

DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

ALFÖLDI RÓBERT

**Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Biológia Doktori Iskola**

**Szeged
2021**

Ph.D. értekezés

Három-dimenziós *in vitro* multicelluláris szferoidok fejlesztése és alkalmazása tumorelleses hatóanyagok vizsgálatára

Alföldi Róbert

Témavezetők:

Dr. habil. Puskás László Géza
Tudományos tanácsadó

Dr. Szebeni Gábor János
Tudományos főmunkatárs

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar



Szeged
2021

TARTALOM

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
BEVEZETÉS.....	5
IRODALMI HÁTTÉR	7
Daganatsejtek kialakulása	7
A daganatsejtek metabolikus fenotípusa, Warburg- effektus	8
Daganatok <i>in vitro</i> modellezése.....	10
Tumor asszociált fibroblasztok (CAF)	11
Tumor asszociált makrofágok (TAM)	11
Endotél sejtek.....	12
Extracelluláris mátrix.....	12
Háromdimenziós <i>in vitro</i> multicelluláris sejtenyésztési módszerek.....	13
ECM-szerű mátrixban növesztett MCS-ek (scaffold-based spheroids)	13
Mátrix nélküli MCS-ek (scaffold-free spheroids).....	14
Mikrohordozók felületén növesztett MCS-ek	16
Mikrofluidikai chippek.....	16
CÉLKITŰZÉSEK.....	17
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	18
Etikai engedély	18
Alkalmazott sejtek.....	18
Kétdimenziós sejtenyésztés	18
Hasnyálmirigy-szigetek (isletek) izolálása és fenntartása	19
ECM-szerű mátrixban növesztett MCS-ek előállítása RAFT™ sejtenyésztési módszerrel.....	19
Mikrohordozók felületkezelése.....	19
Mikrohordozók felületén növesztett és mátrix nélküli MCTS-ek előállítása szuszpenziós sejtenyésztési módszerrel.....	20
Mátrix nélküli MCTS-ek előállítása ULA módszerrel	21
Élő sejtszám meghatározás tripánkék festéssel.....	21
Sejtek életképességének meghatározása resazurin alapú enzimaktivitás méréssel	21
Apoptózis vizsgálata citofluorimetriával	22
Sejtciklus analízis	22
Konfokális lézer szkennig mikroszkópia	23
A549 Xenograft Tumor Modell előállítása	24
Génexpressziós vizsgálatok.....	24
Egyséjít tömegcitometriás (CyTOF) vizsgálatok	24
Klaszteranalízis	26

Statisztikai analízis.....	26
Grafikai illusztrációk	27
EREDMÉNYEK	28
TÉZIS 1. Hagyományosan szélesztett egyrétegű vagy szuszpenziós sejt kultúrában növesztett hasnyálmirigy-szigetekkel szemben a háromdimenziós kollagén mátrixba ágyazott hasnyálmirigy-szigetek életképessége, glükagon és inzulin termelése emelkedett.....	28
Hasnyálmirigy-szigetek (isletek) azonosítása	28
A hasnyálmirigy-szigetek MCS morfológiája és életképessége.....	30
Az RAFT™ mátrixba ágyazott szigetek inzulin expressziójának a vizsgálata.....	32
TÉZIS 2. A 3D <i>in vitro</i> tenyésztett A549 humán tüdő adenokarcinóma sejtek gén expressziója és karcinóma marker profilja közelebb áll az <i>in vivo</i> körülményhez, mint a hagyományos 2D tenyésztés esetén.....	36
A különböző tenyésztési körülmények között tenyésztett 2D és 3D kultúrák életképessége.	37
<i>In vivo</i> expressziós mintázatot mutató gének kiválasztása	39
Fehérjemarkerek egysejt-tömegcitometriás (CyTOF) vizsgálata	43
TÉZIS 3. Az MCF-7 és egér 4T1 emlő daganatsejtek háromdimenziós körülmények között tenyésztett formái ellenállóbbak a tumorellenes hatóanyagoknak egy 67 komponensű hatóanyag könyvtár tesztelése során	48
Gyógyszerjelölt kismolekulák daganatellenes hatásának a vizsgálata 2D és 3D sejtenyészeteken	48
DISZKUSSZIÓ.....	51
Köszönetnyilvánítás.....	56
IRODALOMJEGYZÉK.....	57
ÖSSZEFOGLALÓ	64
SUMMARY	66

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2D – két dimenzió

3D – három dimenzió

CA9 – szénsav-anhidráz 9

CAF – tumor asszociált fibroblaszt (cancer associated fibroblast)

DMEM – Dulbecco által módosított Eagle táptalaj (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

ECM – extracelluláris mátrix

EGFR – epidermális növekedési faktor receptor

EMT – epiteliális-mezenchimális tranzíció

HIF – hipoxia indukálta faktor

HLA – humán leukocita antigén

HRE – hipoxia reszponzív elemek (hypoxia response elements)

HTS – nagy áteresztőképességű szűrés (high throughput screening)

IC50 – 50%-os gátló hatást okozó hatóanyag koncentráció

MCT – monokarbonsav transzporter

MCTS – multicelluláris tumorszferoidok

MCS – multicelluláris szferoid

MCSB – Maxpar sejtfestő puffer (Maxpar Cell Staining Buffer)

MHC – hisztokompatibilitási komplex

MMP – mátrix metalloproteináz

PHD – Prolil-4-hidroxiláz

RCCS – rotációs sejtenyésztési rendszer (rotary cell culture system)

RFU – relatív fluoreszcencia egység (relative fluorescence unit)

TAM – tumor asszociált makrofág (tumor associated macrophage)

TIMP – szöveti metalloproteináz gátló (tissue inhibitor of metalloproteinases)

TOF – repülési idő (time of flight)

ULA – ultra alacsony tapadású mikrotitráló lemez (ultra low attachment)

VEGF – vaszkuláris endoteliális növekedési faktor

VHL – von Hippel Lindau tumorszupresszor

viSNE – reprezentatív többdimenziós adatelemzés (visualization of stochastic neighbor embedding)

BEVEZETÉS

Magyarországon a vezető halálokok listájának élén a nem fertőző megbetegedések állnak. Ezek közül első helyen található a szív és érrendszeri betegségek, ezt pedig a daganatos megbetegedések követik, több mint 25%-át kitevé az éves halálozásoknak. Mivel a daganatos megbetegedések a vezető halálokok között szerepelnek, kiemelten fontos a tumorok növekedését gátló, citosztatikus és citotoxikus szerek folyamatos fejlesztése és *in vitro* majd *in vivo* szűrése. A hatóanyagok fejlesztése mellett azokat a szűrési eljárásokat is fejlesztenünk kell, amelyeken az új molekulákat megbízhatóan tesztelni tudják. Ezért mind a gyógyszeripar, mind a klinikum számára fontos új típusú *in vitro* modelleket kidolgozni, amelyeken összetett módon tudjuk a daganatellenes szerek hatását vizsgálni nem csak a tumorsejteken, hanem olyan rendszerekben is, amelyek a tumor mikrokörnyezetét is modellezzik.

A napjainkban rutinszerűen használt sejtenyésztő edényes kultúrák számos hátránnyal rendelkeznek, mivel a mesterségesen kialakított, egyrétegben növő sejtek polaritásukat elveszítik és a sejt-sejt kapcsolataik is ekvatoriálissá váltak, így az azokon végzett hatóanyagtesztek biológiai relevanciája, valamint a tesztelt hatóanyagok klinikai hatékonysága is nehezen megjósolható és adaptálható a klinikai kutatásokban és a terápiában egyaránt. Annak ellenére, hogy több tanulmány is bizonyította már, hogy a fent említett két-dimenzióban (2D) növesztett sejtek hatóanyag elleni érzékenysége eltér a három-dimenzióban (3D) növesztett sejtekénél [1-3], mégis a kétdimenziós sejtenyésztés az általánosan elterjedt módszer a kutatásban és a diagnosztikában is [4-6], mivel azokat sokkal könnyebb és gazdaságosabb fenntartani.

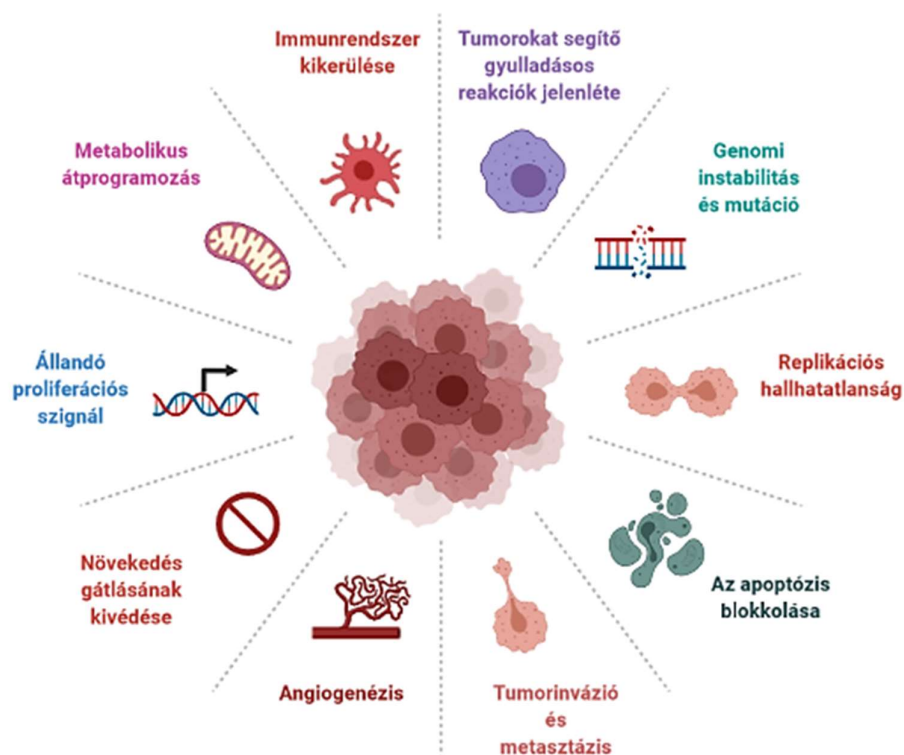
A háromdimenziós sejtenyésztési módszerek egyik legfontosabb előnye, hogy a sejtek képesek több rétegben növekedni és ennek eredményeképpen a polaritásuk sem válik ekvatoriálissá. Ez nem csak morfológiai különbségeket fog eredményezni, hanem metabolikus folyamataik is közelebb állnak az élő szervezetben lévőhöz, így valóságosabb képet mutatnak az *in vivo* körülményekhez. Ezekben az úgynevezett multicelluláris sferoidokban a sejtek elhelyezkedésük függvényében különböző mértékben fognak tápanyaghoz, növekedési és egyéb faktorokhoz, valamint oxigénhez jutni, ami sokkal jobban modellezi a valós tumor mikrokörnyezetben a kapillárisoktól eltérő távolságban lévő sejtcsoportosulásait.

A Ph.D. értekezésem gerincét annak felderítése adta, hogy megvizsgáljam melyik *in vitro* sejtenyésztési mód tudja a legpontosabban modellezni a normál *in vivo* fiziológiás szöveti állapotot, valamint azokat összehasonlítani a rutinszerűen használt hagyományos kétdimenziós sejtenyészetekkel. Vizsgálataink során egy újfajta sejtmátrix alapú modellrendszert állítottunk be és teszteltünk, melynek során *ex vivo* összehasonlítottuk a hagyományosan szélesztett egyrétegű sejt kultúrában növesztett egér hasnyálmirigy-szigetek sejtleletképességét, valamint glukagon és inzulin termelését a kollagén mátrixba ágyazott háromdimenziós hasnyálmirigy-szigetekkel. További kísérleteinkben különböző mátrixban és tenyésztési körülmények között növesztett tumorsejtek átfogó vizsgálatait végeztük el. Az eltérő *in vitro* modellekben növesztett A549 humán tüdő karcinóma sejtek növekedési kinetikáját, életképességét, gén és fehérje expresszióját vizsgáltuk, majd hasonlítottuk össze az *in vivo* szubkután beültetett A549 tumorokkal. Végül két és háromdimenziós körülmények között tenyésztett humán MCF-7 és egér 4T1 emlő daganatsejtek ellenállóképességét vizsgáltuk új típusú imidazo[1,2-b]pirazol-7-karboxamid gyógyszerjelöltekkel szemben annak tisztázására, hogy az eltérő tenyésztési körülmények hogyan befolyásolják a molekulakönyvtár egyes tagjainak hatásosságát.

IRODALMI HÁTTÉR

Daganatsejtek kialakulása

A daganat kialakulása egy többtényezős folyamat, ahol egy sejt növekedését és osztódását befolyásoló protoonkogének és tumorszupresszorok genetikai rendellenessége végső soron egy korlátlanul osztódó malignus sejtburjánzást idéz elő. A tumor fejlődéséhez vezető út több egymást követő, független esemény láncolata. A bekövetkező mutációk hatására megváltoznak a sejten belüli és sejtek közötti jelátviteli folyamatok, felborul a sejtciklus szabályozása, és megváltozik a sejt–extracelluláris mátrix (ECM) kapcsolata. Két, a tumorbiológiában nemzetközileg elismert kutató, Hanahan és Weinberg rávilágított arra, hogy a daganatok kialakulása általában tíz közös jellemzőre vezethető vissza [7]. Erre a következtetésre több ezer nemzetközi tanulmány gondos áttekintése után jutottak. (1. ábra)

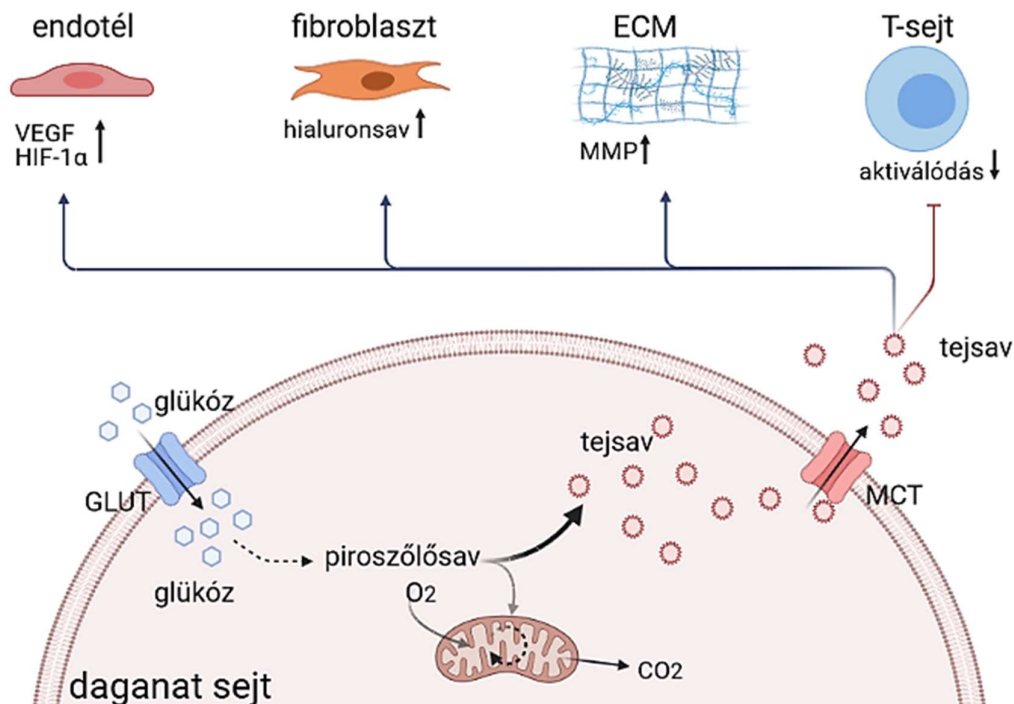


1. ábra Rákos sejtek közös sajátossága, hogy képesek önmagukat és környezetüket metabolikusan átprogramozni. Képesek kikerülni az immunrendszert, ellenállnak az apoptózisnak és elkerülik a sejtosztódás programozott korlátait, mentesülve az osztódási öregedéstől. További sajátosságuk, hogy új erek kialakulását kezdeményezik, el tudják kerülni a kontakt gátlás folyamatait, genetikailag instabilak és invazívak egyaránt.

A daganatsejtek proliferációjának szabályozási zavarai és az ennek háttérében álló genetikai változásokon túl, egyre több adat alapján vetődik fel az az elmélet is, hogy a tumorok részben metabolikus betegségnek is tekinthetők.

A daganatsejtek metabolikus fenotípusa, Warburg- effektus

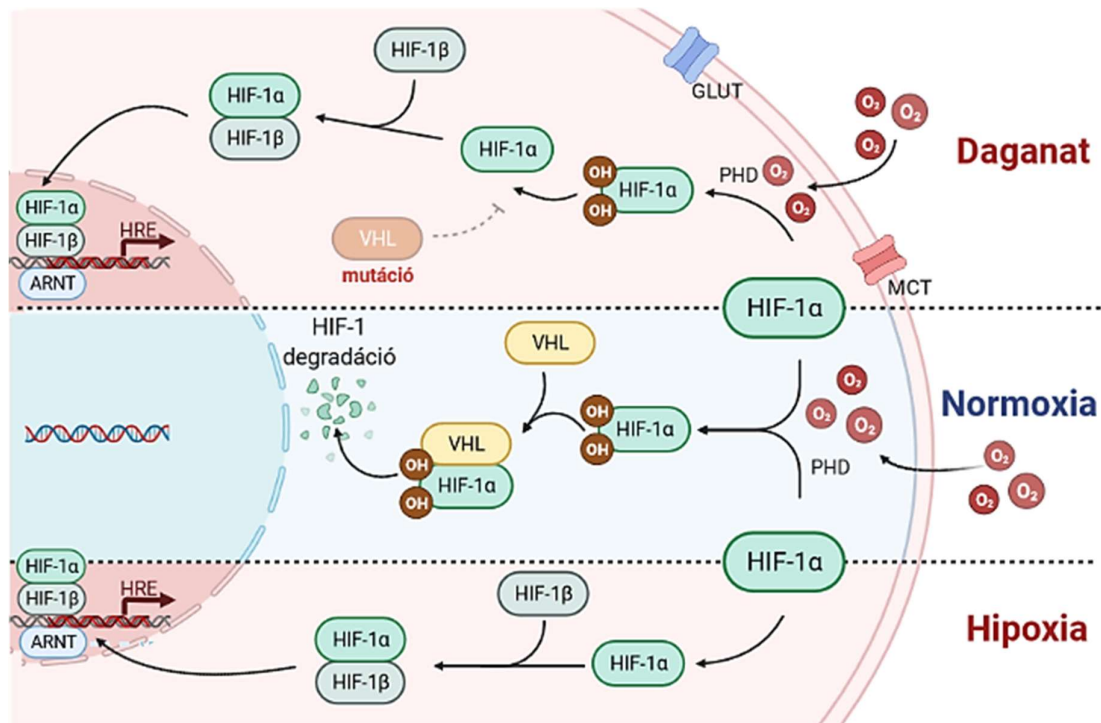
Az 1920-as években, Otto Warburg írta le először a rák általános metabolikus fenotípusát, amelyet később aerob glikolízisnek, vagy „Warburg-effektus”-nak neveztek el. Otto Warburg Nobel-díjas felfedezése azt írja le, hogy a daganatos sejtek oxigén jelenlétében is nagymennyiségű glükózt vesznek fel és azt a mitokondriumok oxidatív foszforilációja helyett, glikolízissel történő fermentáció során (aerob-glikolízis), tejsav előállítására használják [8]. Az aerob glikolízis során termelődő tejsavat a monokarbonsav transzporter (MCT) fehérjék segítik az extracelluláris térbe, ami végül a tumor mikrokörnyezetének az elsavasodásához vezet. Ezt a folyamatot a mitokondriumokból felszabaduló széndioxid is tovább fokozza. Az elsavasodó mikrokörnyezet és a tejsav együttes jelenléte pedig számos olyan metabolikus folyamatot indukál a tumorok közvetlen környezetében, amelyek kedveznek a tumor progressziójának és túlélésének. Ilyen folyamatok például a fibroblaszt sejtek hialuronsav termelésének a fokozása, a CA9 karbonsav-anhidráz kifejeződésének a fokozása miatt a tumorinvázió támogatása, a mátrix metalloproteázok (MMP-k) általi ECM átrendeződés indukálása, a tejsav általi T-sejt aktiválásának a gátlása, valamint a tumorasszociált fibroblasztok az endotél sejtek és a sztróma sejtek VEGF termelése és HIF-1 alfa aktiválódása [9].



2. ábra. A Warburg-effektusra jellemző aerob glikolízissal és tejsavtermeléssel az elsavasodó környezet és a tejsav számos normál sejt funkcióját befolyásolja. Ilyenek többek között az endotél sejtek fokozott VEGF termelése, a fibroblasztok hialuronsav termelése, az ECM MMP-k általi átalakulása és a T-sejtek aktiválásának a gátlása is. A tumorsejtek fokozott GLUT és MCT transzporter fehérjék kifejeződése pedig tovább segíti a glükóz fokozott felvételét és a tejsav extracelluláris térbe való kijuttatását.

Az felsoroltakra jó példa a GLUT1 (glükóz transzporter 1) és az MCT4 (monokarbonsav transzporter 4) mivel ismert róluk a fent említett, a malignus daganatsejtek metabolikus átprogramozásában játszott fontos szerepe (2. ábra), vagy a von Hippel Lindau (VHL) tumorszupresszor, amely normál oxigénellátottság mellett a sejtekben a HIF1-alfa ubikvitinizációjáért és a proteozómában való lebontásáért felelős, így funkcióvesztéssel mutációja esetén a HIF1 fehérje számos metabolikus gén átíródását tudja szabályozni. Normál oxigén szint mellett (normoxia) a sejtekben lévő HIF fehérjék prolin oldalláncai hidroxilálva vannak a PHD (Prolyl-4-hydroxylase) fehérjék által. (3. ábra) A hidroxilált prolin oldallánccok a VHL- fehérje számára felismerő motívumként szolgálnak és az oda bekötődött VHL kijelöli a HIF1-alfát a proteozómába való degradációra [10]. Ennek a folyamatnak köszönhető, hogy normoxiás körülmények között a HIF1-alfa féléletideje körülbelül

10 perc a sejtekben. Alacsony oxigénszint mellett (hipoxia) a PHD nem tud hidroxilálni vagy a VHL funkcióvesztéses mutációja során a VHL nem tud bekötődni a prolin oldalláncokhoz. Így a HIF-1 alfa transzkripció faktor a sejten belül gyorsan akkumulálódik és dimerizálódik az ARNT/HIF1 béta alegységgel, majd a HIF transzkripció faktor a sejtmagba jutva több száz gén átíródását eredményezi. Ilyen gének általában protoonkogén metabolikus folyamatokat szabályoznak, mint a glükóz metabolizmus (GLUT-1, MCT4), a tejsavsintézis [11], az angiogenezis [12] és az apoptózis [13].



3. ábra. A sejtekben található HIF-1α normoxiás körülmények között hamar lebomlik, azonban alacsony oxigén szint mellett (hipoxia) a HIF-1β-val dimerizálódva a sejtmagba jut és ott a hipoxia rezszonív gének (HRE) átíródását fogja indukálni. A von Hippel Lindau (VHL) tumorszupresszor funkcióvesztéses mutációja esetén a HIF-1α fehérje szintén stabilizálódni tud a sejtekben és számos metabolikus gén átíródását fogja eredményezni, hasonlóan, mint hipoxia esetében.

Daganatok *in vitro* modellezése

A rutinszerűen alkalmazott egyrétegű (monolayer) sejtkultúrák alkalmazása mind az alap mind az alkalmazott kutatás esetében kiegészítésre szorul, mivel az ezeken tesztelt hatóanyagok klinikai relevanciája számos esetben vitatott. A kétdimenziós (2D) sejtkultúrák mesterségesen kialakított műanyag felületen, egy rétegben nőző sejtekből állnak, melyek így polaritásukat elvesztették, tápanyag- és

oxigén ellátottságuk pedig a sejtek között egyenletes. Az *in vivo* daganatok oxigén és tápanyagellátottsága azonban a 2D sejt kultúrákkal ellentétben gyakran ingadozó a szöveti környezet gyors változása (remodelling) miatt. A daganatsejtek metabolikus profiljára pedig legtöbbször a Warburg-effektusnak nevezett oxigén-ellátottságtól független, aerob glikolízis jellemző, amely emelkedett glükózfelhasználással, tejsavszintézissel és a mikrokörnyezet elsavasodásával jár. A valódi tumorok mikrokörnyezete is sokkal komplexebb, mint amit a 2D sejt kultúrák modellezni tudnak, a korlátlanul osztódni képes tumorsejtek szoros környezetében számos nem tumoros sejt típus is megfigyelhető, mint a tumor asszociált fibroblasztok (CAF), a tumor asszociált makrofágok (TAM), az endotél sejtek, és egyéb extracelluláris mátrix összetevők.

Tumor asszociált fibroblasztok (CAF)

A daganat mikrokörnyezetét alkotó tumorsztróma leggyakoribb sejt típusa a normálistól nagyobb méretű, orsó formájú tumor asszociált fibroblaszt. Ez a sejt típus képes átformálni a daganatsejteket körbe ölelő ECM szerkezetét [14] és a normál szöveti fibroblasztoktól eltérően képesek fokozni a daganatok proliferációs és migrációs tulajdonságát [15,16]. A tumor asszociált fibroblasztok a mikrokörnyezet stimulusai által, normál szöveti fibroblasztokból vagy mesenchimális őssejtekből alakulnak ki [17,18]. Ezen stimulusok közül a legfontosabb a szöveti hipoxia, az oxidatív stressz és a környező tumorsejtek által kifejezett faktorok, mint amilyen a TGF- β , az epidermális növekedési faktor (EGF), a vérlemezke-eredetű növekedési faktor (PDGF) és a fibroblaszt növekedési faktor (FGF2) [19,20].

Tumor asszociált makrofágok (TAM)

Azokat a makrofágokat, amelyek tumorszövetbe infiltrálódnak és a daganatok mikrokörnyezetében képesek befolyásolni a tumor növekedését, az angiogenezist és az immunregulációt, tumorral asszociált makrofágoknak nevezzük. A főként monocitákból kialakuló tumorasszociált makrofágok M2 fenotípusúak [21], csökkent fagocita aktivitással rendelkeznek és képesek gyulladásgátló citokineket (IL-10, IL-13 és IL-4), kemokineket (CCL7, CCL8, CCL9) expresszálni, így lokálisan gátolni az immunrendszer tumorelles választ [22,23].

Endotél sejtek

A vérerek belső falát bélelő endotélium egy dinamikusan változó sejtréteg, amely szabályozza a tápanyagok szövetekbe való jutását, fenntartja az erek véráramlását és szabályozza a leukociták érfalon keresztüli kilépését a környező szövetekbe. Azonban daganatos megbetegedésekben a szöveti hipoxia és a növekedési faktorok állandó jelenléte endotél diszfunkciót okoz, amely a tumorokat átszövő vérereket törékennyé teszi, melynek hatására hiányos véráramlás alakul ki a tumorszövetekben. A sérült érhálózatú, valamint az avaszkuláris daganatok alacsony oxigénszintje pedig a sejtekben található hipoxia indukálta faktor (HIF) stabilizálódását fogja eredményezni, amely számos hipoxia által szabályozott gén kifejeződésének fokozása mellett a pro-angiogén vaszkuláris endotél növekedési faktort (VEGF) is indukálni fogja [24]. Ennek eredményeként a szekretált VEGF gradiense mentén a hipoxiás területre újabb endotél sejtek fognak vándorolni és vaszkularizálni a daganat oxigén és tápanyagszegény területét [25,26]. Ez az angiogén-váltás (angiogen-switch) pedig robbanás szerűen fokozza a tumor növekedését és invázióját [27].

Extracelluláris mátrix

A tumorsztrómát az őket alkotó sejteken túl egy dinamikusan változó nem sejtes összetevőkből álló, 3D szerkezet is körbe öleli, amelyet másképpen extracelluláris mátrixnak nevezünk (ECM). Az ECM számos összetevője kulcsfontosságú a tumorgenézis során. Ilyen fehérjék az integrinek [28], a mátrix metalloproteinázok (MMP) [29] és a szolubilis növekedési faktorok, mint a lizil-oxidáz,[30] és a kötőszöveti növekedési faktor (CTGF) [31].

Számos tanulmány leírta, hogy tumoros elváltozások esetében az ECM és sejtek közötti kommunikáció megváltozik és főként az integrinek, szindekánok és diszkoidin által szabályozott jelátviteli utak aktiválódnak, amelyek kóros sejtprolifерációt és differenciálódást eredményeznek [32]. Normál körülmények között az ECM átrendeződés kulcselemei a mátrix metalloproteinázok, amelyek legtöbbje a kollagén lebontásáért felelős, így bontva meg a tumor közvetlen közelében lévő kötőszövetet, ezáltal a tumor terjedése gyorsabban végbe mehet. Ezekben a folyamatokban a legfőbb proteázok az MMP-2 és az MMP-9, melyek az ECM fő komponensének, a IV-típusú kollagénnek a lebontásáért felelősek [33]. Az

MMP-k aktivitását, endogén gátló molekuláik, az ún. TIMP-ek (tissue inhibitor of metalloproteinases) szabályozzák, amelyek ekvimolárisan képesek az MMP-k cink kötő doménjéhez kötődni, így azok proteáz aktivitását gátolni [34]. Tumorkban fokozódik a tumormikrokörnyezet MMP aktivitása, mivel az MMP-k mennyisége gyorsabb növekedést mutat a TIMP-nél, így elbillen azok moláris aránya és a túlsúlyban lévő MMP-k aktivitása érvényesül. Az ECM-ben továbbá feldúsulhatnak az angiogenezist (VEGF, PDGF) és az immunszuppressziót indukáló szolubilis faktorok is (IL-6, IL-10), amelyek így a tumor mikrokörnyezetében közvetlenül képesek befolyásolni a tumor progresszióját és metasztatikus képességét [35].

Háromdimenziós *in vitro* multicelluláris sejtenyésztési módszerek

Az *in vitro* multicelluláris 3D sferoidok (MCS) létrehozásához egyetlen sejtvonalból kiindulva képezhetők komplex, háromdimenziós sejtcsoportosulások. Ezek a multicelluláris struktúrák képesek kellő pontossággal utánozni azt a niche-t, amely az élő szervezetben található a sejtek körül. Az MCS-ek azonban nem csak homogén sejtvonalból hozhatók létre. Számos komplex szöveti struktúra is létrehozható általuk, mint például őssejteket felhasználva organoidok, vagy endotél, immun, fibroblaszt és tumorsejtek keverékéből pedig a tumormikrokörnyezetet (TME) is jól modellező komplex szöveti struktúra.

Az elmúlt évek során számos 3D sejtenyésztési eljárás látott napvilágot, de általánosságban valamennyiről elmondható, hogy az alábbi négy nagy csoportba sorolható:

ECM-szerű mátrixban növesztett MCS-ek (scaffold-based spheroids)

Az előállításuk során használt félszilárd biokompatibilis mátrixok az extracelluláris mátrix (ECM) fehérje vázát modellezzik, így lehetővé téve a sejtek 3D-s növekedését egy térhálón belül. Ezek a mátrixok általában természetes, szintetikus vagy félszintetikus eredetű hidrogélek [36,37]. Az egyik ilyen leggyakrabban használt természetes hidrogél, amelyet az ECM-szerű mátrixal rendelkező sferoidok előállítása során használni szoktak az Engelbreth-Holm-Swarm egér szarkóma sejtek által termelt fehérjeelegy, vagy más néven a Matrigel® [38]. A természetes hidrogélek különféle ECM komponensekből, valamint citokinekből és növekedési faktorokból állhatnak, amelyek a sejtek túléléséhez

fontos jelátviteli útvonalakat képesek indukálni. A természetes hidrogélek legnagyobb hátránya azonban az, hogy mivel természetes forrásból származnak, összetételük a gyártási sarzsok között eltérhetnek, amely később nagyban befolyásolhatja a kísérletek reprodukálhatóságát. Ennek kiküszöbölésére a másik széleskörben használt természetes mátrix fehérje alapú módszer a RAFT™ technológia, melyben a sejtekhez adott kollagén tömörített formában képes a sejtek körül térhálós vázat biztosítani [39]. Emellett a szintetikus mátrixok is elterjedtek, mint például a poli(etilén-glikol) (PEG) hidrogélek, amelyek segítségével egységes és standardizálható módon alakíthatók ki soksejtes sferoidok. Ezek hasonlóan a természetes mátrix fehérje vázhoz szintén képesek utánozni a különféle mikrokörnyezeti tényezőket, mivel azokhoz különféle növekedési faktorok és adhéziós peptidek adhatóak [40]. Sokoldalúságuk ellenére az ECM-szerű mátrixszal rendelkező sferoidok számos kihívást is jelentenek a nagy áteresztőképességű szűréseknél (HTS), mivel a sferoidok polimerizált térhálóba ágyazva helyezkednek el, amelyek viszkozitása a hőmérséklettől függ. A HTS kivitelezhetőségének rovására írható fel még az is, hogy a sferoid formálódás során különböző méretű és alakú sferoidok is képződnek, melyek a különböző hatóanyagokkal történő kezelésre nem egyenletesen reagálnak, így hasonló behatásra eltérő eredményeket kaphatunk. Ezek a sferoidok, optimalizálás nélkül a folyadékkezelő robotokkal, mikrotitráló lemezolvasókkal és a mikroszkópiás képalkotással sem feltétlenül kompatibilisek, ami bonyolulttá teszi azok mérését és HTS elemzését [41]. Előnyük viszont az, hogy mivel számos sejtvonal ECM hiányában nem képes sejtaggregációra, így ezzel a módszerrel ezen sejtvonalakból is igen hatékonyan képezhetők MCS kultúrák további tanulmányozásra.

Mátrix nélküli MCS-ek (scaffold-free spheroids)

A mátrix nélküli MCS-ek létrehozása során ECM fehérjék és szintetikus polimerek hozzáadása nélkül történik a sferoidok előállítása. A képzésük során a sejteket olyan felületre helyezzük, ahol a felülethez való kitapadásuk gátolt, ezzel ösztönözve őket az egymáshoz való tapadáshoz, vagyis a sejtaggregációhoz. Az egymáshoz való tapadás következtében a sejtek fokozatosan átszerveződnek és polarizálódnak, valamint ECM termelésbe kezdenek és idővel komplex 3D szöveti struktúrát alakítanak ki maguk körül annak celluláris és nem celluláris összetevőivel együtt. A mátrix nélküli MCS kialakítására számos módszer létezik, ám

legelterjedtebb közülük az ultra alacsony tapadású mikrotitráló lemezek (ULA) használata [42] vagy a hagyományos lemezek agarral illetve agarózzal való felületkezelése [43]. Mindhárom módszer eredményesen használható a HTS hatóanyagszűrések során, mivel segítségükkel standard méretű és sejtszámú MCS-ek hozhatók létre [44]. A hordozó nélküli MCS úttörőjének számító függő-csepp módszer (hanging drop) számos tanulmányban bizonyította alkalmasságát [45,46]. Segítségével egy speciális sejtenyésztő lemez felületéről lógó tápfolyadék cseppekben formálódnak a kis MCS-ek. Mind a függő-csepp, mind az ULA lemezek egységes MCS-ek képződését eredményezik, ráadásul reakciólyukanként egy-egy darabbal [47,48,49], így ezek kompatibilisek a HTS szűrésre használt mikrotitráló lemez olvasókkal.

A függő-csepp módszer hátránya azonban, hogy annak manuális és robotikus kezelése is igen nehézkes, mivel a függő cseppek könnyen lehullanak mind a tápfolyadék utánpótlás-, mind a kezelések során. Az ULA lemezen formálódó MCS-ek létrehozásához azonban több időre van szükség, hogy a sejtek összeálljanak, így ennek gyorsítása céljából centrifugális erővel [50] vagy mágneses erővel [51,52] fokozható a sejtek kezdeti aggregációja. A hordozó nélküli MCS-ek tömegesen szuszpenziós tápoldatban is létrehozhatók, ehhez viszont speciális asztali inkubátorra (pl. BioLevigator™) és sejtenyésztő edényre (pl. LeviTube™) van szükség, amelyben a sejtek hordozón [53] vagy anélkül [54] való lebegésre kényszeríthetők. Adherens felület hiányában a lebegő sejtek az osztódásaik során egymáshoz fognak tapadni és végül nagy mennyiségű sferoidokat fognak létrehozni. A szuszpenziós tenyésztés másik formája pedig a rotációs sejtenyésztési rendszerek által (RCCS) előállított MCS-ek. Itt is hasonlóan az előző módszerhez lehetőség adódik nagyszámú MCS előállításra egyetlen folyadékkultúrában, ami alkalmassá teszi a rendszert speciális molekuláris biológiai vizsgálatokra, mint amilyen az RNSi vagy a CRISPR. Összeségében tehát elmondható, hogy a különböző módon előállított hordozó nélküli MCS-ek különböző vizsgálatokra alkalmasak és míg a függő-csepp és az ULA módszer igazi előnye, hogy HTS-ben hatóanyagszűrésre használható, addig a szuszpenziós tenyészetek előnye az, hogy azonos környezeti körülmények között tömeges sferoidok képzésre alkalmasak [53].

Mikrohordozók felületén növesztett MCS-ek

A mikrogyöngyön, vagy mikrohordozón való sejtnövesztés évtizedek óta ismeretes eljárás. Az előállításuk során biokompatibilis anyagból, általában polisztirolból vagy dextransból készült 50-200 µm átmérőjű gyöngyök felületét pozitívan töltik (pl. Cytodex-1), vagy ECM fehérjével borítják (pl. Cytodex-3), melyekre a sejtek könnyedén feltapadnak és osztódnak. Kezdetben főként Vero (afrikai zöld majom vese epitél) sejtjeinek a tömeges szaporítására használták [54] a virulencia vizsgálatok és a vakcina gyártás során [55,56], azonban az elmúlt időben több tanulmány foglalkozott azzal, hogy 3D tumorszferoid létrehozására alkalmazzák [57]. Az így létrehozott szferoidok előnye, hogy egy reakciócsőben számtalan közel azonos méretű multicelluláris tumorszferoid (MCTS) található, ami alkalmas nagy sejtömeget igénylő mérések biokémiai, sejtbiológiai, transzkriptomikai és proteomikai vizsgálatok elvégzéséhez. A mikrohordozó alternatívát jelenthet a HTS rendszerekben nehezen használható ECM-szerű hidrogélben növesztett sejtek HTS vizsgálatára, mivel a felületükön olyan sejtek is növekedni képesek, amelyek mátrix nélkül nehezen vagy nem képesek az aggregációra.

Mikrofluidikai chippek

A mikrofluidikai chippek használata hiánypótlónak számít az *in vitro* rákkutatásban, mivel segítségükkel modellezhető a MCS-ek körül áramló folyadékok dinamikája. Számos mikrofluidikai rendszer bizonyította eddig szerepét a 3D szferoidokkal végzett hatóanyagszűrésekben. Egy mikrofluidikai chip akár több ezer dokkoló helyet is szolgáltathat a 3D sejt-hidrogél részeknek, amelyeken számos tumorelles hatóanyag egyidejű hatása vizsgálható [58,59]. Ezen mikrofluidikai rendszerek mikrométer átmérőjű csatornákat tartalmaznak, amelyek lehetővé teszik a sejtenyésztési körülmények, vagy a hatóanyag kezelések dinamikus változtatását a tenyésztés során. További előnyük, hogy segítségükkel komplex, szövetszerű környezetben is végezhető vizsgálatok. Endotél sejtekkel bélelt mikrocatornái például képesek utánózni a tumor mikrokörnyezetében található kapilláris ereket, így tumorszferoidokkal együtt tenyésztve őket, képesek lehetnek a sejtek invazivitását és epitéliális-mezenchimális tranzícióját (EMT) vizsgálni [60]. A mikrofluidikai chippek bonyolult előállítása, költsége és nem standardizált protokolljai miatt jelenleg még nem terjedtek el széleskörben.

CÉLKITŰZÉSEK

Fő célom az volt, hogy meghatározzam, melyik *in vitro* sejttenyésztési mód modellezi legpontosabban a normál fizioiógias állapotot, amelyet akár nagyáteresztőképességű vizsgálatokban is használni lehet. A különböző 3D modellek összehasonlítását is elvégeztem a rutinszerűen használt hagyományos kétdimenziós sejttenyészetekkel.

Vizsgálataim során célul tűztem ki,

- a hagyományosan szélesztett egyrétegű sejt kultúrában növesztett egérből izolált hasnyálmirigy-szigetek sejtjeinek életképességét, glukagon és inzulin termelését összehasonlítani a RAFT kollagén mátrixba ágyazott háromdimenziós hasnyálmirigy-szigetek sejtjeivel,
- a különböző 2D és 3D tenyésztési körülmények között növesztett A549 humán tüdő karcinóma sejtek növekedési kinetikáját, életképességét, gén és fehérje expresszióját vizsgálni, majd összehasonlítani az *in vivo* szubkután beültetett A549 tumorokkal,
- humán MCF-7 és egér 4T1 emlő daganatsejtek 2D és 3D körülmények között tenyésztett formáinak életképességét megvizsgálni egy 42 komponensű hatóanyag könyvtár tesztelése során, valamint meghatározni a gyógyszerjelölt molekulák IC₅₀ értékét 2D és 3D növesztett sejteken.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Etikai engedély

Az összes egérvizsgálatot a nemzeti és nemzetközi előírások szigorú betartása mellett végeztük el. A hasnyálmirigy sejtek izolálása során felhasznált állatokat a 42/2015 számú állatkísérleti engedély birtokában végeztük, a xenograft tüdőtumor előállítását pedig a XXIX./128/2013-as nyilvántartási számú állatkísérlet végzésére szóló engedély birtokában hajtottuk végre.

Alkalmazott sejtek

A kutatás során frissen izolált egér hasnyálmirigy sejtekkel (CD-1 123® Charles River), valamint három daganatos sejtvonallal dolgoztunk. A háromdimenziós szferoidok jellemzése és összehasonlítása során A549 humán nem kissejtes tüdőkarcinóma sejtvonalat használtuk (ATCC), míg a 42 komponensű molekulakönyvtár citotoxicitás vizsgálatánál a humán MCF7 emlőkarcinóma (ATCC) és az egér 4T1 emlőkarcinóma sejteket (ATCC). Az sejtvonalakat 95% páratartalom és 5% CO₂ mellett 37 °C fokon szaporítottuk fel, standard sejtenyésztési körülmények között.

Kétdimenziós sejtenyésztés

A kétdimenziós sejtenyésztések T-75 sejtenyésztő flaskákban (Primo® TC flask 75 cm², EuroClone S.p.A.), valamint 96-lyukú mikrotiter tenyésztőlemezen (Tissue Culture Plates-96 Wells, Flat bottom, Orange Scientific) történtek standard tenyésztési körülmények között. A felhasznált sejtenyésztő mikrotiter lemezek, valamint a T-75 sejtenyésztő flaskák 50%-át előzőleg 0,1% I-es típusú kollagénnel (Collagene Type I, C3867, Sigma-Aldrich) felületkezeltük. Az A549 humán nem kissejtes tüdőkarcinóma sejtvonalat és az MCF7 humán emlőkarcinóma sejteket 4,5 g/L glükóztartalmú DMEM/F12 (DMEM, PANBiotech; F12 Nut mix, Gibco, Life Technologies) tápoldatban 10% borjúsérum (FBS, Gibco, Life Technologies), 1xGlutaMAX™ (Gibco, Life Technologies) valamint 1% Pen/Strep antibiotikum (Penicillin G sodium salt, and Streptomycin sulfate salt, Sigma-Aldrich) tartalommal szaporítottuk fel. A 4T1 egér emlőrák sejteket pedig RPMI (RPMI-1640, Gibco) 10% borjúsérummal kiegészített tápoldatban növesztettük, amely szintén 1xGlutaMAX-ot és 1% Pen/Strep antibiotikumot tartalmazott.

Hasnyálmirigy-szigetek (isletek) izolálása és fenntartása

A hasnyálmirigy-szigetek izolálása Prof. Dr. Dinnyés András kollaborációs partnerünk laboratóriumában történt. Az egereket (CD-1 123, Charles River) a nyaki diszlokáció után 70% etanollal lefertőtlenítettük (Molar Chemicals), majd hasüregüket feltártuk és a hasnyálmirigyüket eltávolítottuk. A hasnyálmirigyeket ezután HBSS tápoldatba helyeztük (HBSS, w/o phenol red, Sigma-Aldrich), a zsírszövetet eltávolítottuk és a szerveket néhány milliméter átmérőjű darabokra vágtuk. Ezután a darabokat kollagenáz enzim oldatába (Collagenase powder IX, Sigma-Aldrich; 2 mg / hasnyálmirigy) helyeztük és a hasnyálmirigy sejtszigeteket kiemésztettük a környező szövetből. Az enzimátikus emésztést 12 percig végeztük folyamatos kevertetés mellett 37 °C hőmérsékleten. Ezután a szuszpenzióból a hasnyálmirigy-szigeteket 8 másodpercig 1000 rpm-en kiülepítettük és visszavettük MES tápoldatba (egér embrionális őssejt által kondicionált ESC médium). Az egyedi szigetek kigyűjtése 27G tűvel (Becton-Dickinson) történt 60 mm-es Petri csészékbe (Corning Life Sciences). A tápoldatot naponta cseréltük.

ECM-szerű mátrixban növesztett MCS-ek előállítása RAFT™ sejtenyésztési módszerrel

A 3 napos izolált egér hasnyálmirigy sejtszigetekkel és az A549 humán tüdőkarcinóma sejtekkel kialakított 3D hidrogélek előállítását a gyártó által javasolt utasítást követve készítettük el RAFT™ abszorbens hengereket használva 96-lyukú mikrotiter tenyésztőlemezekben (RAFT™, TAP Biosystems). A kollagén, sejtenyésztő médium és sejtuszuszpenzió keverékéből 240-240 µl-t kiraktunk külön lyukakba (4000 sejt/lyuk), majd 15 perc szövettenyésztő inkubátorban (5% CO₂, 37 °C) való kollagén-hidrogél inkubáció után, további 15 percre a lyukakba helyeztük a speciális abszorbens hengereket, hogy a kialakult hidrogélek felszínéről a szabad folyadékot leszívják, valamint a kialakult hidrogéleket összetömörítsék 100-120 µm vastagságú tömör sejt-kollagén korongokká, melyekhez 200 µl tápfolyadékot adtunk. Ezután a 96-lyukú mikrotiter tenyésztőlemezeket standard körülmények között tenyésztettük tovább 37 °C fokon, 5% CO₂ mellett inkubátorban.

Mikrohordozók felületkezelése

A 3D sejtenyésztések során két típusú mikrohordozó gyöngyöt használtunk. A Cytodex-3 dextrán mikrohordozók (Cytodex® 3 microcarrier beads, Sigma-

Aldrich) felülete gyárilag denaturált sertés bőr kollagénnel volt felületkezelve. A másik típusú mikrohordozót, NutriSphere (Hamilton) a laboratóriumunkba felületkezeltük I-es típusú kollagénnel. Ehhez 2 ml NutriSphere mágneses gyöngyöt szilanizált (Silanization solution, Sigma-Aldrich) üvegcsébe helyeztük, majd steril desztillált vízzel mostuk. Ezután a gyöngyöket MOPS pufferbe helyeztük (0,1M MOPS, pH 5,0, Sigma-Aldrich). A gyöngyök felületaktiválása EDC/NHS reagenssel történt, amely 600 mM EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, Sigma-Aldrich) és 200 mM NHS (N-hydroxysulfosuccinimide, Sigma-Aldrich) tartalmazott 0,1 M-os pH 5,0 MOPS pufferben. Az aktiválást szobahőmérsékleten végeztük 20 percig, majd semleges kémhatású foszfát pufferrel (Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich) lemostuk a gyöngyöket. Ezután a felületkezélést 1 ml végtérfogatú 5 mg/ml kollagén tartalmú oldattal végeztük (Collagen type I, Sigma-Aldrich) egy éjszakán át állandó kevertetés mellett, szobahőmérsékleten. Végül foszfát pufferes mosás után a kollagén-borított mikrohordozókat pH 7,0 foszfát pufferben kihígítottuk és autoklávoztuk (121 °C, 15 perc), majd felhasználásig 4°C-on tároltuk.

Mikrohordozók felületén növesztett és mátrix nélküli MCTS-ek előállítása szuszpenziós sejtenyésztési módszerrel

Az A549 sejteket szuszpenziós körülmények között háromféleképpen tenyésztettük. Cytodex-3 dextrán mikrohordozó gyöngyök felületén, NutriSphere (Hamilton) kollagén felületborított mágneses gyöngyökön és mikrohordozó gyöngyök nélkül. A sejtek tenyésztéséhez egy erre a célra kifejlesztett bioreaktor-inkubátor hibrid rendszert használtunk (BioLevigator™, Hamilton). A mikrohordozókon növesztett sejtek kiindulási sejtszámát felület és térfogat ekvivalensen határoztuk meg. Azaz annyi mikrohordozó gyöngyöt tettünk a tenyésztő edénybe amennyinek azonos volt a felülete a T-75-ös sejtenyésztő flaska felületével, mivel a 2D kísérleteink során ezeket használtuk. A térfogat ekvivalencia érdekében pedig azonos térfogatú tápoldatban tenyésztettük a sejteket a 2D és a 3D tenyésztési módok során is. A Cytodex-3 mikrohordozó gyöngyök átmérője 175 µm, felületük 200 – 230 cm²/ml, a Nutrisphere átmérője 65 µm, felületük 125 cm²/ml volt. Ahhoz, hogy tartani tudjuk a felület/térfogat arányt a 75 cm² felületű T-75 tenyésztőflaskával, a LeviTube (BioLevigator™, Hamilton) speciális tenyésztő csövekhez az inokulálási lépés során 350 µl Cytodex-3 és 602 µl Nutrisphere

mikrohordozót adtunk. Minden tenyésztési mód során, egységesen 1×10^6 kiindulási sejtszám mellett döntöttünk. A BioLevigatorban való MCTS formálódása során az inokulációs fázis 5 óra volt; 0 másodperc rotációs szünettel; 1 másodperces rotációs periódussal; valamint 20 perces agitációs szünettel; 50 rpm rotációs sebességgel és 5 perces agitációs periódussal. Az MCTS szaporításának fázisa pedig 9 napig tartott, 0 másodperc rotációs szünettel; 1 másodperces rotációs periódussal; 75 rpm rotációs sebességgel. A speciális LeviTube sejtenyésztő csövek 40 ml DMEM/F12 sejtenyésztő médiummal voltak töltve, amelyek 10% szérummal és 1X GlutaMAX-ot, valamint 1X PenStrep antibiotikumot tartalmaztak. A tápfolyadék csere 72 óránként történt, centrifugálás után (1200 g, 10 perc) az ösztérfogat 50%-ának friss tápoldattal való cseréjével.

Mátrix nélküli MCTS-ek előállítása ULA módszerrel

A hagyományosan felszaporított MCF-7 és 4T1 sejteket tripszin segítségével felemésztettük, majd foszfát pufferrel megmostuk és a 6000 sejt/80 μ l tápoldat koncentrációban reakciólyukanként szétosztottuk U- aljú sejttaszító 96-os reakciólemezekre (Cellstar® Cell-Repellent Microplate, Greiner Bio-One). Az aggregálódás elősegítése céljából a reakciólemezeket 1200xg segítségével 10 percig üleptítettük, majd a lemezeket 24 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk, 5% CO₂ koncentráció mellett. A lemezeket 24 óra elteltével fénymikroszkóp segítségével ellenőriztük, hogy kialakultak-e a többsejtes aggregátumok, majd azokat a citotoxicitási vizsgálatokhoz különböző hatóanyagokkal megkezeltük.

Élő sejtszám meghatározás tripánkék festéssel

A sejtek életképességét, azaz a sejtmembrán sértetlenségét 1:1 arányú 0,4% tripánkék (T8154, Sigma-Aldrich) oldattal vizsgáltuk. A sejtek életképességét a tenyésztőfelületről való leemésztésük, majd mosásuk után közvetlenül meghatároztuk Bürker kamra segítségével (Sigma-Aldrich), inverz fénymikroszkóp (Zeiss, DE) alatt és az élő sejtek számát százalékban kifejeztük.

Sejtek életképességének meghatározása resazurin alapú enzimaktivitás méréssel

A resazurin enzimaktivitásának a mérését már publikált módszer által végeztük a kísérleteink során [61]. Az A549 sejtek életképességét 10 napon át az élő sejtek enzimaktivitásán alapuló resazurin (R7017n, Sigma-Aldrich) próbával

határoztuk meg. Az enzimreakció a resazurin redukcióján keresztül narancs-fluoreszcens resorufin képződéséhez vezet, amely fluoriméterrel detektálható és általa a relatív fluoreszcencia értéke (RFU) meghatározható. A 0,15 mg/ml-es töménységű reakcióoldatot 1:5 arányú hígításban tettük a sejtek tenyésztő oldatához, majd 37 °C-on két és tizenkét órán át inkubáltuk (2D sejttenyészetek esetében 2 óra, 3D sejttenyészetek esetében 12 óra). A keletkező resorufin mennyiségét mikrotiter lemez olvasó (CytoFluor Series4000 Multi-Well Plate Reader, PerSeptive Biosystems) segítségével 530 nm excitációs és 580 nm emissziós hullámhossz mellett detektáltuk.

Az MCF-7 és 4T1 sejtek életképességének a vizsgálata is hasonlóan történt, azonban mind a 2D mind a 3D sejt kultúrákat a resazurin mérést megelőző 72 órával növekvő koncentrációjú tesztvegyületekkel kezeltük (156 nM – 100 µM, maximum DMSO koncentráció 0,4%). Így ezek esetében a sejtek életképességét 72 órás inkubálás után határoztuk meg.

Apoptózis vizsgálata citofluorimetriával

Az apoptózis vizsgálatot már ismert módszer alapján végeztük el [62]. Röviden a különböző tenyésztési feltételek mellett növesztett A549 sejteket egysejt szuszpenzióra emésztettük akutáz enzimmel (Accutase™, Corning), majd Annexin V kötő pufferbe szuszpendáltuk (0,14 M NaCl, 0,01 M HEPES, and 2,5 mM CaCl₂). Ezután a sejtekhez Annexin V-Alexa Fluor™ 488-at (AnnV, Life Technologies, 2,5:100) adtunk és 15 percre fénytől védve, szobahőmérsékleten inkubáltuk. Mérés előtt propidium-jodiddal (PI, Sigma-Aldrich; 10 µg/ml) tettük pontosabbá az élő sejtek elkülönítését. Mosás után a sejteket FACSCalibur cytofluorimeter (Becton Dickinson) segítségével vizsgáltuk. Az FL1 (Annexin V-Alexa Fluor™ 488) negatív és FL3 (propidium iodide) negatív élő sejtek; az FL1 pozitív és FL3 negatív korai apoptotikus sejtek; FL1 negatív és FL3 pozitív nekrotikus sejtek; valamint az FL1 pozitív és FL3 pozitív késői apoptotikus sejtek eloszlási százalékát határoztuk meg.

Sejtciklus analízis

A különböző tenyésztési körülmények között növesztett sejt kultúrákat először 1 mg/ml IV-es típusú kollagenázzal (Collagenase Type IV, Sigma-Aldrich) emésztettük. Ahhoz, hogy a tenyészetek egyedi sejtekre essenek, a 3D MCTS-ek esetében 30 percig, míg a 2D kultúrák esetében 5 percig tartó emésztésre volt

szükség 37 °C-on, állandó kevertetés mellett. A RAFT minták előkészítése során 12 korong egybegyűjtésére volt szükség azért, hogy elegendő sejtet tudjunk belőlük kinyerni. A citometriai vizsgálatot már jól ismert módszer alapján végeztük el [63]. Röviden, a kísérlet negyedik, valamint a kilencedik napján minden kultúrából kinyertünk 50.000 A549 sejtet, amelyet foszfát pufferben mostunk és DNS kötő pufferbe felvettünk (1X foszfát puffer, 0,1% tri-nátrium-citrát, 10 g/ml propidium-jodid, 0,1% Triton X-100, 10 µg/ml RNáz-A, Sigma-Aldrich), majd 30 perc szobahőmérsékleten való inkubáció után a sejteket FACSCalibur citofluoriméter (Becton Dickinson) segítségével lemértük. A szub-G1 apoptotikus populációt FL3 hisztogramon vizsgáltuk CellQuest szoftver segítségével (Becton Dickinson). A sejtciklus meghatározást Modfit szoftver segítségével (Modfit v3.2, Becton Dickinson) végeztük, a dupleteket (FL2-A/FL2-W) és a sejttörmelékét pedig kikapuztuk, kizártuk a további sejtciklus-elemzésből.

Konfokális lézer szkennig mikroszkópia

Az egér hasnyálmirigy-szigetek, valamint az A549 sejtől készített monolayer (2D) kultúrák vizsgálata során gyári és általunk 0,1% patkány I-típusú kollagén előkezelte 96 lyukú sejtenyésztő edényre ültettük ki a sejteket (4000 sejt/lyuk), valamint a RAFT™ korongokat a gyártó (TAP Biosystems) utasítása szerint elkészítettük és 37 °C-on 5% CO₂ mellett 72 órán, valamint 240 órán át inkubáltuk. A mintákat PBS-sel mostuk és kalcein kötő pufferben (1,2 mM CaCl₂ 0,5 mM MgCl₂ PBS-ben oldva) 1 µM kalcein-ibolyával (Life Technologies, Invitrogen, Molecular Probes) 30 percig inkubáltuk. A mintákat ezután Annexin V kötő pufferrel mostuk és Annexin V-Alexa Fluor™ 488-cal (Life Technologies, 2,5:100) 15 percet fénytől védve, szobahőmérsékleten inkubáltuk. A mikroszkópos vizsgálat előtt (Olympus FV-1000) itt is propidium-jodiddal (PI, Sigma-Aldrich; 10 µg/ml) tettük pontosabbá az élő sejtek elkülönítését (Fluoview szoftver).

Az egér hasnyálmirigy sejtek glukagon és inzulin szekrécióját pedig párhuzamos mintákon fluoreszcensen jelölt glukagon- és inzulin- ellenes ellenanyagokkal vizsgáltuk formalin fixált és permeabilizált sejteken (anti-glukagon 1:50 (N-17) és anti-inzulin 1:100 (H-86), Santa Cruz Biotechnology).

A549 Xenograft Tumor Modell előállítása

Az *in vivo* A549 tumorok előállításához 10^6 A549 sejtet injektáltunk bőr alá 100 μ l szérum mentes DMEM/F12 tápoldatban, 8 hetes immundeficiens NOD SCID egerekbe (Innovo Ltd.) A génexpressziós mérésekhez négy héttel később, amikor a tumorok térfogata elérte a 80-100 mm^3 az állatokat kiltattuk ($n=3$) és a szubkután tumorokat eltávolítottuk az expressziós vizsgálatokhoz. Az egysejt tömegcitometriás CyTOF vizsgálatokhoz pedig (Helios, Fluidigm) szintén 8 hetes immundeficiens NOD SCID egerekbe oltott A549 *in vivo* tumorokat használtunk ($n = 6$), de a tumorokat egy korai, nem nekrotizált (80-100 mm^3) és egy késői, részben nekrotizált stádiumában (1000-1200 mm^3) távolítottuk el az állatokból, majd dolgoztuk fel.

Génexpressziós vizsgálatok

Az *ex vivo* hasnyálmirigy-szigetek expressziós vizsgálatához öt gén kifejeződését határoztuk meg, öt biológiai párhuzamost használva (Roche, LightCycler Nano) [64]. Az A549 xenograft *in vivo* tumorok és különböző tenyésztési feltételek mellett növesztett *in vitro* A549 sejttenyészetek génkifejeződési, mRNS profilját pedig több módszerrel is vizsgáltuk. A kétdimenziós sejtkultúrák és az *in vivo* xenograft tumorok expressziójának összehasonlításához 624 gén expressziós szintjét mértük (Applied Biosystems™, TaqMan® OpenArray®, Human Cancer Panel), majd a különböző *in vitro* két és háromdimenziós kultúrák gén expressziós mintázatának vizsgálatához pedig 64 általunk kiválasztott gén kifejeződését mértük (Roche, LightCycler 1536) [65].

A vizsgálatok során kapott Ct értékeket ACTB és GAPDH háztartási génre normalizáltuk. A relatív génexpresszió arányt pedig génexpressziós változás (fold change) vagy $\Delta\Delta\text{Ct}$ (\log_2) értékkel ábrázoltuk \pm standard szórással. A kapott eredményeket GraphPad Prism programmal ábrázoltuk.

Egysejt tömegcitometriás (CyTOF) vizsgálatok

Az A549 sejteket a következő szövettenyésztési körülmények között tartottuk fenn:

- A. Rövid- (4 nap) és hosszú távú (9 nap) *in vitro* kultúrák:
 - a. standard szövetkultúra (10 mm átmérőjű sejttenyésztő Petri-csésze és T-75-ös szövettenyésztő flaska, 2D egyrétegű),

- b. kollagén felületkezelt tenyésztőcsészében szaporított standard szövetkultúra (10 mm átmérőjű sejtenyészet Petri-csésze és T-75-ös szövettenyésztő flaska, kollagénnel kezelve, 2D egyrétegű)
 - c. Cytodex3-on mikrohordozón nőtt 3D MCTS-ek
 - d. Nutrisphere mikrohordozón nőtt 3D MCTS-ek
- B. NOD SCID egerekbe injektált *in vivo* tumorok:
- a. korai stádiumú (80-100 mm³)
 - b. késői stádiumú (1000-1200 mm³)

A fent felsorolt tenyészetek fehérje analízisére 13 féle, stabil fémizotóppal konjugált, monoklonális ellenanyagokat használtunk (1. táblázat).

Katalógusszám	Forgalmazó	Célgén	Fémjel
3144017B	Fluidigm	HLA-A,B,C	¹⁴⁴ Nd
3141006B	Fluidigm	CD326 (EpCam)	¹⁴¹ Pr
3148012B	Fluidigm	TRA-1-60	¹⁴⁸ Nd
3149018B	Fluidigm	CD66-a,c,e	¹⁴⁹ Sm
3156026B	Fluidigm	CD274 (PD-L1)	¹⁵⁶ Gd
3162027A	Fluidigm	Pan-Keratin	¹⁶² Dy
3166007B	Fluidigm	CD24	¹⁶⁶ Er
3170009B	Fluidigm	EGFR	¹⁷⁰ Er
3153026B	Fluidigm	Gal3	¹⁵³ Eu
MAB2188-100	R&D Systems	CA9	¹⁵⁸ Gd
MAB1418	R&D Systems	Glut1	¹⁵⁴ Sm
sc-376140	Santa Cruz Biotech.	MCT4	¹⁷¹ Yb
orb357227	Biorbyt	TMEM45A	¹⁶⁹ Tm

1. táblázat A felhasznált antitestek listája a forgalmazó, célfehérje és a konjugált fém feltüntetésével

A minták előkészítése során a tenyészeteket akkutázzal (Roche) egyedi sejtekre emésztettük majd foszfát pufferrel mostuk. Az *in vivo* tumorok emésztése is hasonlóan történt, de azokat előbb olló és csipesz segítségével néhány milliméteres darabokra vágtuk. Ezután a mintákat 100 µm-es sejtszűrőn átszűrtük (CellStrainer,

VWR) és foszfát pufferrel átmostuk. Mosás után az élő sejteket Bürker kamrában, tripánkék festék segítségével leszámoltuk, majd a tenyészetből három biológiai ismétlést felhasználva poolokat készítettünk, amelyek 3-3 millió sejtet tartalmaztak. Ezután a sejtek életképességét ciszplatin (5 μ M 195Pt, Fluidigm) festéssel (3 perc inkubálás jégen hűtve) határoztuk meg citofluorimetrián, majd a sejteket 1500 μ l MCSB Maxpar sejtfestő pufferrel (Maxpar® Cell Staining Buffer, Fluidigm) kimostuk, 350g -n 5 percig lecentrifugáltuk és a sejteket 50 μ l MCSB Maxpar sejtfestő pufferrel visszavettük. Ezután a sejtekhez további 50 μ l térfogatban antitest keverékeket adtunk az 1. táblázatban szereplő antitestekből. 60 perc szobahőmérsékleten történő inkubáció után az antitesteket átmostuk és centrifugáltuk 2 ml MCSB-vel 300g-n 5 percig. A fixálásához 16%-os formaldehidből (ThermoFisher) 1,6%-osat hígítottunk foszfát pufferrel, majd szobahőmérsékleten inkubáltuk 10 percig. Ezután a mintákat lecentrifugáltuk 800g-n 5 percig. Sejt ID DNS interkalátort (125 μ M 191/193 Iridium, Fluidigm) 1000-szeresen hígítottunk Maxpar Fix (Fluidigm) és Permmel (Fluidigm) és éjszakára 4°C-on hagytuk inkubálódni. Másnap a sejteket mostuk és centrifugáltuk 800 g-n 5 percig, először 2x1 ml MCSB-vel, majd 1000 μ l foszfát pufferrel. Bürker kamrában megszámloltuk a sejteket és a sejtszámnak megfelelően (0,5 x 10⁶) CAS-t (Cell Acquisition Solution, Fluidigm) adtunk hozzájuk 10% EQ Calibration Bead-del majd a sejteket 30 μ m-es steril filteren átszűrtük és lemértük (Helios, Fluidigm). Az FCS fájlokat Cytobankban (Beckman Coulter) értékeltük ki.

Klaszteranalízis

A hierarchikus klaszteranalízist a Gene Cluster 3.0 szoftver (Tokiói Egyetem, Tokió, JP) segítségével végeztük el a különböző tenyésztési körülmények között tenyésztett A549 sejtek expressziós adataiból ($\Delta\Delta$ CT, log₂ értékek).

Statisztikai analízis

A statisztikai elemzéseket a GraphPad Prism 6 (Sandiego, Kalifornia, USA) és a Microsoft Excel segítségével végeztük. Két csoport közötti szignifikancia kimutatására páros Student-féle t-tesztet hajtottunk végre, amelyet az ábra feliratokon vagy az ábra magyarázatokban fel is tüntettünk. Az adatokat matematikai átlag +/- standard szórás (SD) jelenítettük meg.

Grafikai illusztrációk

A grafikai ábrák szerkesztéséhez az BioRender online grafikai szoftvert (app.biorender.com) valamint a Microsoft PowerPoint szoftvert használtuk.

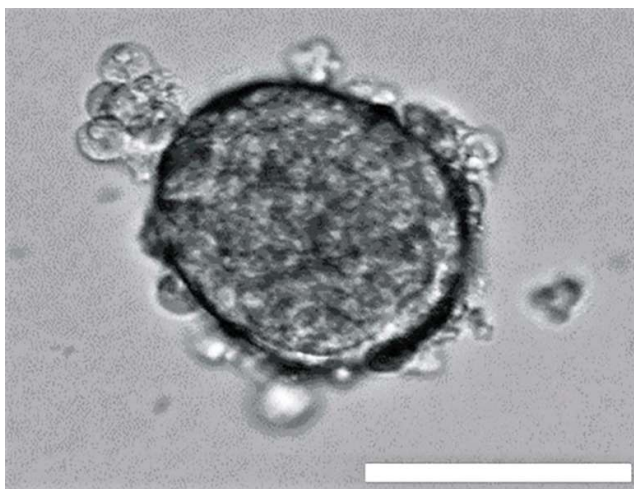
EREDMÉNYEK

TÉZIS 1.

Hagyományosan szélesztett egyrétegű vagy szuszpenziós sejt kultúrában növesztett hasnyálmirigy-szigetekkel szemben a háromdimenziós kollagén mátrixba ágyazott hasnyálmirigy-szigetek életképessége, glukagon és inzulin termelése emelkedett

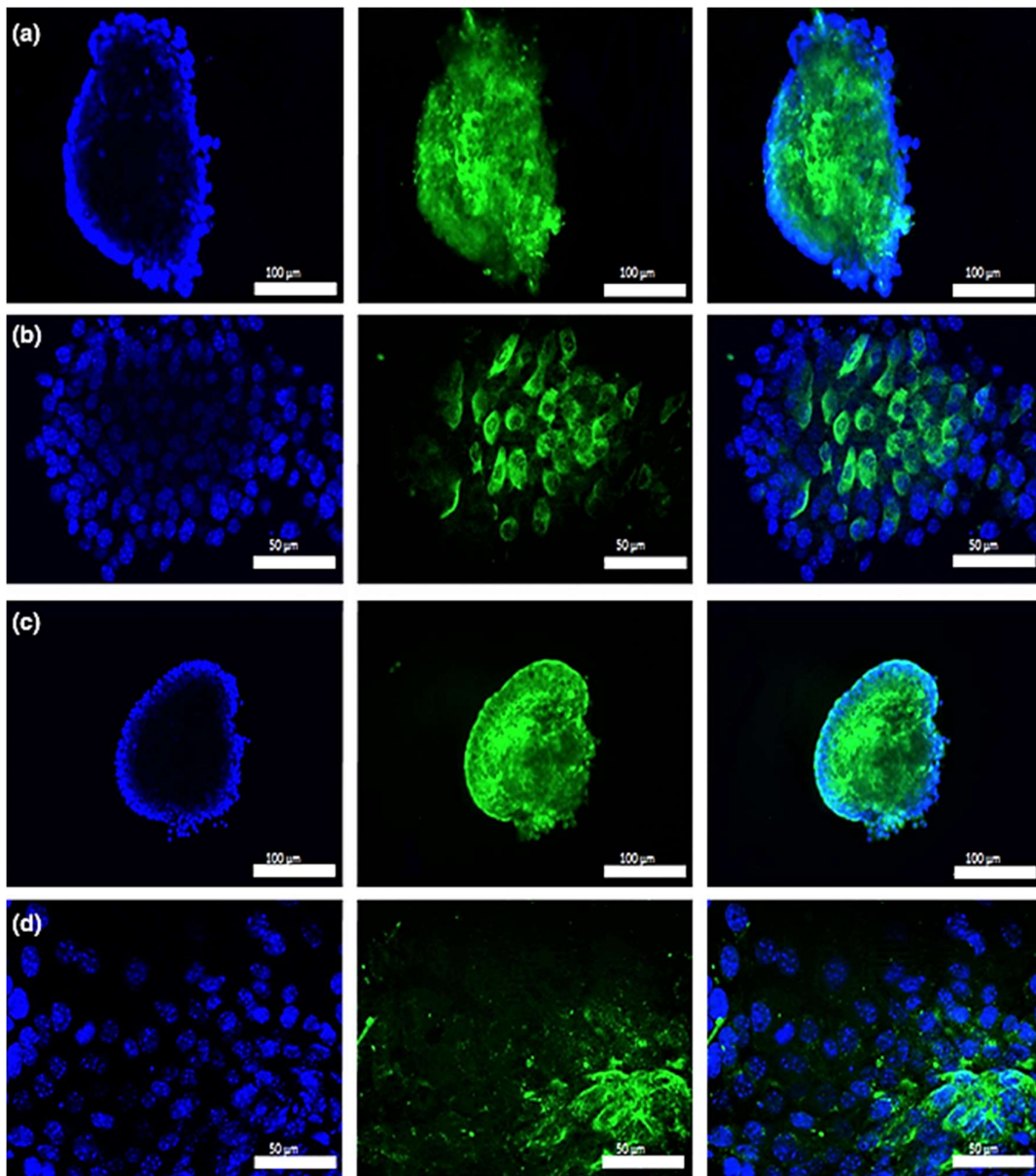
Hasnyálmirigy-szigetek (isletek) azonosítása

A hasnyálmirigy-sejtszigetek morfológiáját az izolálás során mikroszkóp alatt ellenőriztük. Az alkalmazott kollagenázzal való emésztés eredményeként intakt hasnyálmirigy-szigeteket tudunk kinyerni, mint az a fénymikroszkópos képen is látható (4. ábra). A szigetek izolálását Dr. Tánczos Zsuzsanna (Biotalentum Kft.) végezte és adta át további vizsgálatokra csoportunk részére.



4. ábra Izolált egér hasnyálmirigy-szigetek reprezentatív képe. Méretjelölő: 100 μm .
(a Biotalentum Kft engedélyével)

Ahhoz, hogy meggyőződjünk az izolált szigetek glukagon (5. ábra a és b) és inzulin (5. ábra c és d) termeléséről, a szigeteket immunfluoreszcens festékek segítségével jelöltük, majd közvetlenül az izolálás után megvizsgáltuk. Ahhoz, hogy a szigetek kontúrjai kirajzolódjanak a sejtmagokat is láthatóvá tettük DAPI sejtmagfesték segítségével a könnyebb azonosítás céljából (5. ábra).



5. ábra Az egér hasnyálmirigy-szigeteinek azonosítása közvetlenül az izolálást követően történt, immunfluoreszcens (IF) festéssel. Glükagon (a és b, zöld) és inzulin (c és d, zöld) IF festést végeztünk a szigeteken, DAPI-val pedig a sejtmagokat (kék) jelöltük. Méretskála 100 μm (a és c), 50 μm (b és d). (a Biotalentum Kft engedélyével)

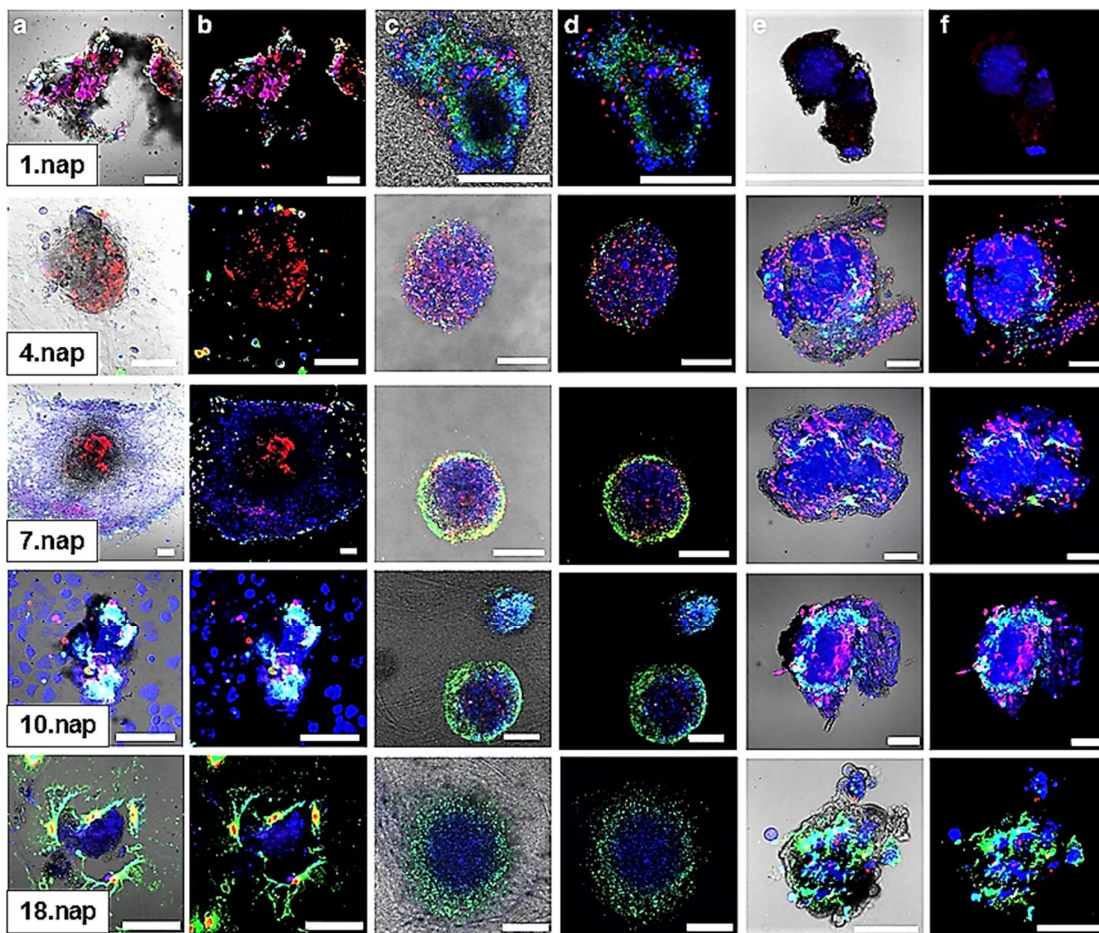
Az eredményeket az irodalmi adatokkal összehangban találtuk, azaz esetünkben is az egérből izolált hasnyálmirigy-szigetek több inzulin termelő béta-sejtet tartalmaztak (5. ábra c) mint glükagon termelő alfa-sejtet (5. ábra a) [66]. Az inzulinfestés során az általunk izolált egér hasnyálmirigy-szigetekben is jól megfigyelhető volt a Suckale and Solimena által rágcsálókban leírt karakterisztikus inzulinmag mintázat (5 ábra c) [67].

A hasnyálmirigy-szigetek MCS morfológiája és életképessége

Az egér hasnyálmirigy-szigetek morfológiáját és életképességét a különböző tenyésztési körülmények között 18 napig követtük nyomon. A RAFT™ kollagén mátrixba ágyazott MCS-eket (6. ábra c és d oszlop) a hagyományos csészében növesztett („monolayer”) szigetekkel (6. ábra a és b oszlop), valamint a szuszpenziós kultúrákkal (6. ábra e és f oszlop) hasonlítottuk össze. Ahhoz, hogy láthatóvá tegyük a szigetek integritását, a világos látóterű képeket (6. ábra a, c és e oszlop) és a fluoreszcens képeket összeillesztettük (6. ábra b, d és f oszlop).

A szigetek élő sejtjeit Calcein-AM (kék) festékkel, a korai-apoptotikus sejteket Annexin V Alexa Fluor™ 488 (zöld) festékkel a halott sejteket pedig propidium-jodid (piros) festékkel jelöltük. Az Annexin V képes a foszfatidil-szerin átfordulást, így az apoptózist kimutatni, a propidium-jodid pedig a késői apoptózist (kettős pozitivitás esetén), valamint a nekrozist jelölni [68,69]. A negyedik és a hetedik nap között folyamatos morfológiai változásokat tapasztalhattunk a monolayer kultúrában. A fibroblaszt-szerű sejtek lassú kivándorlását figyelhettük az idő múlásával (6. ábra a és b oszlop) ellentétben a RAFT™ MCS-eivel, ahol a szigetek a morfológiájukat mindvégig megőrizték (6. ábra c és d oszlop). A tizedik és a tizennyolcadik nap között az egyrétegű sejt kultúrák szigetszerű integritása tovább lazult (6. ábra a és b oszlop), azaz a fibroblaszt-szerű sejtek kivándorlása továbbra is megfigyelhető volt a szigetekből, míg a RAFT™ szigetek integritása továbbra is megmaradt (6. ábra c és d oszlop). Ezek az eredmények azért is fontosak, mert a hasnyálmirigy-szigetek morfológiájának fenntartása kritikus fontosságú az átültetés utáni graft-funkció és a revaszkularizáció fennmaradásához [70,71]. A Calcein-AM festék intenzitása arányos a sejten belüli észteráz aktivitással, így a sejtek életképességével is. A RAFT™ kollagénmátrixba ágyazott szigetek Calcein-AM jelintenzitása a kísérlet tizennyolc napja alatt stabilan magasabb maradt a hagyományos 2D kultúrához képest, továbbá a jel lokalizációja a szigetek központi régiójából származott, amely a szigetek magjának elégséges oxigén és tápanyagellátottságára utalt (6. ábra c és d oszlop). Az egyrétegű tenyészetekben főként a fibroblasztszerű sejtek mutattak Calcein-AM jelölődést, mivel a szigeteket a tenyésztés hetedik napjára szétestek és a sztrómát alkotó fibroblasztszerű sejtek túlnőttek a tenyészetben (6. ábra a és b oszlop).

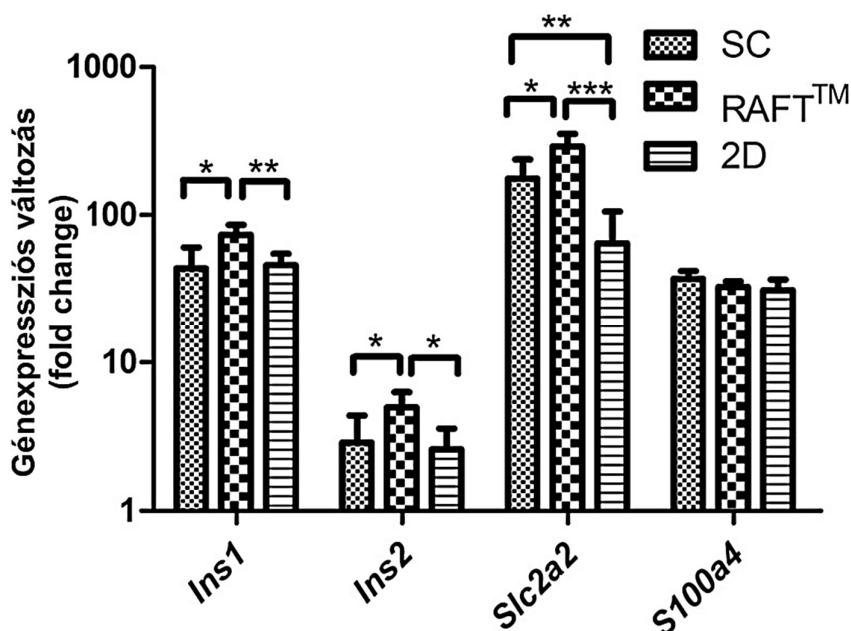
A standard szuszpenziós tenyészetben fenntartott egér hasnyálmirigy-szigetek a RAFT™ szigetekhez hasonlóan, megőrizték sferoid morfológiájukat, azonban a tenyésztés hetedik napja után a propidium-jodid pozitív nekrotikus régiók halmozódást mutattak (6. ábra e és f oszlop). A 2D hasnyálmirigy-szigetek az első négy napban többnyire nekrotikusan károsodtak, amit a negyedik napig tartó masszív propidium-jodid festés igazolt is a mintáinkban (6. ábra a és b oszlop), ellentétben a RAFT™-ba ágyazott szigetekkel, ahol a sferoidok főként csak szórt és alacsony intenzitású Annexin V festést mutattak és azt is főként a szigetek periferiáján, végig a tizennyolc napos tenyészidőszak alatt.



6. ábra A hasnyálmirigy-szigetek életképességének és morfológiájának vizsgálata különböző tenyésztési körülmények között. Az ábrán feltüntetett időpontokban konfokális pásztázó mikroszkóp segítségével detektáltuk az egyrétegű kultúrák (a és b oszlopok), a RAFT™ kultúrák (c és d oszlopok) és a szuszpenziós kultúrák (e és f oszlopok) fluoreszcens jelintenzitását. A szigetek integritásának vizsgálata érdekében a világos látómezővel készült képeket (a, c, e oszlopokat) egyesítettük a hozzájuk tartozó fluoreszcens képekkel (b, d, f oszlopok). Az élő sejteket Calcein-AM (kék), az apoptotikus és már elhalt sejteket pedig Annexin V Alexa Fluor 488 (zöld) és propidium-jodid (piros) festéssel jelöltük (n=3). Méretskála: 100 µm

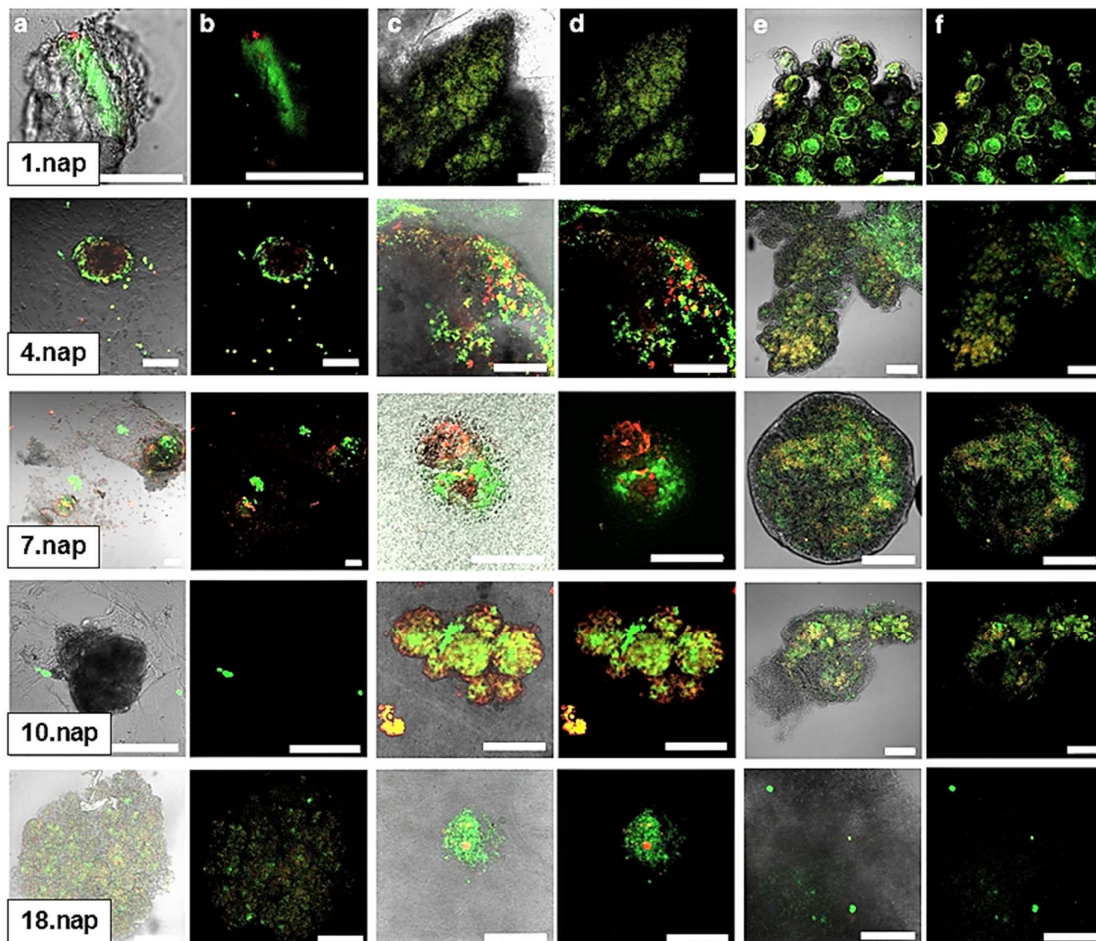
Az RAFT™ mátrixba ágyazott szigetek inzulin expressziójának a vizsgálata

Annak érdekében, hogy a hasnyálmirigy-szigetekre jellemző gének (inzulin-1: *Ins-1*; inzulin-2: *Ins-2*; glükagon: *Gcg*; glükóz transzporter-2: *Slc2a2*; és fibroblaszt specifikus fehérje-1: *S100a4*) kifejeződését vizsgálni tudjuk, kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR) méréseket végeztünk. A szuszpenziós kultúra (SC), a RAFT™ kollagén mátrixba ágyazott szigetek (RAFT™) és a hagyományos egyrétegű kultúra (2D) génkifejeződési eredményeit összehasonlítottuk egymással, majd a gének kifejeződését a SC első napján mért génkifejeződésére normalizáltuk. A RAFT™ szigetek esetében szignifikáns növekedést tapasztaltunk az *Ins-1* gén kifejeződésében mind az SC (* $p < 0,05$) mind a 2D tenyészethez (** $p < 0,01$) viszonyítva, továbbá az *Ins-2* gén kifejeződése is szignifikánsan magasabb volt a RAFT™ kulturákban az SC (* $p < 0,05$) és a 2D-hez (* $p < 0,05$) képest is (7. ábra). Habár az immunfluoreszcens festés magas glükagon jelet mutatott a RAFT™ szferoidokban a tizedik napig (8. ábra c és d oszlop), a *Gcg* gén expressziója közel mérhetetlenül alacsony volt minden tenyésztési körülmény között. A hasnyálmirigy glükóz szenzoraként ismert Glut-2 transzporter fehérje [72] génje az *Slc2a2* mutatta a legmagasabb kifejeződést a RAFT™ szigetek esetében. Ez megerősíti azt a feltételezést, hogy a háromdimenziós kollagénbe ágyazott növekedés kedvez a hasnyálmirigy-szigetek funkcionalitásának és a túlélésnek (7. ábra). A fibroblaszt marker *S100a4* génexpresszióját hasonlóan mértük a különböző tenyésztési körülmények között. Ahhoz, hogy a 2D tenyészet szétesett szigeteiből szétterjedő fibroblast-szerű sztrómasejtek típusát meg tudjuk állapítani (6. ábra a, b oszlop), további vizsgálatokra lenne szükségünk, azonban jelen tanulmányunkak ez nem volt célja.



7.ábra A hasnyálmirigy-szigetek génkifejeződésének vizsgálata qRT-PCR módszerrel a 18. napon. A szuszpenziós (SC), a RAFT™ és a hagyományos 2D kultúrákban mért expressziós adatok az SC kultúra 1. napján mért expressziós adataira lettek normalizálva. A génkifejeződési különbségek az anyagok és módszerekben leírtak alapján lettek kiszámítva. Szignifikancia: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

A qRT-PCR adataink visszaigazolásához, és az inzulin és a glükagon termelés bizonyításához a szigetek indirekt immunfluoreszcens festését végeztük el. A fénymikroszkópos képeinket egybeillesztve a hozzájuk tartozó fluoreszcens képekkel láthatóvá tettük a szigetek morfológiai kiterjedését és az általuk termelt hormonokat is. Míg a hetedik napra a 2D kultúra hasnyálmirigy-szigetei szétestek és inzulin, valamint glükagon termelése is lecsökkent, addig a SC-ben, és a RAFT™ szigeteiben az inzulin- és glükagon termelés intenzív jelet mutatott végig a kísérlet tizennyolcadik napjáig (8. ábra c és d oszlop). A legnagyobb intenzitású hormontermelés a tizennyolc napos kísérlet alatt pedig a RAFT™ esetében volt kimutatható. Ez az eredmény azért izgalmas, mert túlmutat az eddig publikált peptid amfil nanostruktúrált gélszerű vázban elért 14 napos hormontermelésen [73] a vizsgált hormonok tekintetében.



8. ábra Az inzulintermelő béta-sejtek és a glukagon termelő alfa-sejtek jellemzése IF festéssel különböző tenyésztési körülmények között ($n = 3$). Az ábrán feltüntetett időpontokban mért egyrétegű 2D kultúrák (a, b oszlop), RAFTTM szferoidok (c, d oszlop), és szuszpenziós kultúrák (e, f oszlop). szigeteinek integritásának megjelenítésére a fénymikroszkópos képeket (a, c, e oszlop) egyesítettük a fluoreszcens képekkel (b, d, f oszlop). Az inzulintermelést az anti-nyúl Alexa Fluor 488 (zöld), a glukagon termelést pedig az anti-kecske Alexa Fluor 594 (piros) festékekkel mutattuk ki. Méret skála: 100 μm

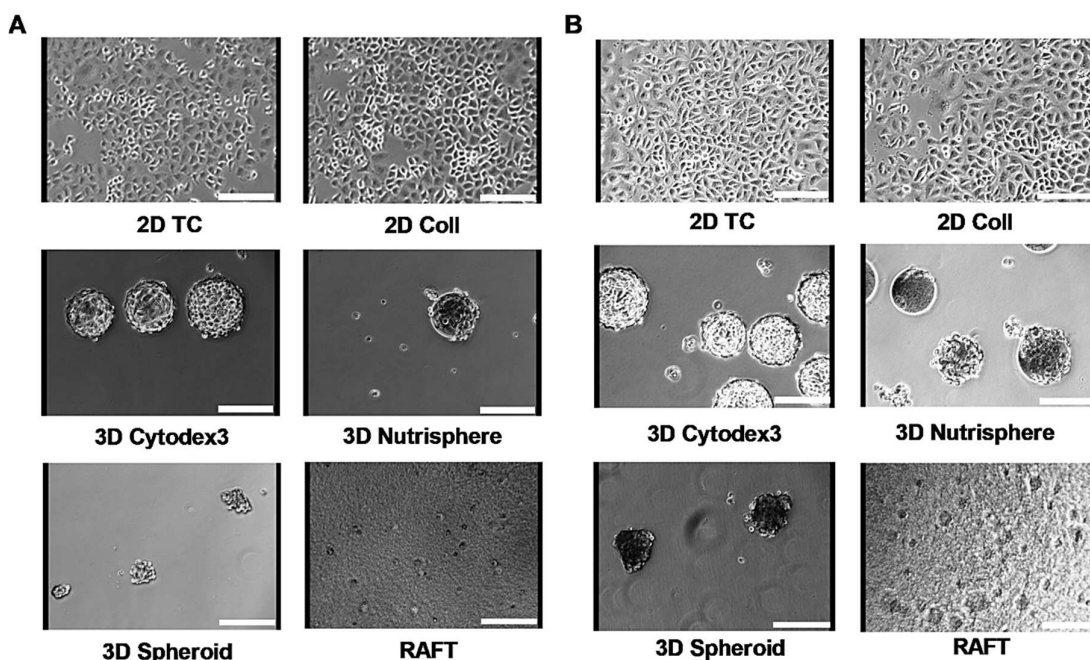
Az I. típusú kollagén a természetes 3D mátrixok csoportjába tartozik, amelyek utánozni tudják az *in vivo* pericelluláris ECM szignáljait, ami fokozott sejttúlélést és funkcionalitást biztosít a kollagénnel körülvevő sejteknek [74]. A RAFTTM kultúrákban, függetlenül attól, hogy a kollagénmátrix 3D vázként szolgál-e a sejteknek vagy helyettesíti az alapmembránt, esetleg stimulál-e bizonyos sejtfelszíni jelátviteli útvonalakat (pl. integrin receptorokat), érdemes a szferoidok életképességére gyakorolt pozitív hatása miatt kiemelni. A hagyományos egyrétegű (monolayer) kultúrák alapvető elemei voltak az alap sejtfiziológia folyamatok megértésének, azonban a komplexebb 3D *in vitro* modellek alaposabban képesek modellezni a sejt-sejt-ECM, valamint a sejt-sejt és a sejt-ECM kapcsolatokat.

Adataink megerősítettek bennünket ebben, mivel azt mutatták, hogy a RAFT™ kultúrákban növesztett egér hasnyálmirigy-szigetek az őket körülölelő 3D kollagén mátrixnak köszönhetően *in vivo* szerű környezetet voltak képesek kialakítani, tükrözve a valós *in vivo* mikrokörnyezet szerkezetét. A hasnyálmirigy-szigetek fenntartásához használt I-es típusú kollagén *ex vivo* alkalmazását előzőleg már leírták [75,76], azonban a RAFT™ segítségével standardizált körülmények között, azonos módon állíthatóak elő mátrixba ágyazott multicelluláris szferoidok.

TÉZIS 2.

A 3D *in vitro* tenyésztett A549 humán tüdő adenokarcinóma sejtek gén expressziója és karcinóma marker profilja közelebb áll az *in vivo* körülményhez, mint a hagyományos 2D tenyésztés esetén

Az A549 humán nem kissejtes tüdő adenokarcinóma sejteket különböző tenyésztési körülmények között tenyésztettük kilenc napon át. Annak érdekében, hogy a különböző tenyésztési körülményeket az idő függvényében össze tudjuk hasonlítani, két időpontban a negyedik tenyésztési napon (9. ábra a), valamint a kilencedik tenyésztési napon (9. ábra b) apoptózis, sejtciklus vizsgálatnak és gén, valamint fehérje expressziós vizsgálatoknak vetettük alá.



9.ábra Az A549 humán tüdő adenokarcinóma sejtek különböző tenyésztési körülményei 4 napos (A) és 9 napos (B) tenyésztés után, különböző tenyésztési körülmények között. A 2D és 3D kultúrák ugyanazon felület / térfogat arányban tartalmazták a sejteket, amelyet bővebben az Anyagok és módszerek részben részleteztük. A képeket a HoloMonitor M3 mikroszkóppal készítettük, x10 fáziskontraszt objektívvel. Méretskála: 150 μ m

Minden vizsgálat során referenciaként a T-75-ös szövettenyésztő flaskában, egyrétegben növesztett A549 sejtek (2D-TC) adataira normalizáltunk. A kollagénnel felületkezelt 3D kultúrák (3D Cytodex-3 és 3D NutriSphere) 2D párjaként I-es típusú kollagénnel borított T-75-ös szövettenyésztő flaskákat állítottunk elő (2D-Coll).

A 3D kultúrák előállításánál kétféle módszert használtunk:

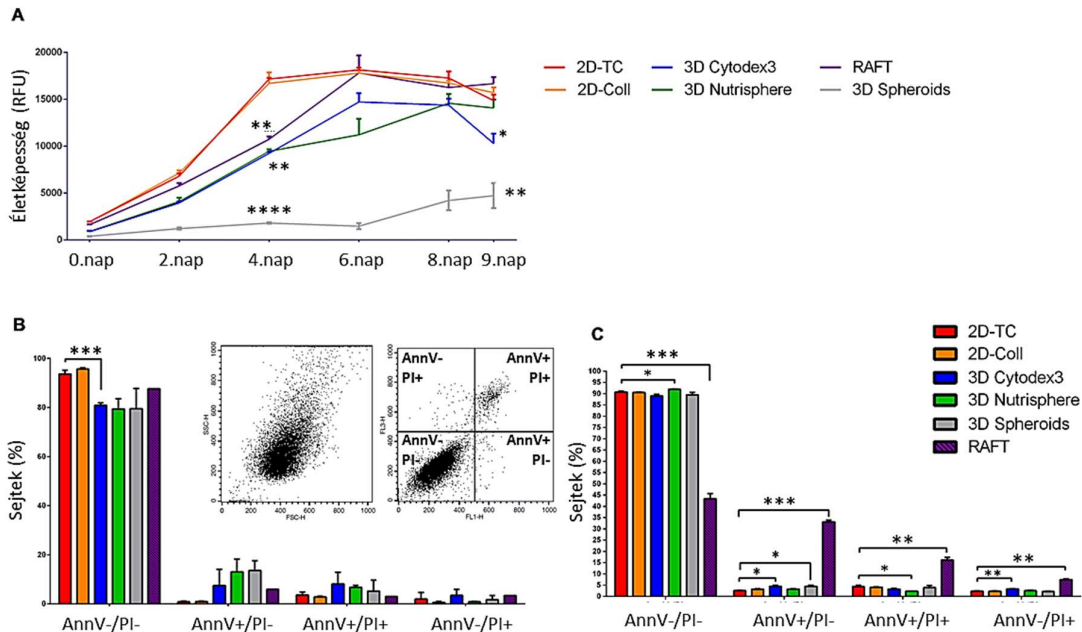
- a) lebegő (levitációs) tenyésztési módot, speciális asztali sejttenyésztő készülékkel (BioLevigator™, Hamilton), mikrohordozók felületen vagy anélkül; és
- b) RAFT™ kollagénmátrixba ágyazva létrehozott szferoidokat.

A lebegő tenyésztési móddal előállított szferoidokat további 3 csoportra oszthatóak:

- a/1) Multicelluláris tumor szferoidokat (MCTS) hoztunk létre Cytodex-3 mikrohordozók felületén (3D Cytodex3),
- a/2) Multicelluláris tumor szferoidokat hoztunk létre NutriSphere mikrohordozók segítségével (3D Nutrisphere),
- a/3) Multicelluláris tumor szferoidokat hoztunk létre mikrohordozó felhasználása nélkül is, lebegtetve (3D Spheroid).

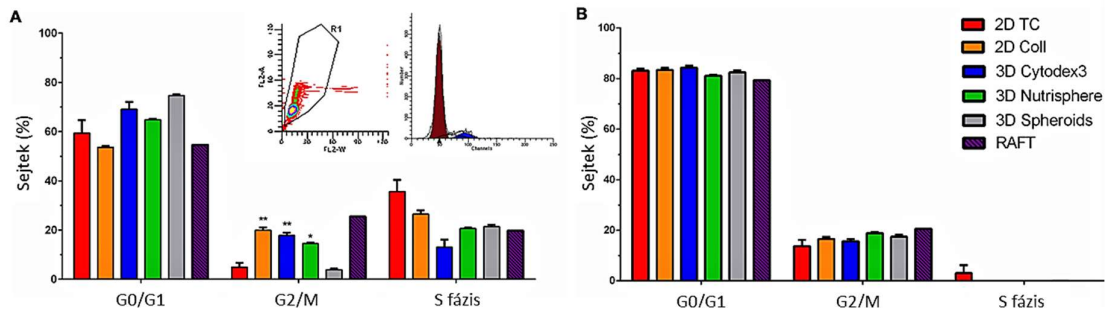
A különböző tenyésztési körülmények között tenyésztett 2D és 3D kultúrák életképessége

A különböző tenyésztési módon létrehozott 2D és 3D tenyészetek proliferációs vizsgálatát rezazurin segítségével mértük meg. A 2D tenyészetek (2D-TC és 2D-Coll) metabolikusan aktívabbnak bizonyultak a 3D kultúráknál, mivel a sejtek a rezazurin irreverzibilis resorufinná redukálását intenzívebben végezték (10. ábra a). A 2D-tenyészetek (2D-TC, 2D-Coll) a negyedik napon érték el az osztódásuk telítési fázisát, míg a kollagénnel borított mágnesyöngyökön nőtt szferoidok (3D Nutrisphere) ezt csak a nyolcadik napon érték el. A Cytodex-3 mikrohordozók felületén nőtt szferoidok (3D Cytodex3) és az ECM-szerű mátrixba ágyazott sejtszigetek (RAFT™) egységesen a hatodik napon érték el az osztódásuk maximumát. Az is megfigyelhető volt, hogy a hordozó nélküli MCTS-ek (3D Spheroid) a kísérleti idő végéig sem érték el a plató fázist, aminek oka valószínűleg azok nagyon lassú szaporodása volt, így a sejtek még a szferoid formálódás korai stádiumában tartottak (10. ábra a) a mért időszakban.



10. ábra A különböző 2D és 3D kultúrák szaporodási görbéje, életképessége és apoptózis vizsgálata. (A) A 3D kultúrák szaporodási sebessége a 4. napon lassabb volt, mint a 2D tenyészeteké (3D Sferoid $p \leq 0.0001$; RAFTTM, 3D Cytodex3 és 3D Nutrisphere $p \leq 0.01$), viszont a tenyésztés 9. napján csak a 3D Sferoid ($p \leq 0.01$) és a 3D Cytodex3 ($p \leq 0.05$) kultúrák mutatnak szignifikánsan alacsonyabb sejtszámnövekedést a 2D kultúrákhoz képest. ($n=3$, páros t-teszt). A sejtek életképessége (AnnV-/PI-, élő populáció) a 4. napon 80-90% körül maradt minden tenyésztési körülmény között (B), és a 9. napon is csak a RAFTTM tenyésztés eredményezte az életképesség 50%-os csökkenését (C). A méréseket három ismétléssel végeztük és azok átlag (SD) értékeit ábrázoltuk.

Két időpontban, amikor a 2D kultúrák növekedése elérte a maximumát (negyedik nap), és a kísérleti időszak végén (kilencedik nap) (10. ábra), a hat fajta 2D és 3D *in vitro* tenyészetet egysejt szuszpenzióra emésztettük és az életképességüket vizsgáltuk (apoptózis) (10. ábra b és c). A sejtek életképességének a mértékét a PI és AnnV jelölten sejtek százalékos értékéből számoltuk ki. Minden tenyésztési körülmény esetében, mind a negyedik (10. b ábra) mind a kilencedik napon (10. c ábra) 90% felett maradt az életképes PI és AnnV jelölten sejtek aránya, kivéve a RAFTTM kultúrákban, ahol a citometriai vizsgálatok a kilencedik napra a sejtek életképességének több mint 50%-os csökkenését mutatták (10. ábra c).

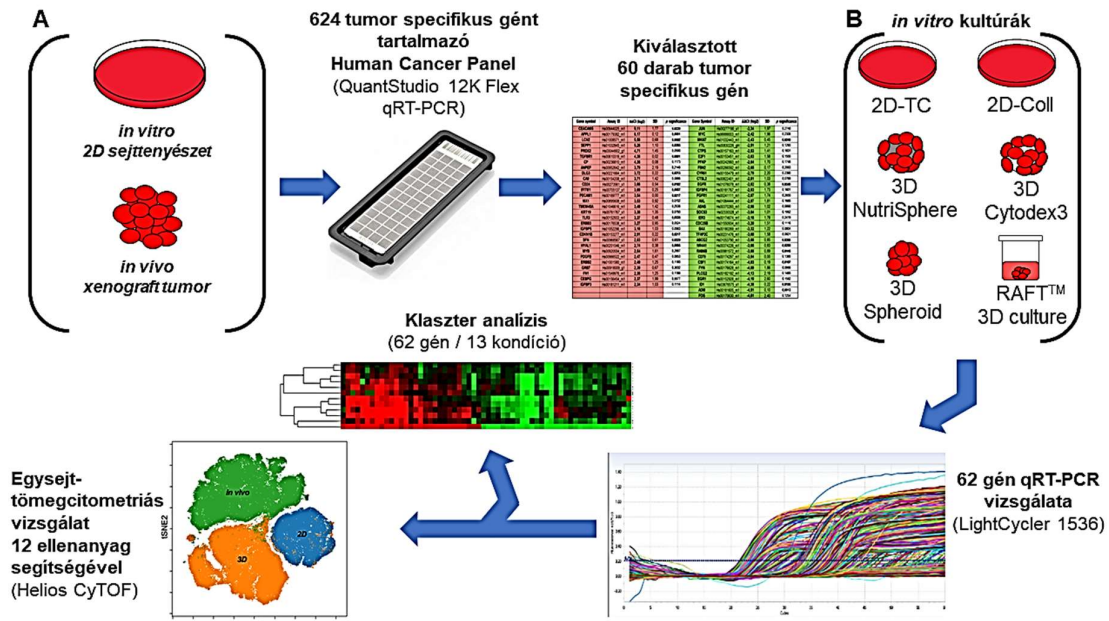


11. ábra A 4. (A) és a 9. tenyésztési napon (B) különböző körülmények között tenyésztett A549 sejtek sejtciklus eloszlása. A belső ábra az egyedi sejtek PI jelének az FL2-A (terület) -FL2-W (szélesség) aggregátum kikapuzását jelöli (A bal), míg a sejtciklus fázisainak reprezentatív képét a jobb oldali belső ábra jelöli (A jobb). Az adatok három ismétlés átlagaként vannak feltüntetve +/- szórással (SD), kivéve a RAFT™ tenyésztetet, ahol 12 darab kollagén-diszkoidot egyesítettünk az értékelhető mennyiségű sejtszám eléréséhez.

Az A549 sejtek sejtciklus eloszlását a különböző tenyésztési körülmények alatt citometriásan meghatároztuk (11. ábra). A sejtciklus G0/G1 és S (DNS-szintézis) fázisának vizsgálata során szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk a 2D és 3D tenyésztési körülmények között sem a negyedik (11. ábra a), sem a kilencedik napon (11. ábra b). A 2D-Coll, a 3D Cytodex3 a 3D Nutrisphere és a RAFT™ tenyésztetek esetében a negyedik napon a sejtek nagyobb hányada tartózkodott a G2/M fázisban (11. ábra a) összevetve a többi kultúrával, azonban ez a különbség a kilencedik napra eltűnt (11. ábra b).

***In vivo* expressziós mintázatot mutató gének kiválasztása**

A génexpressziós vizsgálatokat két lépésben hajtottuk végre. Első lépésként a nagyáterestőképességű, 624 tumorspecifikus gént tartalmazó úgynevezett Human Cancer Panel segítségével összevetettük az *in vivo* xenograft A549 tumorokat a hagyományos 2D *in vitro* A549 sejtenyésztéssel (12. ábra a), majd a mérés során a legnagyobb expressziós különbségeket mutató géneket tovább vizsgáltuk (60 gén), és azok expresszióját megmértük a különböző módon tenyésztett *in vitro* 2D és 3D sejt kultúrákon (12. ábra b). A második génexpressziós vizsgálathoz a Roche LightCycler 1536 HTS qPCR rendszerét használtuk.



12. ábra A minták vizsgálatának folyamatábrája. Az *in vivo* xenograft tumorok és *in vitro* 2D tenyészetek (A) expressziós összehasonlítását 624 tumorspecifikus gén mérésével végeztük, majd az ebből szelektált 60 gén segítségével az *in vitro* 2D és 3D tenyésztési módokat (B) összehasonlítottuk.

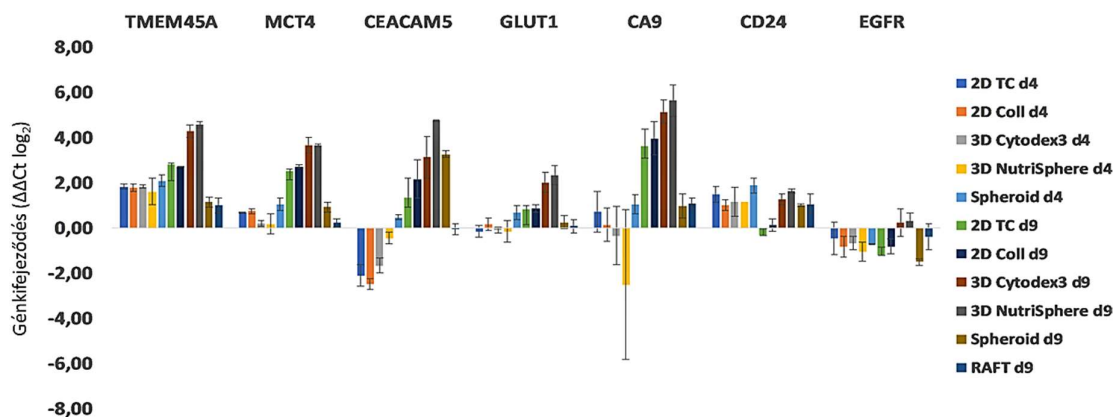
Az első expressziós kísérletben használt valós-idejű kvantitatív nanokapilláris PCR-t (QuantStudio 12K Flex qRT-PCR) laboratóriumunkban korábban már sikeresen alkalmaztuk toxikogenomikai szűrővizsgálatok során a toxikus vegyületek klaszterezésére [77], valamint a szervspecifikus toxicitás előrejelzésére [78]. Jelen tanulmányunkban az egérben növesztett A549 xenograft tumorok (80-100 mm³) és az egyrétegű *in vitro* A549 sejt kultúrák (hagyományos 100 mm-es Petri-csészében, 70%-os konfluencia mellett fenntartott A549 sejtek) génexpressziójának összehasonlító vizsgálatára használtuk a kereskedelmi forgalomban kapható Human Cancer Panel segítségével. Az említett panel 624 validált, a tumorfolyamatokban kulcsszerepet játszó gént vizsgált, mint amilyenek a pluripotens markerek, angiogenezisben szerepet játszó gének, apoptotikus gének, sejtciklus és sejtadhéziós molekulák, valamint ezen felül 24 háztartási gén (1. melléklet). A szelektált 60 gén közül 29 fokozott kifejeződést (2. táblázat, piros), 31 pedig csökkent relatív kifejeződést (2. táblázat, zöld) mutatott az A549 xenograft tumorokban az *in vitro* 2D kultúrákhoz képest, így ezeket választottuk ki a további génexpressziós vizsgálatokhoz. A vizsgált 648 (624 tumorspecifikus és 24 kontroll) gén expressziójának a változása ($\Delta\Delta Ct \pm SD$, p) az 1. mellékletben található meg.

Gén szimbólum	Azonosító	$\Delta\Delta Ct$ (log2)	SD	p szignifikanca	Gén szimbólum	Azonosító	$\Delta\Delta Ct$ (log2)	SD	p szignifikanca
CEACAM5	Hs00944025_m1	9,11	1,77	0,0220	JUN	Hs00277190_s1	-2,34	1,97	0,2740
APPL1	Hs00179382_m1	8,17	0,12	0,0001	MYC	Hs99999003_m1	-2,42	1,96	0,2306
LCN2	Hs01008571_m1	5,58	0,68	0,0082	MKI67	Hs01032443_m1	-2,43	0,45	0,0249
SEPP1	Hs01032845_m1	5,26	1,10	0,0293	FTL	Hs00830226_gH	-2,51	1,21	0,1293
PRDX2	Hs03044902_g1	4,71	1,45	0,0590	CTPS	Hs00157163_m1	-2,53	1,41	0,1831
TGFBR1	Hs00610318_m1	4,38	0,02	0,0001	E2F1	Hs00153451_m1	-2,63	1,58	0,1555
CP	Hs00236810_m1	4,36	0,08	0,1173	PFKP	Hs00242993_m1	-2,64	1,70	0,1746
ANPEP	Hs00952642_m1	3,79	2,19	0,2148	FBN2	Hs00266592_m1	-2,65	0,17	0,2083
DLG3	Hs00221664_m1	3,72	0,22	0,0213	CYR61	Hs00155479_m1	-2,79	2,20	0,2390
CA9	Hs00154208_m1	3,71	1,42	0,0886	CTSL2	Hs00822401_m1	-2,81	1,03	0,0769
CD24	Hs00273561_s1	3,66	0,54	0,0182	EGFR	Hs01076078_m1	-2,82	0,38	0,0345
IFITM1	Hs00705137_s1	3,60	0,25	0,0057	IGFBP4	Hs00181767_m1	-2,83	1,73	0,1601
PECAM1	Hs00169777_m1	3,54	0,00	0,0217	FGFR1	Hs00241111_m1	-2,87	1,74	0,2655
MX1	Hs00895608_m1	3,53	0,92	0,0702	AXL	Hs01064444_m1	-2,87	1,81	0,1685
TMEM45A	Hs01046616_m1	3,49	1,42	0,2538	ASNS	Hs00370265_m1	-2,98	1,02	0,0890
KRT19	Hs00761767_s1	3,38	1,35	0,0793	SOCS3	Hs02330328_s1	-3,04	1,01	0,1962
TLR3	Hs00152933_m1	3,37	0,48	0,0330	IER3	Hs00174674_m1	-3,18	1,78	0,2419
ERBB3	Hs00176538_m1	3,27	0,95	0,0524	CDC25B	Hs01550934_m1	-3,20	1,51	0,1116
IGFBP5	Hs01052296_m1	3,18	1,03	0,0563	BAX	Hs00180269_m1	-3,32	1,22	0,0804
CDKN1B	Hs00153277_m1	2,91	0,22	0,0217	TFAP2C	Hs00231476_m1	-3,60	1,58	0,0921
SFN	Hs00968567_s1	2,83	0,61	0,0329	ABCG2	Hs01053790_m1	-3,66	0,85	0,0368
HYAL1	Hs00201046_m1	2,74	0,38	0,0096	NR4A1	Hs00374226_m1	-3,66	0,83	0,0250
MYB	Hs00920554_m1	2,54	1,61	0,2887	RAB6B	Hs00981572_m1	-3,66	0,89	0,0446
PDGFB	Hs00966522_m1	2,47	0,47	0,0853	CD70	Hs00174297_m1	-3,94	0,00	0,1385
ERBB2	Hs01001580_m1	2,40	1,25	0,1180	CSF1	Hs00174164_m1	-4,03	0,19	0,0107
GRB7	Hs00918009_g1	2,39	0,67	0,3032	FYN	Hs00176628_m1	-4,09	1,86	0,0988
FN1	Hs01549976_m1	2,38	1,25	0,1188	PLCG2	Hs00182192_m1	-4,13	2,19	0,1465
CEBPG	Hs00156454_m1	2,37	1,99	0,5677	EGR1	Hs00152928_m1	-4,19	2,60	0,1582
IGFBP3	Hs00181211_m1	2,34	1,03	0,1114	ID1	Hs03676575_s1	-4,38	0,22	0,0155
					ADM	Hs00181605_m1	-4,51	0,10	0,0013
					FOS	Hs00170630_m1	-4,61	2,40	0,1254

2. táblázat Az A549 xenograft tumorok (in vivo) és a 2D sejtkultúrák (in vitro) génexpressziójának az összehasonlítása (TaqMan® OpenArray® Human Cancer Panel, QuantStudio- 12K Flex) 624 specifikus gén kifejeződésének a tesztelésével történt. A vizsgálat során 60 gént választottunk ki a további vizsgálatokra, amelyek közül 29 fokozott kifejeződést (piros) és 31 csökkent kifejeződést (zöld) mutatott az xenograft mintákban. A szignifikanciát (p) Student t-tesztel számítottuk, a $\Delta\Delta Ct$ -k összehasonlításával.

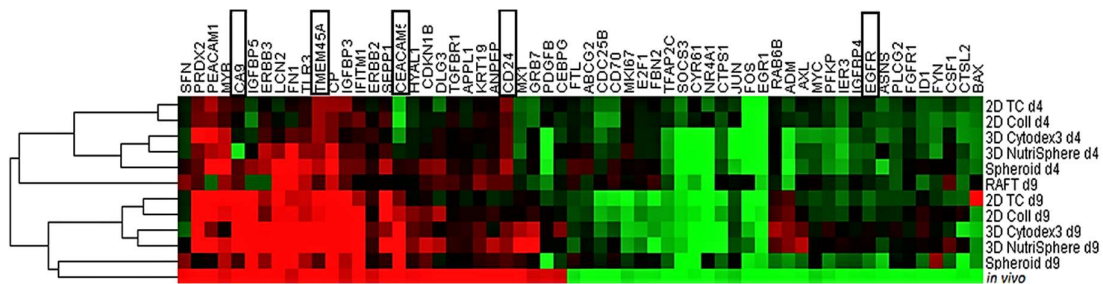
A 2D és 3D *in vitro* tenyészetek génkifejeződés vizsgálatához a xenograft tumorok és 2D sejtkultúra összehasonlításából kiszűrt 60 génen felül, további két gén, az *SLC2A1* (GLUT1, glükóz transzporter) és az *SLC16A3* (MCT4, tejsav transzporter) expresszióját is megvizsgáltuk. A GLUT1 glükóz transzporter és az MCT4 tejsav transzporter nem volt benne a forgalomban kapható Human Cancer Panel primer listájában, azonban mivel kulcsszereplői a tumorsejtek anyagcseréjének, úgy döntöttünk, hogy ezeknek a géneknek vizsgálatát is elvégezzük. Korábbi kutatások azt bizonyították, hogy a magas MCT4 és GLUT1 génkifejeződés rossz túlélési prognózissal párosul adenokarcinómás betegeknél [79]. Az 1536 lyukú HTS qRT-PCR gének primer listája a 2. mellékletben található meg. A különböző *in vitro* tenyészetek expressziós vizsgálatát is a negyedik és a kilencedik napon végeztük el, hasonlóan a többi vizsgálatokhoz (13. ábra). Mind a 62 gén expressziójának a változása ($\Delta\Delta Ct$ +/-SD, p) a 3. mellékletben található meg.

A vizsgálat során mért változások közül a legnagyobb változást (16-32-szeres) mutató gének sejtfelszíni fehérjéket kódolnak, így várható volt, hogy a kultúrák későbbi egysejt tömeg citometriás (CyTOF) fehérjevizsgálatánál is megfelelő jelkülönbséget fogunk tapasztalni. A 3D Cytodex3 és 3D Nutrisphere tenyészetekben magas expressziót mutató *SLC16A3* (MCT4), *SLC2A1* (GLUT1) és a *CA9* génekről korábban kimutatták, hogy a malignus daganatsejtek metabolikus újra programozásában játszanak fontos szerepet [80], a *CEACAM5*-ről és *CD24*-ről, hogy kulcsmolekulái az epitéliális-mezenchymális tranzíciónak, azáltal, hogy támogatják a tumor progresszióját és kemorezisztencia kialakulását [81,82]. A *TMEM45A* és az *EGFR* a tumorsejtek proliferációs folyamatainak a szabályozói [83,84]. A 10. ábrán bemutatott gének közül csak az *EGFR* nem mutatott emelkedett génkifejeződést a mikrogöngy alapú 3D kultúrákban. Azonban a RAFT™ és a hordozó nélküli 3D sferoid tenyészetek másképp viselkedtek, mint a göngy alapú 3D kultúrák. A kilencedik napon a 3D szferoidok expressziója csak a *CEACAM5* gén esetében mutatott 8-szoros túlermelődést a 2D kultúrákhoz képest (13. ábra). A RAFT™ mintákból csak kilencedik napon végeztünk méréseket, mivel az RNS tisztítás során nagyon kis mennyiségű RNS tudtunk kinyerni a kevés jelenlévő sejt miatt.



13. ábra. Különböző kultúrákban mért génexpressziós változások a 4. (d4) és a 9. napon (d9). A *TMEM5A*, *SLC16A3* (MCT4), *CEACAM5*, *SLC2A1* (GLUT1) és *CA9* 16-32-szeres overexpressziót mutattak a 3D Cytodex3 és a 3D Nutrisphere kultúrákban a hagyományos 2D kultúrákhoz képest. Az ábrázolt gének mindegyike sejtfelszíni fehérjét kódol és a kereskedelmi forgalomban elérhetőek antitestek, amelyek később lehetővé tették azok fehérje szintű vizsgálatát. A grafikonokon a három biológiai ismétlés átlagai és +/- szórásai (SD) látszanak.

Ahhoz, hogy az általunk vizsgált *in vitro* kultúrák közül kiderüljön, melyik modellezi legjobban az *in vivo* nem kissejtes tüdőkarcinómát a negyedik és a kilencedik napon mért génextpressziós mintázatukat, hierarchikus klaszterezésnek vetettük alá (14. ábra). A 2D-TC, 2D-Coll a 3D Cytodex3 a 3D Nutrisphere és a 3D Sferoid kultúrák négy napos tenyészetei jól elkülönülő alcsoportot képeztek az *in vivo* xenograft kultúráktól. A kilenc napos tenyészetek közül a 3D Sferoid, 3D Nutrisphere és a 3D Cytodex3 közelebb került az *in vivo* tumorokhoz, amely azt feltételezi, hogy az expressziós mintázatuk jobban utánozza a valós szöveti helyzetet (14. ábra). A későbbi fehérjeanalízis során figyelmen kívül hagytuk azon kultúrák vizsgálatát, amelyek nem tették lehetővé a statisztikai analízishez szükséges minimum sejtszám kinyerését (RAFT™), vagy amelyek méretstandardizálása problémába ütközött (3D Sferoid). Az utóbbi tenyésztési mód esetében a szuszpenziós körülmények között tenyésztett mikrohordozó nélküli szferoidok mérete nagy intervallum között mozgott a néhány aggregálódott sejtcsoporttól a több száz mikrométeres képletekig (vagy organoid), így a szferoidok közötti heterogenitás túl nagy lett volna ahhoz, hogy azokból tudományosan releváns fehérje adatokat tudjunk közölni.



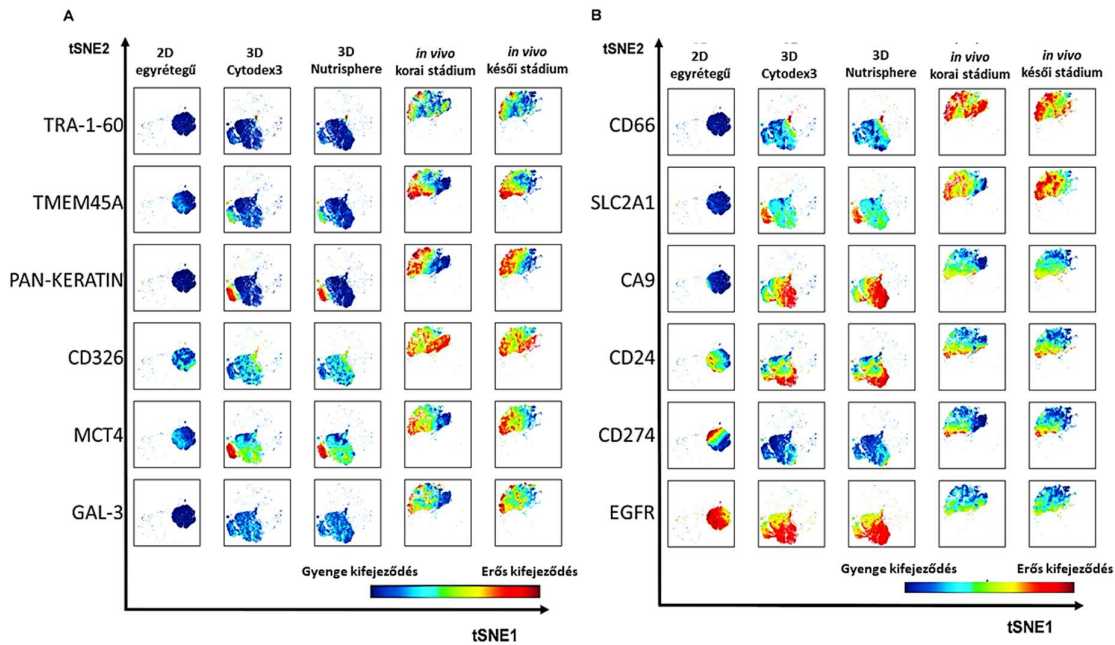
14. ábra A 3D kultúrák (3D Sferoid, 3D Nutrisphere, 3D Cytodex3) 9 napos (d9) tenyésztése jobban hasonlít az *in vivo* tumorok értékeihez. A kiemelt géneket (fekete négyzeteket) választottuk ki a későbbi, egysejtes citometriás elemzéshez. A hierarchikus klaszteranalízist a Gene Cluster 3.0 szoftver segítségével végeztük el a bemutatott minták expressziós adataiból ($\Delta\Delta Ct$, log₂ értékek).

Fehérjemarkerek egysejt-tömegcitometriás (CyTOF) vizsgálata

A tömegcitometriai vizsgálatokhoz a 9 napos 2D és 3D *in vitro* kultúrákat használtuk, és összehasonlítottuk a korai (*in vivo early stage*) és késői (*in vivo late stage*) stádiumú egérből izolált xenograft A549 tumorokkal. Összesen tizenkét rákmarker kifejeződési mintázatát határoztuk meg, a TMEM45A, MCT4, CD66

(CEACAM5), GLUT1, CA9, CD24 és EGFR markereket. Ezeket a génexpressziós vizsgálatokból választottuk ki, valamint öt további is megvizsgáltunk, amelyeket másik két nem-kissejtes tumorsejt vonalon (H1975 és H1650) validálta laboratóriumunk egy másik projekt során (nem közölt adatok). Ezek közül három karcinóma őssejtmarker volt: TRA-1-60 [85], CD326 (epitél sejtadhéziós molekula, EpCAM) [86], és a Galectin-3 (GAL-3) [87]; egy immunellenőrzőpont szabályozó: a CD274 (programozott sejtthalál-ligand-1, PD-L1) [88] és egy karcinóma marker: pan-keratin (citokeratinok) [24]. Bár a keratinok az epitél sejtek I-es és II-es típusú intermedier filamentumainak építő elemei [89], több kutatócsoport is igazolta, hogy a tumoros sejtek külső membránján lokalizálódhatnak, ezzel fokozva a rákos sejtek ECM-hez való adhézióját [90,91]. A reprezentatív többdimenziós adatelemzéssel (viSNE, visualization of stochastic neighbor embedding [92]) egysejt szinten képesek voltunk a 12 féle marker egyidejű expressziójának a mintázatát összehasonlítani a különböző tenyészetek között (15. ábra).

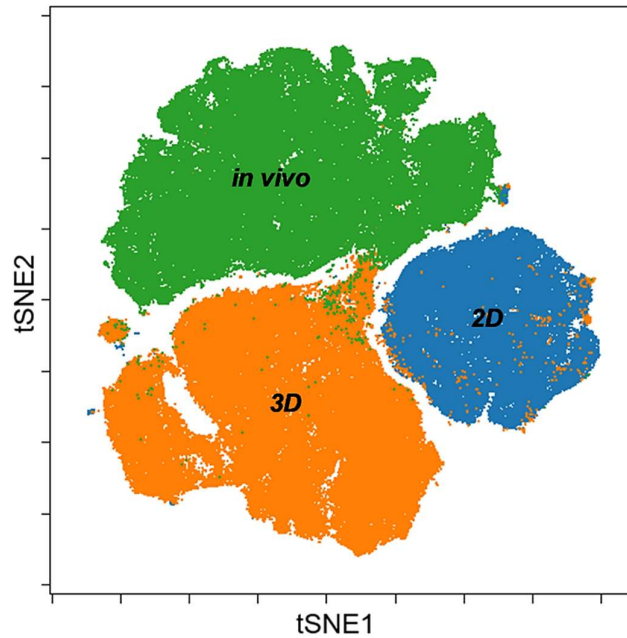
A minták elemzését minden esetben csak a HLA-A,B,C pozitív sejteken végeztük el ($4,5 \times 10^4$ db sejt/minta), mivel ezzel a módszerrel el tudtuk különíteni a kísérlet szempontjából releváns humán A549 sejteket a xenograft tumorokban infiltrálódó egyéb, nem humán eredetű egér sztróma sejtektől. Az egyes markerek expressziós intenzitását a 12. ábrán feltüntetett színskála jelöli, a kék az alacsony, míg a piros a magas fehérje kifejeződést ábrázolja. A hagyományosan tenyésztett 2D A549 kultúrában a tizenkét markerből kilenc (TRA-1-60, TMEM45A, pan-keratin, CD326, MCT4, GAL-3, CD66, GLUT1, CA9) egyáltalán nem, vagy csak nagyon gyengén expresszáldott (15. ábra a és b első oszlopok), a maradék háromból kettő pedig mérsékelt sejtvonalon-belüli heterogenitást mutatott (CD24 és CD274), egy (EGFR) pedig erőset (15. ábra b, első oszlop). Összeségében viszont jól látszott, hogy kilenc fehérje expressziója alapján (TRA-1-60, TMEM45A, pan-keratin, CD326, MCT4, GAL-3, CD66, GLUT1, CD274) a 3D kultúrák (3D Cytodex3 és 3D Nutrisphere) átmenetet képeznek a 2D-ből az *in vivo* állapot felé (15. ábra a és b, második és harmadik oszlop), mivel nagyobb expressziós intenzitást mutattak a 2D-nél. Ezekben a rendszerekben azonban három marker esetében (CA9, CD24, EGFR) magasabb intenzitásokat mértünk az *in vivo* tumorokénál (15. ábra b, második és harmadik oszlop).



15. ábra A 2D, 3D (3D Cytodex3 vagy 3D Nutrisphere) kultúrák és *in vivo* (korai és késői stádiumú) daganatok együttes (12 fehérje) többdimenziós elemzésének reprezentatív ábrája (viSNE). Az elemzést $4,5 \times 10^4$ HLA-A, B, C pozitív sejtek kapuzása után végeztük el a különböző mintákon. (iteráció = 1000, bizonytalanság = 30, $\theta = 0,5$).

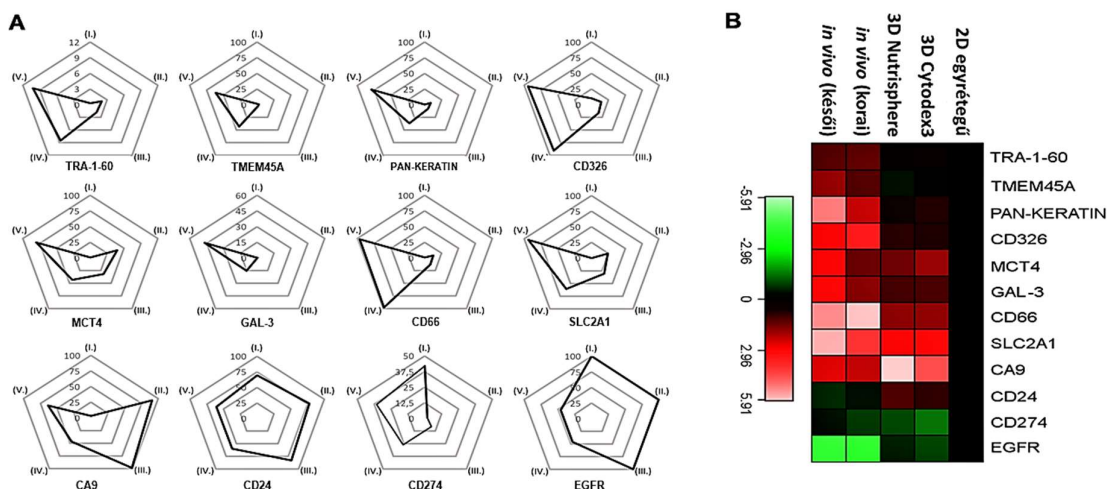
A viSNE térképen a 12 fehérje együttes mintázata alapján jól felismerhető a különböző tenyésztési módok egyedi szigetei. A szigeteken minden pontot egy-egy sejt alkot. A minták sejtszintű heterogenitását pedig a szigetek kiterjedése és mintázata mutatja.

A 2D, 3D és *in vivo* minták multiparametrikus (12 fehérjét ábrázoló) viSNE grafikonjainak az összeolvasztásával megkaptuk a különböző tenyésztési módok közötti átfedettséget. Az általunk vizsgált kultúrák a 12 fehérje együttes expressziós mintázata alapján három elkülönülő szigetrészt mutattak, ahol az egyik harmad a 2D kultúra sejtjeit (16. ábra, kék régió), a másik a 3D kultúrák sejtjeit (16. ábra, narancs régió) a harmadik pedig az *in vivo* tumorok sejtjeit (16. ábra, zöld régió) képviselik, minimális átfedéssel. Mind a szigetek szegmentációja, mind a területe a tenyésztési módon belüli sejtek heterogenitását tükrözi. A hagyományos, 2D *in vitro* kultúra alkotja a legkisebb kiterjedésű és szegmentáltságú régiót, azaz ezek a sejtek bizonyultak a legszegényebb heterogenitással rendelkező populációnak, távol a 3D-től vagy a valós *in vivo* állapottól.



16.ábra A 2D, 3D és *in vivo* minták viSNE grafikonjának (multiparametrikus egysejtes citometriai adatának) egyesített ábrázolása. Az ábrán jól kivehető a 2D, 3D és *in vivo* tenyészetek közötti heterogenitáskülönbség.

Ahhoz, hogy a markerek kifejeződését ne csak egysejt szinten, hanem a tenyészetek (populáció) szintjén is vizsgálni tudjuk, a HLA-A, B, C pozitív sejtek (humán A549) százalékos arányát egy ötszögű radar térkép segítségével ábrázoltuk. A radartérképen az öt különböző szög a különféle kultúrákat jelöli: (I) *in vitro* 2D, (II) 3D Cytodex3, (III) 3D Nutrisphere, (IV) korai és (V) késői stádiumú *in vivo* adenokarcinóma (17. a ábra). A radartérkép egyes gyűrűi pedig a pozitív sejtek százalékos értékét jelölik 0–100% tartományban. Minden egyes fehérje egy külön radartérképen van ábrázolva, ahol a különböző markerekre való pozitívitás százalékosan van feltüntetve: TRA-1-60 (9%), TMEM45A (37,5%), pan-keratin (50%), CD326 (100%), MCT4 (50%), GAL-3 (30%), CD66 (100%), GLUT1 (100%) (17.ábra a).



17. ábra (A) A különböző 2D, 3D és *in vivo* tenyészetek százalékos aránya az egyes markerek expresszióját tekintve. A TRA-1-60, TMEM45A, pan-keratin, CD326, MCT4, GAL-3, CD66 és GLUT1 esetében főként a korai és késői stádiumú *in vivo* tumorok esetében tapasztalható pozitívitas. A radartérképen az öt különböző szög a különféle kultúrákat jelöli: (I) *in vitro* 2D, (II) 3D Cytodex3, (III) 3D Nutrisphere, (IV) korai és (V) késői stádiumú *in vivo* adenokarcinóma.

(B) A tömeg citometriás adatok hőterképe az öt különböző tenyészetben a 2D tenyészetre normalizálva (zöld: alacsony, piros: magas expresszió).

A CA9 pozitív sejtek populációja az *in vitro* 3D tenyészetekben volt a legnagyobb (100%). Ennek az oka valószínűleg az intratumor keringés hiányának tudható, amely ezekben a nagyméretű szferoidokban jelen volt. Az *in vivo* tumorokban a 2D-hez viszonyítva a CD24 tumor őssejt marker és az EGFR markerek sejtpozitivitása 70% -ról 35% -ra, illetve 100% -ról 25% -ra csökkent. Továbbá a CD274 pozitív sejtek száma 2D-ben 40% -ban, míg *in vivo* csak 25% -ban volt jelen, miközben a 3D modellekben alig volt található CD274 pozitív sejt (17. ábra a).

A sejszintű markersűrűség meghatározása során az intenzitásokat a 2D egyrétegű tenyészetre normalizáltuk és a vizsgált fehérjéket hőterkép segítségével jelenítettük meg (17. ábra b). Itt is jól látszik, hogy a vizsgált tumormarkerek alapján a 3D kultúrák átmenetet képeznek a 2D és az *in vivo* körülmények között. (17. ábra b).

TÉZIS 3.

Az MCF-7 és egér 4T1 emlő daganatsejtek háromdimenziós körülmények között tenyésztett formái ellenállóbbak a tumorelles hatóanyagoknak egy 67 komponensű hatóanyag könyvtár tesztelése során

Gyógyszerjelölt kismolekulák daganatellenes hatásának a vizsgálata 2D és 3D sejtenyészeteken

Az Imidazo[1,2-b]pirazol-7-karboxamid vegyületek daganatellenes hatását humán MCF-7 emlő adenokarcinóma és egér 4T1 emlő karcinóma sejtek 2D és 3D tenyészetein vizsgáltuk. A 67 komponensű molekula könyvtárat Dr. Demjén András vegyész kollégám szintetizálta azzal a céllal, hogy új daganatellenes hatóanyagokat hozzon létre, ezek közül 45 hatóanyagot *in vitro* 2D és 3D tenyészeteken is leteszteltünk. A sejtek életképességét resazurin segítségével fluorimetriásan detektáltuk ismert antitumor vegyület a doxorubicin mellett, amelyet pozitív kontrollként használtunk. Az elmúlt években több tanulmány is foglalkozott azzal, hogy a két és három dimenzióban növesztett sejtek hatóanyag elleni érzékenysége különbözik [1,2,3], ezért az újonnan szintetizált kismolekulák hatását, a hagyományos 2D *in vitro* tenyészetek mellett 3D *in vivo* szferoidokon is megmértük és az anyagok IC50-értékét meghatároztuk (4. melléklet). A szferoidok létrehozásához az anyagok és módszerekben részletezett ULA módszert használtuk, amely lehetővé tette a HTS szűréshez nélkülözhetetlen azonos méretű és sejtszámú szferoidok egyidejű és nagy mennyiségű létrehozását. Azokat a kismolekulákat, amelyek legalább az egyik tenyészetben 10 µM alatti aktivitást mutattak, aktívnak tekintettük, amelyek 10 µM felett hatottak, azokat pedig inaktívnak, mivel ezek klinikai relevanciája nagy valószínűség szerint már kérdésessé válna a további gyógyszerfejlesztési lépések során. Ezen kritériumok alapján a 45 újonnan szintetizált kismolekulából 16 bizonyult aktívnak a kísérletben használt két emlőtumoron. Közülük hat pedig minimum két és félszeres hatáskülönbséget mutatott a sejtvonalak 2D és 3D tenyészetei között. Az aktív molekulák hatáskülönbsége egyezik az irodalomban leírt adatokkal [2,3], azaz a multicelluláris sejtek kevésbé voltak érzékenyek mind az újonnan létrehozott aktív hatóanyagokkal, mind a pozitív kontrollként használt doxorubicinnal szemben (3. táblázat, félkövér sorok).

molekula kód	2D 4T1	3D 4T1	2D MCF-7	3D MCF-7	logP (ChemAxon)
doxorubicin	0,057	0,141	0,024	0,063	0,53
DU214	3,63	15,6	10,6	31,3	2,97
DU227	9,95	4,94	8,29	5,12	3,93
DU261	2,41	3,62	1,95	2,81	4,93
DU270	4,01	4,39	1,69	3,5	4,04
DU325	3,94	10,8	3,44	8,22	3,21
DU385	4,56	9,52	3,53	8,85	3,73
DU413	1,88	2,97	1,49	3,79	2,85
DU414	4,24	9,09	4,07	8,91	4,83
DU433	9,31	8,72	8,57	7,38	5,3
DU441	3,36	4,91	3,03	3,54	5,29
DU442	2,25	5,66	1,56	5,51	4,48
DU452	2,59	2,22	1,9	1,81	4,37
DU453	2,85	2,21	1,7	2,07	4,55
DU466	6,91	6,34	8,35	5,09	4,97
DU467	4,66	3,25	4,46	3,52	3,57
DU469	4,37	4,32	2,55	4,2	4,37

3. táblázat Az aktív kismolekulák IC₅₀ értékei. Félkövér betűkkel láthatóak azok az anyagok, amelyek legalább két és félszeres aktivitást mutattak a hagyományos 2D kultúrákban az ugyan olyan körülmények között tenyésztett 3D szferoidokhoz képest. A pozitív kontrollként használt doxorubicin mind a két sejtvonalon minimum 2,5-szeres aktivitás különbséget mutatott a 2D és a 3D kultúrák között. Az újonnan szintetizált hatóanyagok között pedig a DU214 molekula mutatta a legnagyobb aktivitáskülönbséget (4T1 kultúrák esetében 4,3-szeres, MCF-7 kultúrák esetében 3-szoros különbség). Az táblázatban felsorolt kismolekulák IC₅₀-értékei 72 órás inkubációs idő után, legalább két független kísérlet átlagából lettek kiszámítva és µM-ban kifejezve.

Egyedül a DU227 esetében tapasztaltunk 4T1 tenyészetek esetén fordított érzékenységet (2,01-szeres). Mivel az MCF-7 sejtvonalon is hasonló tendenciát láttunk (1,62-szeres) az érzékenységekben, úgy feltételezzük, hogy az adott kismolekula befolyásolhatja a 3D szferoid képződés folyamatát vagy valamelyik adhéziós molekula sejtmembránon való kifejeződését.

A kismolekulák szintézisét követően a molekulák szerkezeti képlete alapján a logP értékek a Chemaxon, MarvinSketch nevű programjával kerültek meghatározásra (3. táblázat, utolsó oszlop). Az aktív hatóanyagok logP értékei 2,87 és 5,3 között mozogtak, amely alapján minden újonnan szintetizált molekulánk lipofilnek számított. Ezek alól az a 6 molekula sem volt kivétel, amely különböző IC₅₀ értéket mutattak ugyanazon sejtvonal 2D és a 3D kultúráiban. Ez alapján úgy gondoljuk, hogy a 2D és 3D kultúrák érzékenység különbségét nem a molekulák logP értékei

okozzák, azonban ennek eldöntéséhez viszont további vizsgálatokat jelen tanulmány során nem végeztünk.

DISZKUSSZIÓ

PhD munkám során különböző háromdimenziós *in vitro* sejtenyésztési eljárásokkal kialakított multicelluláris sferoidokat vizsgáltam annak érdekében, hogy igazoljam azok előnyeit a ma széleskörben használt kétdimenziós tenyésztőlemezekon történő tenyésztési módszerrel szemben.

Vizsgálataink során egy újfajta sejtmátrix alapú modellrendszert állítottunk be és teszteltünk, melynek során összehasonlítottuk a hagyományosan szélesztett egyrétegű sejt kultúrában növesztett egér hasnyálmirigy-szigetek életképességét, valamint glukagon és inzulin termelését a kollagén mátrixba ágyazott háromdimenziós hasnyálmirigy-szigetekkel. Megvizsgáltuk a hasnyálmirigy-szigetek életképességét különböző tenyésztési körülmények között, valamint az alfa és béta sejtek funkcionalitását is jellemeztük. Összeségében elmondható, hogy a RAFT™ alkalmazása az egér hasnyálmirigy-szigetek hosszú távú fenntartására kiváló eredményeket mutatott, mivel a szigetek integritása, speciális sejtjeinek inzulin és glukagon termelése legalább tizennyolc napig *ex vivo* megmaradt. A kapott eredményeink alapján tehát elmondható, hogy a RAFT™ ígéretes eszköz lehet a kutatók kezében mind az alapkutatások, mind az alkalmazott kutatások során, mivel a klinikumban nagy igény mutatkozik az olyan terápiák iránt, ahol a cukorbetegek inzulinpótlását a szervezetükbe ültetett inzulin termelő xenograft szigetekkel tudnák pótolni. Tudomásunk szerint csoportunk közleménye volt az első a hasnyálmirigy-szigetek RAFT™ 3D *in vitro* sikeres fenntartásáról.

Munkám fő célja 3D *in vitro* sejtenyésztési eljárások jellemzése és tumorelles hatóanyagszűréssel kapcsolatos alkalmazások kiterjesztése volt tumorsejtekből kialakított sferoidokkal. Először különböző 3D sejtenyésztési módszereket optimalizáltam annak érdekében, hogy egy olyan tenyésztési rendszert fejlesszünk ki, amely sokkal jobban reprezentálja a valódi tumoros szövetek komplex biológiai folyamatait és heterogenitását.

Egyre inkább elfogadott tény, hogy az egyrétegű sejt kultúra túlságosan leegyszerűsített modellje a többsejtű organizmusoknak, és számos esetben nem tudja kellő részletességgel modellezni a sejt metabolitok eloszlását, a lokális oxigén koncentrációt és a tápanyagok, valamint a szignál molekulák szöveti gradienseit. Ezeket a folyamatokat a 3D sejtenyésztési módszerekkel sokkal megbízhatóbb

módon tudjuk vizsgálni [93]. A 3D modellekben az oxigén- és tápanyagihiány magasabb glikolitikus aktivitáshoz vezet, valamint jellemző rájuk a megnövekedett autofágia és az anaerob körülmények által kiváltott nekrozis [94-97]. Az aktív jelátviteli utak szintén különböznek a 2D és a 3D kultúrák között, mivel a 2D-ben kisebb arányban képviseltek a sejt-sejt, valamint a sejt-ECM kapcsolatok (integrinek és proteoglikánok mennyisége) [98,99]. Számos tanulmány azt is igazolta, hogy a multicelluláris szferoidképződés erősen befolyásolt az ECM fehérjék expressziója [100,101], vagy az azokat kódoló gének kifejeződése által [102,103].

Modellkísérleteinkben különböző tenyésztési körülmények között növesztett A549 humán tüdő karcinóma sejtek növekedési kinetikáját, életképességét, gén és fehérje expresszióját vizsgáltuk, majd hasonlítottuk össze az *in vivo* szubkután beültetett A549 tumorokkal. Annak céljából, hogy megtaláljuk az *in vivo* tumorokhoz leginkább hasonlító 3D *in vitro* tenyésztési módszert, összehasonlító vizsgálatokat végeztünk a különböző 2D (2D standard Petri-csésze; 2D-TC: hagyományos szövettenyésztő T-75 flaska; 2D-Coll: I-es típusú kollagénnel felületkezelt T-75-ös flaska), 3D gyöngyalapú (3D Cytodex3, 3D Nutrisphere), 3D hordozó nélküli (3D szferoid) és 3D kollagénbe ágyazott (RAFT) sejtenyésztési módszerekkel (9. ábra). A különböző *in vitro* kultúrákat egérből izolált A549 xenograft tumorok korai és késői stádiumával is összevetettük két időpontban, a negyedik és a kilencedik tenyésztési napon.

A különböző tenyésztetek sejtosztódása azt mutatta, hogy a hordozó nélküli szferoidok (3D Spheroid) lassabban voltak képesek osztódni és a leghosszabb lag-fázissal rendelkeztek, míg a RAFT™ kultúra életképessége volt a legrosszabb a tenyésztések során (10. ábra). Figyelembe véve a fent leírtakat, valamint, hogy a 3D spheroid kultúra MCTS méreteit nehéz lett volna standardizálni, ezeket a kultúrákat a későbbi egysejt fehérje vizsgálatainkból (CyTOF) kizártuk. Ezekkel ellentétben a mikrogöngy alapú 3D tenyésztetek állandó felület/térfogat aránnyal rendelkeztek, így a 3D Cytodex3 és 3D Nutrisphere szferoidok standard módszerekkel könnyen vizsgálhatók voltak. A sejtciklus vizsgálatok csak a négy napos tenyésztetek esetén mutattak G2/M dúsulást a 2D-Coll és a 3D Cytodex3 és 3D Nutrisphere tenyésztetekben (11. ábra). A 624 gént vizsgáló nanokapilláris qRT-PCR, valamint a 62 gént vizsgáló 1536 qRT-PCR vizsgálatok az *in vivo* és a 3D kultúrák esetében magasabb *TMEM45A*, *SLC16A3*, *CD66*, *SLC2A1*, *CA9* és

CD24, valamint alacsonyabb *EGFR* expressziót mutattak az egyrétegű 2D tenyészetekhez képest (2. táblázat, 13. és 14. ábra). Ezért ezen gének által kódolt fehérjéket, továbbá a klinikai jelentőséggel bíró TRA-1-60, pan-keratinok, CD326, Galectin-3, és CD274 fehérjék kifejeződését egysejt tömeg citometriai módszerrel (CyTOF) is megvizsgáltuk. Az adenokarcinómák képesek a K8, K18, K19, valamint egyes esetekben a K7 és K20 keratinok expressziójára, amelyek az intermedier-filamentumok építő kövei [89]. Érdekes módon ezek a citokeratinok a karcinóma sejtek felszínén is képesek lokalizálódni, és fokozni az ECM-hez való sejt rögzülését [90,91]. Ezért anti-pan-keratin antitestet (C11 klón) használva képesek voltunk megmérni a sejtfelszínen lévő keratinok mennyiségét, amely a 4, 5, 6, 8, 10, 13 és 18 keratinok felismerésére volt alkalmas [104].

Az alkalmazott többdimenziós egysejt fehérje profil (viSNE) kimutatta, hogy a 3D (Cytodex3 és Nutrisphere) kultúrák átmenetet jelentenek a 2D-ből az *in vivo* állapot felé a TRA-1-60, TMEM45A, pan-keratin, CD326, MCT4, Gal-3, CD66, GLUT1 és a CD274 kifejeződése alapján. A CA9, CD24 és az *EGFR* ezzel szemben magasabb kifejeződést mutatott a 3D Cytodex3 és Nutrisphere kultúrákban, mint az *in vivo* tumorokban (15. ábra). A citometriás eredmények egybeillesztése során kapott multiparametrikus, többdimenziós ábra jól szemlélteti (16. ábra) a különböző tenyésztési módok és *in vivo* tumorok közötti fehérje átfedéseket. Ezekből az eredményekből jól látható, hogy három jól elkülönülő régiót kaptunk, ahol a kultúrán belüli sejtek heterogenitását az adott régió kiterjedése és szegmentálódása fejezi ki. Itt is jól megfigyelhető, hogy a 2D tenyészetek minimális heterogenitással bírnak, minimális átfedéssel mind a 3D kultúrákkal, mind az *in vivo* tumorokkal. A markerek a tenyészetek szintjén való komplex vizsgálatához a tenyészeteken mért mintázatot ötagú radarkép formájában is kifejeztük, ahol az öt csúcs az öt különböző mintaféleséget képviseli. A radarkép koncentrikus körei a tenyészeteken belüli pozitív sejtek százalékos arányát mutatják (17. ábra a). Az *in vivo* tumorok esetében a TRA-1-60 sejtek 9%-ban, a TMEM45A a sejtek 37,5%-ban, a pan-keratin a sejtek 50%-ban, a CD326 a sejtek 100%-ban, az MCT4 a sejtek 50%-ban, a GAL-3 a sejtek 30%-ban, a CD66 a sejtek 100%-ban, a GLUT1 pedig a sejtek 100%-ban volt jelen a tumoros mintákban, míg ezen fehérjék a különböző tenyésztési módok közül egyikben sem fejeződött ki ilyen magas mértékben, mint

az *in vivo* tumorokban. A 3D minták esetében azonban a CA9, CD24, EGFR mutatott a tumoroktól magasabb expressziót (17. ábra a).

Összefoglalásként elmondható, hogy egy szervezet, vagy daganat bonyolultsága sokkal komplexebb, mint az egy *in vitro* tenyésztés során modellezhető. A multicelluláris 3D kultúrák a vizsgálataink alapján azonban sokkal összetettebb módon képviselik az *in vivo* körülményeket, valamint hatékonyabb eszközt biztosítanak a különböző molekuláris biológiai vizsgálatokhoz, valamint az új daganatellenes gyógyszerek, molekulakönyvtárak szűréséhez. A kutatásunk során a vizsgált A549 kultúra génexpressziós és CyTOF fehérje szintű vizsgálata alapján úgy tűnik, hogy a 3D tenyészetek sejtjein több potenciális gyógyszer célpont fejeződik ki, mint a 2D tenyésztések esetén.

Az új típusú 3D kultúrák genomikai és a proteomikai vizsgálata új utakat nyitott a tumorellenes terápiában is, mivel általuk új terápiás és diagnosztikai célpontokat azonosíthatunk. A gyógyszerkutatás preklinikai szakaszában egyre inkább használt innovatív 3D technikák hozzájárulnak a pontosabb, nagy áteresztőképességű hatóanyag szűréshez, melyek hatékonyabb gyógyszerjelölteket eredményeznek. Ezért is tartottuk kiemelten fontosnak a már ismert és új 3D tenyésztési módszereket létrehozni és jellemezni mind a gének, mind a fehérjék kifejeződésének a szintjén, mivel általuk pontosabb képet kapunk a különböző technikák alkalmazhatóságáról. Ezek a kutatások nem csak egy adott gyógyszerre adott általános sejtválaszról (citotoxicitásról) nyújtanak majd pontosabb információt, hanem új jelátviteli mechanizmusok felfedezéséhez is hozzájárulhatnak azáltal, hogy pontosabban modellezik az *in vivo* transzkripciós és translációs válaszokat egy adott szerre [105].

Munkám harmadik tézisében különböző mátrixban és tenyésztési körülmények között növesztett humán MCF-7 és egér 4T1 emlő daganatsejteket használtunk tumorellenes hatóanyagok szűrésére igazolva a 2D és 3D sejt kultúrák eltérő kemorezisztenciáját. Kísérleteinkben referencia kemoterápiás szer, a doxorubicin és egy általunk szintetizált 67 tagú kismolekulakönyvtár 2D és 3D tenyészeteken való párhuzamos szűrését végeztük el. A szűrés során az újonnan szintetizált imidazo [1,2-b] pirazol-7-karboxamidok potenciális tumorellenes hatását vizsgáltuk, amiből 45 újonnan szintetizált kismolekulából 16 bizonyult aktívnak a 4T1 és az

MCF7 sejtvonalakon (3. táblázat). Az eredményeink igazolták az irodalomban leírtakat: a 16 aktív kismolekulából 6 vegyület esetén minimum két és félszeres hatásbéli különbséget mutattak az eltérő sejt kultúrákban. Ezekben az esetekben 3D tenyészetek kevésbé voltak érzékenyek az adott szerre, beleértve a klinikumban széleskörűen használt és jól ismert doxorubicinre is.

Figyelembe véve a PhD kutatásom eredményeit és az áttekintett tudományos eredményeket az *in vitro* tumormodellek fejlesztése még korántsem tekinthető befejezettnek. A nagymértékben heterogén kórképet mutató daganatok kellő részletességű *in vitro* modellezése még több évnyi kitartó munkát követel mind a kutatóktól mind a klinikusoktól egyaránt. A sikeres modellrendszerek kidolgozásához tartoznak a munkám során vizsgált háromdimenziós modellrendszerek is. Összességében elmondható, hogy a tézisekben bemutatott 3D sejttenyészetek alkalmasak hatóanyagok szűrésére, amely utat nyithat új rákellenes szerek azonosításához. Ilyen komplex modellrendszerek egyre nagyobb teret fognak hódítani hamarosan nem csak a preklinikai kísérletekben, hanem a klinikai diagnosztikában és a terápiában egyaránt.

Köszönetnyilvánítás

A jelenlegi munka megvalósításához köszönetemet szeretném kifejezni:

Témavezetőimnek,

Dr. Puskás Lászlónak, aki mind emberileg, mind szakmailag példát mutatott és messzemenően támogatott a kutatásban és az eredmények publikálásában egyaránt.

Dr. Szebeni Gábornak, akihez, ha szakmailag akadályba ütköztem mindig fordulhattam, motivált és ösztönzött.

Valamint munkatársaimnak:

Balogh Józsefnek, aki a CyTOF mérések kivitelezésében és adatfeldolgozásában nyújtott szakmai segítséget.

Dr. Nagy Lajosnak, Dr. Fehér Liliánának és Dr. Hackler Lászlónak, akik szakmai segítséget nyújtottak az 1536 qRT-PCR vizsgálatok kivitelezése során.

Dr. Faragó Nórának, aki a nagy áteresztőképességű nanokapilláris qRT-PCR vizsgálatok elvégzésében nyújtott segítséget.

Mán Imolának a sejtenyésztési munkákban nyújtott segítségért.

Juhász Judit asszisztensnek a kísérleti állatokkal végzett lelkiismeretes és odaadó munkájáért.

Dr. Csabai Zsoltnak, Dr. Knapp Leventének, Faragó Annának, Dr. Kari Beátának és Dr. Heinrich Lászlónak, hogy a munkám során barátilag támogattak.

Továbbá kiemelt köszönet illeti feleségemet, Alföldi-Zörgő Mónikát és lányomat Olgát, a munkám során nyújtott önzetlen támogatásukért, végtelen türelmükért és mert hittek bennem.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Abbott A. Cell culture: biology's new dimension. *Nature*. 2003;424(6951):870-872. doi:10.1038/424870a
2. Weigelt B, Lo AT, Park CC, Gray JW, Bissell MJ. HER2 signaling pathway activation and response of breast cancer cells to HER2-targeting agents is dependent strongly on the 3D microenvironment. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;122(1):35-43. doi:10.1007/s10549-009-0502-2
3. Jianmin Z, Hongfang W, Meifu F. Resistance of multicellular aggregates to pharmorubicin observed in human hepatocarcinoma cells. *Braz J Med Biol Res*. 2002;35(2):255-260. doi:10.1590/s0100-879x2002000200015
4. Forde PM, Rudin CM. Crizotinib in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Expert Opin Pharmacother*. 2012;13(8):1195-1201. doi:10.1517/14656566.2012.688029
5. Zupkó I, Molnár J, Réthy B, et al. Anticancer and multidrug resistance-reversal effects of solanidine analogs synthesized from pregnadienolone acetate. *Molecules*. 2014;19(2):2061-2076. Published 2014 Feb 17. doi:10.3390/molecules19022061
6. Puskás LG, Fehér LZ, Vizler C, et al. Polyunsaturated fatty acids synergize with lipid droplet binding thalidomide analogs to induce oxidative stress in cancer cells. *Lipids Health Dis*. 2010;9:56. Published 2010 Jun 2. doi:10.1186/1476-511X-9-56
7. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
8. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029-1033. doi:10.1126/science.1160809
9. Courtney R, Ngo DC, Malik N, Ververis K, Tortorella SM, Karagiannis TC. Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. *Mol Biol Rep*. 2015;42(4):841-851. doi:10.1007/s11033-015-3858-x
10. Finger EC, Giaccia AJ. Hypoxia, inflammation, and the tumor microenvironment in metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29(2):285-293. doi:10.1007/s10555-010-9224-5
11. Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev*. 2010;20(1):51-56. doi:10.1016/j.gde.2009.10.009
12. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(10):721-732. doi:10.1038/nrc1187
13. Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*. 2006;70(5):1469-1480. doi:10.1124/mol.106.027029
14. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(9):582-598. doi:10.1038/nrc.2016.73
15. Chen X, Song E. Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Drug Discov*. 2019;18(2):99-115. doi:10.1038/s41573-018-0004-1
16. Kobayashi H, Enomoto A, Woods SL, Burt AD, Takahashi M, Worthley DL. Cancer-associated fibroblasts in gastrointestinal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(5):282-295. doi:10.1038/s41575-019-0115-0.
17. Kojima Y, Acar A, Eaton EN, et al. Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary

- stromal myofibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(46):20009-20014. doi:10.1073/pnas.1013805107
18. Vicent S, Sayles LC, Vaka D, et al. Cross-species functional analysis of cancer-associated fibroblasts identifies a critical role for CLCF1 and IL-6 in non-small cell lung cancer in vivo. *Cancer Res*. 2012;72(22):5744-5756. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1097
 19. Löhr M, Schmidt C, Ringel J, et al. Transforming growth factor-beta1 induces desmoplasia in an experimental model of human pancreatic carcinoma. *Cancer Res*. 2001;61(2):550-555.
 20. Aoyagi Y, Oda T, Kinoshita T, et al. Overexpression of TGF-beta by infiltrated granulocytes correlates with the expression of collagen mRNA in pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2004;91(7):1316-1326. doi:10.1038/sj.bjc.6602141
 21. Lin Y, Xu J, Lan H. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical therapeutic applications. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):76. Published 2019 Jul 12. doi:10.1186/s13045-019-0760-3
 22. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010;141(1):39-51. doi:10.1016/j.cell.2010.03.014
 23. Szebeni GJ, Vizler C, Kitajka K, Puskas LG. Inflammation and Cancer: Extra- and Intracellular Determinants of Tumor-Associated Macrophages as Tumor Promoters. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:9294018. doi:10.1155/2017/9294018
 24. Weis SM, Cheresh DA. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med*. 2011;17(11):1359-1370. Published 2011 Nov 7. doi:10.1038/nm.2537
 25. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011;473(7347):298-307. doi:10.1038/nature10144
 26. Casazza A, Di Conza G, Wenes M, Finisguerra V, Deschoemaeker S, Mazzone M. Tumor stroma: a complexity dictated by the hypoxic tumor microenvironment. *Oncogene*. 2014;33(14):1743-1754. doi:10.1038/onc.2013.121
 27. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(6):401-410. doi:10.1038/nrc1093
 28. Desgrosellier JS, Cheresh DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(1):9-22. doi:10.1038/nrc2748
 29. Roy R, Yang J, Moses MA. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(31):5287-5297. doi:10.1200/JCO.2009.23.5556
 30. Le QT, Harris J, Magliocco AM, et al. Validation of lysyl oxidase as a prognostic marker for metastasis and survival in head and neck squamous cell carcinoma: Radiation Therapy Oncology Group trial 90-03. *J Clin Oncol*. 2009;27(26):4281-4286. doi:10.1200/JCO.2008.20.6003
 31. Wenger C, Ellenrieder V, Alber B, et al. Expression and differential regulation of connective tissue growth factor in pancreatic cancer cells. *Oncogene*. 1999;18(4):1073-1080. doi:10.1038/sj.onc.1202395
 32. Multhaupt HA, Leitinger B, Gullberg D, Couchman JR. Extracellular matrix component signaling in cancer. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;97:28-40. doi:10.1016/j.addr.2015.10.013
 33. Zeng ZS, Cohen AM, Guillem JG. Loss of basement membrane type IV collagen is associated with increased expression of metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2

- and MMP-9) during human colorectal tumorigenesis. *Carcinogenesis*. 1999;20(5):749-755. doi:10.1093/carcin/20.5.749
34. Henriot P, Emonard H. Matrix metalloproteinase-2: Not (just) a "hero" of the past. *Biochimie*. 2019;166:223-232. doi:10.1016/j.biochi.2019.07.019
 35. Eble JA, Niland S. The extracellular matrix in tumor progression and metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2019;36(3):171-198. doi:10.1007/s10585-019-09966-1
 36. Caliari SR, Burdick JA. A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nat Methods*. 2016;13(5):405-414. doi:10.1038/nmeth.3839
 37. Ahmed EM. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J Adv Res*. 2015;6(2):105-121. doi:10.1016/j.jare.2013.07.006
 38. Benton G, Arnaoutova I, George J, Kleinman HK, Koblinski J. Matrigel: from discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;79-80:3-18. doi:10.1016/j.addr.2014.06.005
 39. Levis HJ, Kureshi AK, Massie I, Morgan L, Vernon AJ, Daniels JT. Tissue Engineering the Cornea: The Evolution of RAFT. *J Funct Biomater*. 2015;6(1):50-65. Published 2015 Jan 22. doi:10.3390/jfb6010050
 40. Loessner D, Stok KS, Lutolf MP, Hutmacher DW, Clements JA, Rizzi SC. Bioengineered 3D platform to explore cell-ECM interactions and drug resistance of epithelial ovarian cancer cells. *Biomaterials*. 2010;31(32):8494-8506. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.07.064
 41. Booiij TH, Price LS, Danen EHJ. 3D Cell-Based Assays for Drug Screens: Challenges in Imaging, Image Analysis, and High-Content Analysis. *SLAS Discov*. 2019;24(6):615-627. doi:10.1177/2472555219830087
 42. Breslin S, O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today*. 2013;18(5-6):240-249. doi:10.1016/j.drudis.2012.10.003
 43. Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc*. 2009;4(3):309-324. doi:10.1038/nprot.2008.226
 44. Vinci M, Gowan S, Boxall F, et al. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biol*. 2012;10:29. Published 2012 Mar 22. doi:10.1186/1741-7007-10-29
 45. Hsiao AY, Tung YC, Qu X, Patel LR, Pienta KJ, Takayama S. 384 hanging drop arrays give excellent Z-factors and allow versatile formation of co-culture spheroids. *Biotechnol Bioeng*. 2012;109(5):1293-1304. doi:10.1002/bit.24399
 46. Drewitz M, Helbling M, Fried N, et al. Towards automated production and drug sensitivity testing using scaffold-free spherical tumor microtissues. *Biotechnol J*. 2011;6(12):1488-1496. doi:10.1002/biot.201100290
 47. Amaral RLF, Miranda M, Marcato PD, Swiech K. Comparative Analysis of 3D Bladder Tumor Spheroids Obtained by Forced Floating and Hanging Drop Methods for Drug Screening. *Front Physiol*. 2017;8:605. Published 2017 Aug 22. doi:10.3389/fphys.2017.00605
 48. Tung YC, Hsiao AY, Allen SG, Torisawa YS, Ho M, Takayama S. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *Analyst*. 2011;136(3):473-478. doi:10.1039/c0an00609b
 49. Wang J, Zhang X, Li X, et al. Anti-gastric cancer activity in three-dimensional tumor spheroids of bufadienolides. *Sci Rep*. 2016;6:24772. Published 2016 Apr 21. doi:10.1038/srep24772

50. Bresciani G, Hofland LJ, Dogan F, Giamas G, Gagliano T, Zatelli MC. Evaluation of Spheroid 3D Culture Methods to Study a Pancreatic Neuroendocrine Neoplasm Cell Line. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:682. Published 2019 Oct 4. doi:10.3389/fendo.2019.00682
51. Guo WM, Loh XJ, Tan EY, Loo JS, Ho VH. Development of a magnetic 3D spheroid platform with potential application for high-throughput drug screening. *Mol Pharm*. 2014;11(7):2182-2189. doi:10.1021/mp5000604
52. Baillargeon P, Shumate J, Hou S, et al. Automating a Magnetic 3D Spheroid Model Technology for High-Throughput Screening. *SLAS Technol*. 2019;24(4):420-428. doi:10.1177/2472630319854337
53. Lin CY, Huang CH, Wu YK, Cheng NC, Yu J. Maintenance of human adipose derived stem cell (hASC) differentiation capabilities using a 3D culture. *Biotechnol Lett*. 2014;36(7):1529-1537. doi:10.1007/s10529-014-1500-y
54. White LA, Ades EW. Growth of Vero E-6 cells on microcarriers in a cell bioreactor. *J Clin Microbiol*. 1990;28(2):283-286. doi:10.1128/JCM.28.2.283-286.1990
55. Rodrigues ME, Costa AR, Fernandes P, et al. Evaluation of macroporous and microporous carriers for CHO-K1 cell growth and monoclonal antibody production. *J Microbiol Biotechnol*. 2013;23(9):1308-1321. doi:10.4014/jmb.1304.04011
56. Merten OW. Advances in cell culture: anchorage dependence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2015;370(1661):20140040. doi:10.1098/rstb.2014.0040
57. Thoma CR, Zimmermann M, Agarkova I, Kelm JM, Krek W. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;69-70:29-41. doi:10.1016/j.addr.2014.03.001
58. Sabhachandani P, Motwani V, Cohen N, Sarkar S, Torchilin V, Konry T. Generation and functional assessment of 3D multicellular spheroids in droplet based microfluidics platform. *Lab Chip*. 2016;16(3):497-505. doi:10.1039/c5lc01139f
59. Kwapiszewska K, Michalczyk A, Rybka M, Kwapiszewski R, Brzózka Z. A microfluidic-based platform for tumour spheroid culture, monitoring and drug screening. *Lab Chip*. 2014;14(12):2096-2104. doi:10.1039/c4lc00291a
60. Aref AR, Huang RY, Yu W, et al. Screening therapeutic EMT blocking agents in a three-dimensional microenvironment. *Integr Biol (Camb)*. 2013;5(2):381-389. doi:10.1039/c2ib20209c
61. Szebeni GJ, Balázs Á, Madarász I, et al. Achiral Mannich-Base Curcumin Analogs Induce Unfolded Protein Response and Mitochondrial Membrane Depolarization in PANC-1 Cells. *Int J Mol Sci*. 2017;18(10):2105. Published 2017 Oct 7. doi:10.3390/ijms18102105
62. Mán I, Szebeni GJ, Plangár I, et al. Novel real-time cell analysis platform for the dynamic monitoring of ionizing radiation effects on human tumor cell lines and primary fibroblasts. *Mol Med Rep*. 2015;12(3):4610-1619. doi:10.3892/mmr.2015.4004
63. Molnár J, Szebeni GJ, Csupor-Löffler B, et al. Investigation of the Antiproliferative Properties of Natural Sesquiterpenes from *Artemisia asiatica* and *Onopordum acanthium* on HL-60 Cells in Vitro. *Int J Mol Sci*. 2016;17(2):83. Published 2016 Feb 17. doi:10.3390/ijms17020083
64. Szebeni GJ, Tancos Z, Feher LZ, et al. Real architecture For 3D Tissue (RAFT™) culture system improves viability and maintains insulin and glucagon

- production of mouse pancreatic islet cells. *Cytotechnology*. 2017;69(2):359-369. doi:10.1007/s10616-017-0067-6
65. Alföldi R, Balog JÁ, Faragó N, et al. Single Cell Mass Cytometry of Non-Small Cell Lung Cancer Cells Reveals Complexity of In vivo And Three-Dimensional Models over the Petri-dish. *Cells*. 2019;8(9):1093. Published 2019 Sep 16. doi:10.3390/cells8091093
 66. Dolensšek J, Rupnik MS, Stožer A. Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets*. 2015;7(1):e1024405. doi:10.1080/19382014.2015.1024405
 67. Suckale J, Solimena M. Pancreas islets in metabolic signaling--focus on the beta-cell. *Front Biosci*. 2008;13:7156-7171. Published 2008 May 1. doi:10.2741/3218
 68. Bratosin D, Mitrofan L, Palić C, Estaquier J, Montreuil J. Novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging. *Cytometry A*. 2005;66(1):78-84. doi:10.1002/cyto.a.20152
 69. Palma PF, Baggio GL, Spada C, Silva RD, Ferreira SI, Treitinger A. Evaluation of annexin V and Calcein-AM as markers of mononuclear cell apoptosis during human immunodeficiency virus infection. *Braz J Infect Dis*. 2008;12(2):108-114. doi:10.1590/s1413-86702008000200003
 70. Furuya H, Kimura T, Murakami M, Katayama K, Hirose K, Yamaguchi A. Revascularization and function of pancreatic islet isografts in diabetic rats following transplantation. *Cell Transplant*. 2003;12(5):537-544. doi:10.3727/000000003108746993
 71. Pepper AR, Gala-Lopez B, Ziff O, Shapiro AM. Revascularization of transplanted pancreatic islets and role of the transplantation site. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:352315. doi:10.1155/2013/352315
 72. Efrat S. Making sense of glucose sensing. *Nat Genet*. 1997;17(3):249-250. doi:10.1038/ng1197-249
 73. Lim DJ, Antipenko SV, Anderson JM, et al. Enhanced rat islet function and survival in vitro using a biomimetic self-assembled nanomatrix gel. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(3-4):399-406. doi:10.1089/ten.TEA.2010.0151
 74. Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FD. 3D cell culture systems: advantages and applications. *J Cell Physiol*. 2015;230(1):16-26. doi:10.1002/jcp.24683
 75. Mason MN, Arnold CA, Mahoney MJ. Entrapped collagen type 1 promotes differentiation of embryonic pancreatic precursor cells into glucose-responsive beta-cells when cultured in three-dimensional PEG hydrogels. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(12):3799-3808. doi:10.1089/ten.tea.2009.0148
 76. Wang RN, Rosenberg L. Maintenance of beta-cell function and survival following islet isolation requires re-establishment of the islet-matrix relationship. *J Endocrinol*. 1999;163(2):181-190. doi:10.1677/joe.0.1630181
 77. Vass L, Kelemen JZ, Fehér LZ, et al. Toxicogenomics screening of small molecules using high-density, nanocapillary real-time PCR. *Int J Mol Med*. 2009;23(1):65-74.
 78. Fabian G, Farago N, Feher LZ, et al. High-density real-time PCR-based in vivo toxicogenomic screen to predict organ-specific toxicity. *Int J Mol Sci*. 2011;12(9):6116-6134. doi:10.3390/ijms12096116
 79. Meijer TW, Schuurbiens OC, Kaanders JH, et al. Differences in metabolism between adeno- and squamous cell non-small cell lung carcinomas: spatial

- distribution and prognostic value of GLUT1 and MCT4. *Lung Cancer*. 2012;76(3):316-323. doi:10.1016/j.lungcan.2011.11.006
80. Porporato PE, Dhup S, Dadhich RK, Copetti T, Sonveaux P. Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. *Front Pharmacol*. 2011;2:49. Published 2011 Aug 25. doi:10.3389/fphar.2011.00049
 81. Powell E, Shao J, Picon HM, et al. A functional genomic screen in vivo identifies CEACAM5 as a clinically relevant driver of breast cancer metastasis. *NPJ Breast Cancer*. 2018;4:9. Published 2018 Apr 30. doi:10.1038/s41523-018-0062-x
 82. Zhao W, Li Y, Zhang X. Stemness-Related Markers in Cancer. *Cancer Transl Med*. 2017;3(3):87-95. doi:10.4103/ctm.ctm_69_16
 83. Schmit K, Michiels C. TMEM Proteins in Cancer: A Review. *Front Pharmacol*. 2018;9:1345. Published 2018 Dec 6. doi:10.3389/fphar.2018.01345
 84. Wee P, Wang Z. Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers (Basel)*. 2017;9(5):52. Published 2017 May 17. doi:10.3390/cancers9050052
 85. Levina V, Marrangoni AM, DeMarco R, Gorelik E, Lokshin AE. Drug-selected human lung cancer stem cells: cytokine network, tumorigenic and metastatic properties. *PLoS One*. 2008;3(8):e3077. Published 2008 Aug 27. doi:10.1371/journal.pone.0003077
 86. Zakaria N, Yusoff NM, Zakaria Z, et al. Human non-small cell lung cancer expresses putative cancer stem cell markers and exhibits the transcriptomic profile of multipotent cells. *BMC Cancer*. 2015;15:84. Published 2015 Feb 25. doi:10.1186/s12885-015-1086-3
 87. Nangia-Makker P, Hogan V, Raz A. Galectin-3 and cancer stemness. *Glycobiology*. 2018;28(4):172-181. doi:10.1093/glycob/cwy001
 88. Pawelczyk K, Piotrowska A, Ciesielska U, et al. Role of PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer and Their Prognostic Significance according to Clinicopathological Factors and Diagnostic Markers. *Int J Mol Sci*. 2019;20(4):824. Published 2019 Feb 14. doi:10.3390/ijms20040824
 89. Karantza V. Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene*. 2011;30(2):127-138. doi:10.1038/onc.2010.456
 90. Liu F, Chen Z, Wang J, et al. Overexpression of cell surface cytokeratin 8 in multidrug-resistant MCF-7/MX cells enhances cell adhesion to the extracellular matrix. *Neoplasia*. 2008;10(11):1275-1284. doi:10.1593/neo.08810
 91. Godfroid E, Geuskens M, Dupressoir T, Parent I, Szpirer C. Cytokeratins are exposed on the outer surface of established human mammary carcinoma cells. *J Cell Sci*. 1991;99 (Pt 3):595-607.
 92. Amir el-AD, Davis KL, Tadmor MD, et al. viSNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia. *Nat Biotechnol*. 2013;31(6):545-552. doi:10.1038/nbt.2594
 93. Lv D, Hu Z, Lu L, Lu H, Xu X. Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery. *Oncol Lett*. 2017;14(6):6999-7010. doi:10.3892/ol.2017.7134
 94. Amoêdo ND, Valencia JP, Rodrigues MF, Galina A, Rumjanek FD. How does the metabolism of tumour cells differ from that of normal cells. *Biosci Rep*. 2013;33(6):e00080. Published 2013 Nov 15. doi:10.1042/BSR20130066
 95. Voss MJ, Niggemann B, Zänker KS, Entschladen F. Tumour reactions to hypoxia. *Curr Mol Med*. 2010;10(4):381-386. doi:10.2174/156652410791317020

96. Airley RE, Mobasher A. Hypoxic regulation of glucose transport, anaerobic metabolism and angiogenesis in cancer: novel pathways and targets for anticancer therapeutics. *Chemotherapy*. 2007;53(4):233-256. doi:10.1159/000104457
97. Gonzalez CD, Alvarez S, Ropolo A, Rosenzvit C, Bagnes MF, Vaccaro MI. Autophagy, Warburg, and Warburg reverse effects in human cancer. *Biomed Res Int*. 2014;2014:926729. doi:10.1155/2014/926729
98. Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *Int J Mol Sci*. 2015;16(3):5517-5527. Published 2015 Mar 11. doi:10.3390/ijms16035517
99. Pickl M, Ries CH. Comparison of 3D and 2D tumor models reveals enhanced HER2 activation in 3D associated with an increased response to trastuzumab. *Oncogene*. 2009;28(3):461-468. doi:10.1038/onc.2008.394
100. Svirshchevskaya E, Doronina E, Grechikhina M, et al. Characteristics of multicellular tumor spheroids formed by pancreatic cells expressing different adhesion molecules. *Life Sci*. 2019;219:343-352. doi:10.1016/j.lfs.2019.01.034
101. Stadler M, Scherzer M, Walter S, et al. Exclusion from spheroid formation identifies loss of essential cell-cell adhesion molecules in colon cancer cells. *Sci Rep*. 2018;8(1):1151. Published 2018 Jan 18. doi:10.1038/s41598-018-19384-0
102. Jia W, Jiang X, Liu W, et al. Effects of three-dimensional collagen scaffolds on the expression profiles and biological functions of glioma cells. *Int J Oncol*. 2018;52(6):1787-1800. doi:10.3892/ijo.2018.4330
103. Pacheco-Marín R, Melendez-Zajgla J, Castillo-Rojas G, et al. Transcriptome profile of the early stages of breast cancer tumoral spheroids. *Sci Rep*. 2016;6:23373. Published 2016 Mar 29. doi:10.1038/srep23373
104. Joosse SA, Hannemann J, Spötter J, et al. Changes in keratin expression during metastatic progression of breast cancer: impact on the detection of circulating tumor cells. *Clin Cancer Res*. 2012;18(4):993-1003. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2100
105. Kunz-Schughart LA, Freyer JP, Hofstaedter F, Ebner R. The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *J Biomol Screen*. 2004;9(4):273-285. doi:10.1177/1087057104265040

ÖSSZEFOGLALÓ

A dolgozat a során a különböző módon előállított háromdimenziós *in vitro* sejtenyésztési eljárásokkal kialakított multicelluláris szferoidok vizsgálatát végeztem el annak érdekében, hogy összehasonlítsam azokat a normál *in vivo* fiziológiás szöveti állapottal, valamint a széleskörben használt hagyományos kétdimenziós sejtenyészetekkel. Továbbá igyekeztem bemutatni a kialakított rendszereken, illetve a létrehozott szferoidokon végzett vizsgálatok eredményeit, melyek alapján négy fő megállapításra jutottunk

- i. A RAFT™ alkalmazása az egér hasnyálmirigy-szigetek hosszú távú fenntartására kiváló eredményeket mutatott, mivel a szigetek integritása, speciális sejteinek inzulin és glükagon termelése legalább tizennyolc napig *ex vivo* megmaradt. A kapott eredményeink alapján a RAFT™ ígéretes eszköznek bizonyul, mivel a klinikumban nagy igény mutatkozik az olyan terápiák iránt, ahol a cukorbetegnek inzulinpótlását a szervezetükbe ültetett inzulin termelő xenograft szigetekkel tudnák pótolni. Tudomásunk szerint csoportunk közleménye volt az első a hasnyálmirigy-szigetek RAFT™ 3D *in vitro* sikeres fenntartásáról.
- ii. A 624 gént vizsgáló nanokapilláris qRT-PCR, valamint a 62 gént vizsgáló 1536 qRT-PCR vizsgálatok az *in vivo* xenograft tumorok és a 3D A549 sejt kultúrák esetében magasabb *TMEM45A*, *SLC16A3*, *CD66*, *SLC2A1*, *CA9* és *CD24*, valamint alacsonyabb *EGFR* expressziót mutattak az egyrétegű 2D tenyészetekhez képest.
- iii. Az alkalmazott többdimenziós egysejt fehérje profil (viSNE) kimutatta, hogy a 3D (Cytodex3 és Nutrisphere) kultúrák átmenetet jelentenek a 2D-ből az *in vivo* állapot felé a *TRA-1-60*, *TMEM45A*, pan-keratin, *CD326*, *MCT4*, *Gal-3*, *CD66*, *GLUT1* és a *CD274* kifejeződése alapján. A *CA9*, *CD24* és az *EGFR* ezzel szemben magasabb kifejeződést mutatott a 3D Cytodex3 és Nutrisphere kultúrákban, mint az *in vivo* tumorokba.

- iv. A humán MCF-7 és egér 4T1 emlő daganatsejteket használva igazoltuk a 2D és 3D sejtkultúrák eltérő kemorezisztenciáját. Mivel a szűrés során az újonnan szintetizált imidazo [1,2-b] pirazol-7-karboxamidok potenciális tumorelles hatásának vizsgálata folyamán a 16 aktív kismolekulából 6 vegyület esetén minimum két és félszeres hatásbéli különbséget mértünk. Ezekben az esetekben 3D tenyészetek kevésbé voltak érzékenyek az adott szerre, beleértve a klinikumban széleskörűen használt és jól ismert doxorubicinre is. Ezzel az általunk létrehozott 3D kultúrákon is igazolva az irodalomban leírt hatás béli különbséget.

SUMMARY

The main goal of my work was to investigate different multicellular spheroids generated with different three-dimensional *in vitro* cell culture techniques in order to demonstrate their advantages over the two-dimensional culture method widely used today. In the current work, the results of the experiments carried out on the established spheroids are presented, which led to four main findings:

- i. The use of RAFT™ provided excellent results in preserving islet spheroid viability, structure integrity and insulin, glucagon production for at least 18 days *ex vivo*.

Based on our data, RAFT can be a promising tool both in research and therapy as well, as there is a great demand in the clinic for therapies where diabetic patients can replace their insulin supply with insulin-producing xenograft islets implanted in their bodies. To the best of our knowledge, our group's findings was first to report the successful maintenance of pancreatic islets using RAFT™ technique *in vitro*.

- ii. Gene expression analysis by nanocapillary qRT-PCR (624 genes) and 1536 well high-throughput qRT-PCR (62 genes) resulted in the selection of lung cancer markers associated with higher (TMEM45A, SLC16A3, CD66, SLC2A1, CA9, CD24) or lower (EGFR) expression *in vivo* or in 3D *in vitro* models compared to 2D monolayer cultures

- iii. The implemented multidimensional single cell proteomic profiling revealed that 3D (Cytodex3 and Nutrisphere) cultures represented a transition from 2D to *in vivo* situation by intermediate marker expression of TRA-1-60, TMEM45A, pan-keratin, CD326, MCT4, Gal-3, CD66, GLUT1, CD274. In 3D systems CA9, CD24, EGFR showed higher expression than *in vivo*.

- iv. Using human MCF-7 and mouse 4T1 mammary tumor cells, we demonstrated the different chemoresistance of 2D and 3D cell cultures. The performed screening investigated that 6 out of the 16 active small

imidazo[1,2-b]pyrazole-7-carboxamides molecules had different antitumor activity with minimum two and a half fold difference in potency using 2D and 3D in vitro cultures of same cell lines. In these cases, 3D cultures were less sensitive to the agent of interest, including the widely used and well-known doxorubicin. Our findings showed the reduced chemosensitivity of multicellular spheroids.