina. Tämän työn kokeellisen osuuden jälkeen julkaistiin myös tutkimus (Messal et al., 2021), jossa oli kehitetty uusi kudostirkastusmenetelmä FLASH (engl. *fast light-microscopic analysis of antibody-stained whole organs*). Tutkimuksessa oli kirkastettu lukuisia eri kudoksia tällä menetelmällä, mukaan lukien hiiren maitorauhasta, ja kuvattu niitä sekä konfokaali- että *light sheet* -mikroskoopilla. FLASH-menetelmää oli myös verrattu muun muassa CUBIC-menetelmään, ja tulosten mukaan FLASH tuottaa paremmin kirkastuneen kudoksen nopeammin kuin CUBIC. Tätä menetelmää voisi siis tulevaisuudessa kokeilla ihmisen maitorauhasen kirkastamiseen.

5.2 Ihmisen TDLU-rakenteen *light sheet* -kuvantaminen paljastaa tiehyiden mittasuhteet

Tässä tutkimuksessa käytettiin kuvantamiseen sekä konfokaali- että *light sheet* -mikroskooppia. *Light sheet* -mikroskopian etuja ovat pienempi fototoksisuus ja sen soveltuvuus erityisesti kolmiulotteiseen kuvantamiseen (Reynaud *et al.*, 2008). Aiemmissa tutkimuksissa sitä onkin käytetty optisesti kirkastettujen kudosten kuvantamiseen (Lloyd-Lewis *et al.*, 2016). Menetelmää on käytetty myös hiiren maitorauhasen kuvantamiseen (Lloyd-Lewis *et al.*, 2016), ja tavoittemme olikin kuvantaa ihmisen maitorauhasta tällä menetelmällä.

Tutkimuksessa onnistuttiin saamaan kolmiulotteisia *light sheet* -kuvia maitorauhasesta solutarkkuudella. Kuvantamisen aikana huomasimme, että näytteen asento vaikuttaa huomattavasti kuvien laatuun, joten kokonaiskuvan saamiseksi kuvasimme näytteet ensin stereomikroskoopilla. Tämän jälkeen osasimme valmistella näytteet optimaaliseen asentoon *light sheet* -mikroskopiaa varten. Käyttämässämme *light sheet* -mikroskoopissa on kaksi laseria, joten pystyimme kuvantamaan yhdestä näytteestä kahta eri kohdeproteiinia, jotka leimattiin eri fluoresoiviin leimoihin konjugoiduilla vasta-aineilla. Tekniikan toinen rajoittava tekijä on kuvantamisdatan erittäin suuri koko ja tiedostojen analyysi, jota teimme Imaris-ohjelmalla.

Imaris on ohjelma, jonka avulla pystyy tarkastelemaan ja analysoimaan kolmiulotteista mikroskooppidataa. Sen *Filament tracer* -ominaisuutta on aikaisemmin käytetty muun muassa hermoston rakenteen analysointiin. Yksi tämän tutkimuksen tavoitteista olikin analysoida Imaris-ohjelmalla *light sheet* -kuvia ihmisen maitorauhasen rakenteista ja selvittää rakenteiden haaroittumista *Filament tracer* -ominaisuudella. Onnistuimme tunnistamaan mikroskooppikuvista maitorauhastiehyet, vertailemaan niiden läpimittoja sekä seuraamaan tiehyiden haaroittumista. Kuvien analysoinnissa oli oikeista asetuksista huolimatta myös haasteita, koska pintarakenteet eivät aina vastanneet todellisuutta. Varsinkin analysoidessamme haaroittumista, piti rakenteisiin tehdä paljon manuaalisia korjauksia erityisesti DCIS-näytteiden kohdalla. Datan analysointi osoittautui myös todella hitaaksi Imaris-ohjelman avulla, joten tulevaisuudessa voitaisiin kokeilla uudempaa kuva-analyysiohjelmaa nimeltään Arivis. Arivis on monipuolisempi kuin Imaris, ja sen avulla on aiemmissa tutkimuksissa analysoitu *light sheet* -dataa (Liang *et al.*, 2018).

Aikaisemmin maitorauhasen tiehyiden haaroittumista on tutkittu hiirellä, joten tämän tutkimuksen ihmiskudokseen perustuvaa dataa voidaan jatkossa verrata siihen. Hannezo et al. (2017) tutkimuksessa kuvattua matemaattista mallia maitorauhastiehyiden haaroittumiselle tullaan kokeilemaan analysoimaamme dataan. Kaiken kaikkiaan tässä tutkielmassa kehitetty menetelmä mahdollisti ihmisen maitorauhasen rakenteen uudenlaisen tarkastelun kolmiulotteisesti ja menetelmää voidaan jatkossa käyttää rakenteiden sekä niiden sisältäminen solutyyppeihin ja soluväliaineen tarkempaan tutkimiseen.

Tarkasteltaessa eri kudoksenäytteitä, vanhemmilla potilailla, joilla oli lapsia (ID109: ikä 44, 2 lasta ja ID110: ikä 49, 1 lapsi), maitorauhasen haaroittuminen näytti hajanaisemmalta (kuva 8) kuin nuoremmilla lapsettomilla potilailla (ID111: ikä 25 ja ID112: ikä 23), joilla oli selkeitä TDLU-rakenteita ja pyöreämmät rauhasrakkulat (kuva 9 ja 11). Näytteiden määrä oli kuitenkin niin pieni ja muuttujia oli useita (lasten määrä, kuukautiskierto), ettei tästä voida tehdä luotettavia johtopäätöksiä. Hiirellä iän on kuitenkin osoitettu vaikuttavan maitorauhasen soluihin (Huh et al., 2015), joten olisikin tulevaisuudessa kiinnostavaa tarkastella tätä ihmisen maitorauhaskudoksella.

5.3 Soluväliaineen fibronektiinitasot vaihtelevat ihmisen TDLU-rakenteen eri osissa

Maitorauhasen soluväliainetta on aiemmin tutkittu lähinnä hiirellä, joten halusimme tutkia sitä ihmisen maitorauhasessa. Soluväliaineen komponenteista keskityimme fibronektiiniin, jonka on maitorauhasessa havaittu edistävän pahanlaatuisten kasvainten kehittymistä (Oskarsson, 2013). Halusimme erityisesti selvittää, onko fibronektiinin ilmentymisessä eroja eri rakenteellisten osien välillä, sillä aikaisemmista tutkimuksista tästä ei löydy tarkkaa tietoa.

Kuvaamalla ihmisen rintakudoksenäytteitä *light sheet* -mikroskoopilla ja jääleikkeitä konfokaalimikroskoopilla, havaitsimme fibronektiinin keskittyvän enemmän rauhasrakkuloiden kuin tiehyiden ympärille. Kuvaamalla DCIS-näytteitä *light sheet* -mikroskoopilla, havaitsimme saman ilmiön, mutta fibronektiinin ilmentyminen näytti olevan suurempaa kuin terveessä rintakudoksessa. Tämä tukee kirjallisuutta siinä, että fibronektiinin ilmentyminen kasvaa rintasyövän kehittyessä (Williams et al., 2008).

Fibronectiinin ilmentymistä täytyy vielä tutkia lisää, jotta voidaan tehdä luotettavia johtopäätöksiä sen sijainnista ja määrästä ihmisen rintakudoksessa. Koska kuukautiskierron on osoitettu vaikuttavan fibronectiinin ja muiden soluväliaineen komponenttien määrään ja sijaintiin (Ferguson *et al.*, 1992), olisi mielenkiintoista tutkia tätä suuremmalla näytemäärällä. Lisäksi DCIS-näytteistä täytyy valmistaa ja kuvata jääleikkeitä, jotta voidaan tarkemmin vertailla fibronectiinin määrää tiehyiden ja rauhasrakkuloiden välillä. Tämän jälkeen voidaan myös lähteä tutkimaan, onko soluväliaineen koostumuksella yhteyttä siihen, että tiehyiden rintasyöpäriskin on havaittu olevan korkeampi kuin rauhasrakkuloiden (Kotsopoulos *et al.*, 2010).

6. Yhteenveto

Tässä tutkimuksessa optimoitiin menetelmä ihmisen maitorauhaskudoksen kirkastamiseksi ja kolmiulotteiseksi kuvantamiseksi *light sheet* -mikroskopiolla. Lisäksi kehitettiin menetelmä kuvattujen rakenteiden kvantitatiiviseen analyysiin. Kuvien perusteella pystyttiin seuraamaan tiehyiden haaroittumista sekä määrittämään niiden läpimittoja. Lisäksi tarkasteltiin erityisesti fibronektiini soluväliaineen määrää ja sijaintia maitorauhasen eri osissa. Sekä *light sheet* -mikroskopian että kudოსleikkeiden kuvantamisen perusteella fibronektiini keskittyy enemmän rauhasrakkuloiden kuin tiehyiden ympärille. Lopuksi kuvattiin myös varhaisen rintasyövän eli DCIS-vaiheen rintakudosta sekä fibronektiinin ilmentymistä siinä.

Tässä työssä kehitetyllä menetelmällä voitiin onnistuneesti kuvata ihmisen maitorauhaskudosta sekä värjätä kudoksen eri soluja ja soluväliaineen komponentteja. Menetelmää tulee kuitenkin vielä kehittää, jotta suurempia kudosalueita saadaan kirkastettua. Lisäksi tarvitaan useampien näytteiden analyysiä luotettavien johtopäätösten tekemiseksi. Tulevaisuudessa olisi mielenkiintoista kuvata myös muita soluväliaineen komponentteja. Kun tiedetään enemmän maitorauhaskudoksesta ja sen soluväliaineesta, voidaan niitä verrata rintasyöpäkudokseen ja edelleen tutkia tapahtuvia muutoksia ja niiden mekanismeja. DCIS-kudoksesta täytyy myös tehdä leikkeitä, jotta voidaan verrata fibronektiinin ja muiden soluväliaineen komponenttien määrää kudoksen eri osissa varhaisessa rintasyövässä ja normaalissa rintakudoksessa. Tämän jälkeen päästään myös lähemmäs kysymystä, onko fibronektiinin sijainnilla merkitystä siinä, että tiehyiden rintasyöpäriski on suurempi verrattuna rauhasrakkuloihin.

7. Lähteet

Akram, M. *et al.* (2017) 'Awareness and current knowledge of breast cancer', *Biological Research*, 50(1), p. 33. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40659-017-0140-9>.

Atherton, A.J. *et al.* (1998) 'Differential expression of type XIV collagen/undulin by human mammary gland intralobular and interlobular fibroblasts', *Cell and Tissue Research*, 291(3), pp. 507–511. Available at: <https://doi.org/10.1007/s004410051020>.

Auvinen, P. *et al.* (2013) 'Increased hyaluronan content and stromal cell CD44 associate with *HER2* positivity and poor prognosis in human breast cancer', *International Journal of Cancer*, 132(3), pp. 531–539. Available at: <https://doi.org/10.1002/ijc.27707>.

Bergamaschi, A. *et al.* (2008) 'Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome', *The Journal of Pathology*, 214(3), pp. 357–367. Available at: <https://doi.org/10.1002/path.2278>.

Böcker, W. *et al.* (2002) 'Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept', *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 82(6), pp. 737–746. Available at: <https://doi.org/10.1097/01.lab.0000017371.72714.c5>.

Brownfield, D.G. *et al.* (2013) 'Patterned collagen fibers orient branching mammary epithelium through distinct signaling modules', *Current biology: CB*, 23(8), pp. 703–709. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.03.032>.

Cardiff, R.D. and Wellings, S.R. (1999) 'The comparative pathology of human and mouse mammary glands', *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 4(1), pp. 105–122. Available at: <https://doi.org/10.1023/A:1018712905244>.

Chan, J.K.C. (2014) 'The Wonderful Colors of the Hematoxylin–Eosin Stain in Diagnostic Surgical Pathology', *International Journal of Surgical Pathology*, 22(1), pp. 12–32. Available at: <https://doi.org/10.1177/1066896913517939>.

Condeelis, J. and Segall, J.E. (2003) 'Intravital imaging of cell movement in tumours', *Nature Reviews. Cancer*, 3(12), pp. 921–930. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc1231>.

Cordes, N. *et al.* (2003) 'Fibronectin and laminin increase resistance to ionizing radiation and the cytotoxic drug Ukrain[®] in human tumour and normal cells *in vitro*', *International Journal of Radiation Biology*, 79(9), pp. 709–720. Available at: <https://doi.org/10.1080/09553000310001610240>.

Dontu, G. and Ince, T.A. (2015) 'Of Mice and Women: A Comparative Tissue Biology Perspective of Breast Stem Cells and Differentiation', *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 20(1–2), pp. 51–62. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10911-015-9341-4>.

Durbeej, M. (2010) 'Laminins', *Cell and Tissue Research*, 339(1), pp. 259–268. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0838-2>.

- Emerman, J.T. *et al.* (1977) 'Hormonal effects on intracellular and secreted casein in cultures of mouse mammary epithelial cells on floating collagen membranes.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(10), pp. 4466–4470. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.74.10.4466>.
- Fata, J.E., Werb, Z. and Bissell, M.J. (2004) 'Regulation of mammary gland branching morphogenesis by the extracellular matrix and its remodeling enzymes', *Breast cancer research: BCR*, 6(1), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1186/bcr634>.
- Ferguson, D.J. and Anderson, T.J. (1981) 'Morphological evaluation of cell turnover in relation to the menstrual cycle in the "resting" human breast', *British Journal of Cancer*, 44(2), pp. 177–181. Available at: <https://doi.org/10.1038/bjc.1981.168>.
- Ferguson, J.E. *et al.* (1992) 'Changes in the extracellular matrix of the normal human breast during the menstrual cycle', *Cell & Tissue Research*, 268(1), pp. 167–177. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00338066>.
- Gudjonsson, T. *et al.* (2002) 'Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition', *Journal of Cell Science*, 115(Pt 1), pp. 39–50. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.115.1.39>.
- Gusterson, B.A. and Stein, T. (2012) 'Human breast development', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23(5), pp. 567–573. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.03.013>.
- Hayward, M.-K. *et al.* (2022) 'Mechanostimulation of breast myoepithelial cells induces functional changes associated with DCIS progression to invasion', *npj Breast Cancer*, 8(1), p. 109. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41523-022-00464-4>.
- Houthuijzen, J.M. and Jonkers, J. (2018) 'Cancer-associated fibroblasts as key regulators of the breast cancer tumor microenvironment', *Cancer and Metastasis Reviews*, 37(4), pp. 577–597. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10555-018-9768-3>.
- Huang, S. and Ingber, D.E. (2005) 'Cell tension, matrix mechanics, and cancer development', *Cancer Cell*, 8(3), pp. 175–176. Available at: <https://doi.org/pas>.
- Huh, S.J. *et al.* (2015) 'Age- and pregnancy-associated DNA methylation changes in mammary epithelial cells', *Stem Cell Reports*, 4(2), pp. 297–311. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.12.009>.
- Hynes, R.O. (2002) 'Integrins', *Cell*, 110(6), pp. 673–687. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00971-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00971-6).
- Inman, J.L. *et al.* (2015) 'Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment', *Development*, 142(6), pp. 1028–1042. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.087643>.
- Isomursu, A. *et al.* (2019) 'Integrin signaling and mechanotransduction in regulation of somatic stem cells', *Experimental Cell Research*, 378(2), pp. 217–225. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.01.027>.

Jinga, D.C. *et al.* (2006) 'MMP-9 and MMP-2 gelatinases and TIMP-1 and TIMP-2 inhibitors in breast cancer: correlations with prognostic factors', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10(2), pp. 499–510. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2006.tb00415.x>.

Kadler, K.E. *et al.* (2007) 'Collagens at a glance', *Journal of Cell Science*, 120(12), pp. 1955–1958. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.03453>.

Kalluri, R. and Weinberg, R.A. (2009) 'The basics of epithelial-mesenchymal transition', *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), pp. 1420–1428. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI39104>.

Kass, L. *et al.* (2007) 'Mammary epithelial cell: influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumorigenesis', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(11), pp. 1987–1994. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.06.025>.

Keely, P.J., Wu, J.E. and Santoro, S.A. (1995) 'The spatial and temporal expression of the alpha 2 beta 1 integrin and its ligands, collagen I, collagen IV, and laminin, suggest important roles in mouse mammary morphogenesis', *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 59(1), pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.1995.5910001.x>.

Kotsopoulos, J. *et al.* (2010) 'Risk factors for ductal and lobular breast cancer: results from the nurses' health study', *Breast Cancer Research*, 12(6), p. R106. Available at: <https://doi.org/10.1186/bcr2790>.

Kwon, S.-Y. *et al.* (2012) 'Laminin 332 Expression in Breast Carcinoma', *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 20(2), pp. 159–164. Available at: <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e3182329e8f>.

Liang, H. *et al.* (2018) '3D imaging of PSD-95 in the mouse brain using the advanced CUBIC method', *Molecular Brain*, 11(1), p. 50. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13041-018-0393-4>.

Lloyd-Lewis, B. *et al.* (2016) 'Imaging the mammary gland and mammary tumours in 3D: optical tissue clearing and immunofluorescence methods', *Breast cancer research: BCR*, 18(1), p. 127. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0754-9>.

Lloyd-Lewis, B. *et al.* (2017) 'Mammary Stem Cells: Premise, Properties, and Perspectives', *Trends in Cell Biology*, 27(8), pp. 556–567. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.04.001>.

Macias, H. and Hinck, L. (2012) 'Mammary gland development', *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, 1(4), pp. 533–557. Available at: <https://doi.org/10.1002/wdev.35>.

Messal, H.A. *et al.* (2021) 'Antigen retrieval and clearing for whole-organ immunofluorescence by FLASH', *Nature Protocols*, 16(1), pp. 239–262. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41596-020-00414-z>.

- Misra, S., Ghatak, S. and Toole, B.P. (2005) 'Regulation of MDR1 Expression and Drug Resistance by a Positive Feedback Loop Involving Hyaluronan, Phosphoinositide 3-Kinase, and ErbB2* \diamond ', *Journal of Biological Chemistry*, 280(21), pp. 20310–20315. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M500737200>.
- Okuda, H. *et al.* (2012) 'Hyaluronan Synthase HAS2 Promotes Tumor Progression in Bone by Stimulating the Interaction of Breast Cancer Stem-Like Cells with Macrophages and Stromal Cells', *Cancer Research*, 72(2), pp. 537–547. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1678>.
- Oskarsson, T. (2013) 'Extracellular matrix components in breast cancer progression and metastasis', *The Breast*, 22, pp. S66–S72. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.breast.2013.07.012>.
- Park, J. and Schwarzbauer, J.E. (2014) 'Mammary epithelial cell interactions with fibronectin stimulate epithelial-mesenchymal transition', *Oncogene*, 33(13), pp. 1649–1657. Available at: <https://doi.org/10.1038/onc.2013.118>.
- Paszek, M.J. *et al.* (2005) 'Tensional homeostasis and the malignant phenotype', *Cancer Cell*, 8(3), pp. 241–254. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.08.010>.
- Paszek, M.J. and Weaver, V.M. (2004) 'The tension mounts: mechanics meets morphogenesis and malignancy', *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 9(4), pp. 325–342. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10911-004-1404-x>.
- Pellacani, D. *et al.* (2019) 'Transcriptional regulation of normal human mammary cell heterogeneity and its perturbation in breast cancer', *The EMBO Journal*, 38(14). Available at: <https://doi.org/10.15252/emj.2018100330>.
- Pouliot, N. and Kusuma, N. (2013) 'Laminin-511: A multi-functional adhesion protein regulating cell migration, tumor invasion and metastasis', *Cell Adhesion & Migration*, 7(1), pp. 142–149. Available at: <https://doi.org/10.4161/cam.22125>.
- Provenzano, P.P. *et al.* (2008) 'Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression', *BMC medicine*, 6, p. 11. Available at: <https://doi.org/10.1186/1741-7015-6-11>.
- Reynaud, E.G. *et al.* (2008) 'Light sheet-based fluorescence microscopy: more dimensions, more photons, and less photodamage', *HFSP journal*, 2(5), pp. 266–275. Available at: <https://doi.org/10.2976/1.2974980>.
- Ricci, P. *et al.* (2022) 'Removing striping artifacts in light-sheet fluorescence microscopy: a review', *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 168, pp. 52–65. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2021.07.003>.
- Richardson, D.S. and Lichtman, J.W. (2015) 'Clarifying Tissue Clearing', *Cell*, 162(2), pp. 246–257. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.067>.
- Said, G. *et al.* (2012) 'Extracellular Matrix Proteins Modulate Antimigratory and Apoptotic Effects of Doxorubicin', *Chemotherapy Research and Practice*, 2012, pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1155/2012/268681>.

Schedin, P. (2006) 'Pregnancy-associated breast cancer and metastasis', *Nature Reviews Cancer*, 6(4), pp. 281–291. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc1839>.

Schedin, P. *et al.* (2007) 'Microenvironment of the Involuting Mammary Gland Mediates Mammary Cancer Progression', *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 12(1), pp. 71–82. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10911-007-9039-3>.

Susaki, E.A. *et al.* (2014) 'Whole-Brain Imaging with Single-Cell Resolution Using Chemical Cocktails and Computational Analysis', *Cell*, 157(3), pp. 726–739. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.042>.

Tainaka, K. *et al.* (2016) 'Chemical Principles in Tissue Clearing and Staining Protocols for Whole-Body Cell Profiling', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 32, pp. 713–741. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125001>.

Tharmapalan, P. *et al.* (2019) 'Mammary stem cells and progenitors: targeting the roots of breast cancer for prevention', *The EMBO Journal*, 38(14). Available at: <https://doi.org/10.15252/embj.2018100852>.

Theocharis, A.D. *et al.* (2010) 'Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting: Proteoglycans as potential pharmacological targets', *FEBS Journal*, 277(19), pp. 3904–3923. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07800.x>.

Theocharis, A.D. *et al.* (2016) 'Extracellular matrix structure', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97, pp. 4–27. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>.

Udabage, L. *et al.* (2005) 'Antisense-Mediated Suppression of Hyaluronan Synthase 2 Inhibits the Tumorigenesis and Progression of Breast Cancer', *Cancer Research*, 65(14), pp. 6139–6150. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1622>.

Urakawa, H. *et al.* (2012) 'Inhibition of hyaluronan synthesis in breast cancer cells by 4-methylumbelliferone suppresses tumorigenicity in vitro and metastatic lesions of bone in vivo', *International Journal of Cancer*, 130(2), pp. 454–466. Available at: <https://doi.org/10.1002/ijc.26014>.

Williams, C.M. *et al.* (2008) 'Fibronectin expression modulates mammary epithelial cell proliferation during acinar differentiation', *Cancer Research*, 68(9), pp. 3185–3192. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2673>.

Woodward, T.L. *et al.* (2001) 'Fibronectin and the alpha(5)beta(1) integrin are under developmental and ovarian steroid regulation in the normal mouse mammary gland', *Endocrinology*, 142(7), pp. 3214–3222. Available at: <https://doi.org/10.1210/endo.142.7.8273>.

Xu, R. *et al.* (2009) 'Sustained activation of STAT5 is essential for chromatin remodeling and maintenance of mammary-specific function', *The Journal of Cell Biology*, 184(1), pp. 57–66. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.200807021>.

Yang, X.H. *et al.* (2010) 'Disruption of Laminin-Integrin-CD151-Focal Adhesion Kinase Axis Sensitizes Breast Cancer Cells to ErbB2 Antagonists', *Cancer Research*, 70(6), pp. 2256–2263. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4032>.

Zhu, J. *et al.* (2014) 'Integrated extracellular matrix signaling in mammary gland development and breast cancer progression', *Histology and Histopathology*, 29(9), pp. 1083–1092. Available at: <https://doi.org/10.14670/HH-29.1083>.