



Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Lekarski

Agata Olejniczak-Kęder

Charakterystyka modelu sferycznego linii komórkowych raka
jelita grubego i jego wykorzystanie w badaniach *in vitro*
z komórkami immunokompetentnymi i związkami
przeciwnowotworowymi

ROZPRAWA NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

Promotor:
Prof. dr n. med. Zbigniew Kmiec

Pracę wykonano w Katedrze i Zakładzie Histologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk 2019

**Pragnę podziękować wszystkim,
bez których niniejsza praca nie mogłaby powstać.**

Mojemu Promotorowi
Panu Profesorowi Zbigniewowi Kmieciewi,
za opiekę naukową, cenne wskazówki, życzliwość
oraz zapewnienie znakomitych warunków do pracy naukowej.

Pani Doktor Magdalenie Szaryńskiej,
za przekazaną mi wiedzę, ogromną życzliwość i wsparcie
oraz pomoc podczas realizacji celów pracy.

Koleżankom i Kolegom z Katedry i Zakładu Histologii,
za wspaniałą atmosferę pracy
i za to, że zawsze mogłam na nich liczyć.

Mojemu Mężowi i Rodzicom,
za ogromne wsparcie, cierpliwość i wyrozumiałość.

Spis treści / Contents

Wykaz skrótów / <i>List of abbreviations</i>	4
Wykaz publikacji oryginalnych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej / <i>List of publications included in the PhD dissertation</i>	6
STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM	8
Streszczenie pracy.....	8
1. Wprowadzenie	10
2. Cele pracy doktorskiej	20
3. Materiały i metody.....	22
4. Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.....	24
4.1. Publikacja 1. <i>In vitro</i> characterization of spheres derived from colorectal cancer cell lines	24
4.2. Publikacja 2. <i>Cancer stem cells as targets for DC-based immunotherapy</i> of colorectal cancer	28
4.3. Publikacja 3. <i>Effects of 5-FU and anti-EGFR antibody in combination with ASA</i> on the spherical culture system of HCT116 and HT29 colorectal cancer cell lines ..	33
5. Podsumowanie i wnioski	38
SUMMARY IN ENGLISH	41
Abstract.....	41
1. Introduction.....	43
2. Objectives of the research.....	52
3. Materials	54
4. Reviews of the publications included in the doctoral dissertation.....	55
4.1. Publication 1. <i>In vitro</i> characterization of spheres derived from colorectal cancer cell lines	55
4.2. Publication 2. <i>Cancer stem cells as targets for DC-based immunotherapy</i> of colorectal cancer	59
4.3. Publication 3. <i>Effects of 5-FU and anti-EGFR antibody in combination with ASA</i> on the spherical culture system of HCT116 and HT29 colorectal cancer cell lines ..	64
5. Summary.....	68
Wykaz cytowanego piśmiennictwa / <i>References</i>	71
Publikacje wchodzące w skład dysertacji / <i>Publications included in PhD dissertation</i>	82

Wykaz skrótów / *List of abbreviations*

2D	2 dimensional
3D	3 dimensional
5-FU	5-Fluorouracil
ALDH1	Aldehyde dehydrogenase 1 family
APC	Antigen presenting cell
ASA	Aspirin
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BMI-1	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog
CCR7	C-C chemokine receptor 7
COX-1	Cyclooxygenase 1
COX-2	Cyclooxygenase 2
CRC	Colorectal cancer
CSC	Cancer stem cell
DC	Dendritic cell
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
FasL	First apoptosis signal ligand
FasR	First apoptosis signal receptor
HMGB1	High mobility groupbox-1
IL-4, IL-10, IL-13	Interleukine 4, 10, 13
KD	Komórka dendrytyczna
LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LGR-5	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5
MHC I	Major histocompatibility complex I
MHC II	Major histocompatibility complex II
mTOR	Mammalian target of rapamycin kinase
NF-Kb	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	Natural killer cell
NKM	Nowotworowa komórka macierzysta
NKG2D	Natural killer group 2 member D
NKT	Natural killer T cell

OCT4	Octamer-binding transcription factor 4
PCR	Polymerase chain reaction
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PPARG	Peroxisome Proliferator-Activated receptor γ
PTGS2	Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2
RJG	Rak jelita grubego
RNA	Ribonucleic acid
SOX2	Sex determining region Y-box 2
TAA	Tumor-associated antigen
TCM	Tumor conditioned medium
TGF- β	Tumor growth factor β
Treg	Regulatory T cell
TSA	Tumor-specific antigen

W tekście pracy symbole genów oznaczono czcionką pochyloną, a symbole białek czcionką prostą.

Wykaz publikacji oryginalnych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej /
List of publications included in the PhD dissertation

1. Agata Olejniczak, Magdalena Szaryńska, Zbigniew Kmieć

“In vitro characterization of spheres derived from colorectal cancer cell lines”

International Journal of Oncology, 2018, 52:599-612

<https://www.spandidos-publications.com/ijo/52/2/599>

Impact Factor – 3,333, Punktacja MNiSW – 25,000

2. Magdalena Szaryńska, Agata Olejniczak, Jarosław Kobiela, Dariusz Łaski, Zbigniew Śledziński, Zbigniew Kmieć

“Cancer stem cells as targets for DC-based immunotherapy of colorectal cancer”

Scientific Reports, 2018, 8:1-22

<https://www.nature.com/articles/s41598-018-30525-3>

Impact Factor – 4,122, Punktacja MNiSW – 40,000

3. Agata Olejniczak-Kęder, Magdalena Szaryńska, Agata Wrońska, Kamila Siedlecka-Kroplewska, Zbigniew Kmieć

“Effects of 5-FU and anti-EGFR antibody in combination with ASA on the spherical culture system of HCT116 and HT29 colorectal cancer cell lines”

International Journal of Oncology, data publikacji online: 23 maja 2019,

DOI: 10.3892/ijo.2019.4809

<https://www.spandidos-publications.com/ijo/55/1/223>

Impact Factor – 3,333, Punktacja MNiSW – 25,000

Łączny współczynnik **Impact Factor** (*Total Impact Factor*): **10,788**

Łączna **punktacja MNiSW** (*Total number of points according to list of journals by Ministry of Science and Higher Education*): **90**

Rozprawa doktorska została wykonana w ramach zadania badawczego MN nr 01- 232/08/280 kierowanego przez mgr inż. Agatę Olejniczak-Kęder.

The experiments described in the PhD dissertation were financed by the MN grant no. 01-0232/08/280, Principal Investigator: Agata Olejniczak-Kęder, MSc eng.

Część badań rozprawy doktorskiej została wykonana w ramach realizacji grantu dr Magdaleny Szaryńskiej o numerze N N402 684040 pt. „Analiza wpływu ludzkich komórek dendrytycznych na właściwości biologiczne i molekularne pierwotnych linii raka jelita grubego człowieka w modelu mysim”, w którym mgr inż. Agata Olejniczak-Kęder była wykonawcą.

Part of the experiments described in the PhD dissertation was performed as a part of the grant of dr Magdalena Szaryńska no. N N402 684040, in which Agata Olejniczak-Kęder, MSc eng, was an investigator.

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Streszczenie pracy

Rak jelita grubego (RJG) stanowi jeden z najczęściej występujących nowotworów na świecie. Pomimo ciągłego postępu medycyny, nowotwór ten jest późno wykrywany, przez co cechuje go wysoka śmiertelność. Wiąże się to najprawdopodobniej z występowaniem nowotworowych komórek macierzystych, które są niewrażliwe na konwencjonalną chemioterapię i cechuje je zdolność do samoodnowy, przez co uważane są za przyczynę nawrotów choroby nowotworowej. Celem niniejszej pracy była charakterystyka modelu sferycznego linii RJG i ocena jego właściwości po interakcji z komórkami układu odpornościowego, a także, wybranymi lekami przeciwnowotworowymi.

Hodowla sferyczna linii komórkowych RJG, HCT116 oraz HT29, zdecydowanie lepiej naśladuje sposób wzrostu guza w warunkach *in vivo* w porównaniu do modelu 2D hodowli tych linii. Model sferyczny odzwierciedla właściwości i architekturę komórek guzów litych poprzez niejednorodny dostęp komórek do tlenu i składników odżywczych, ich obniżony potencjał proliferacyjny, znaczną frakcję komórek martwych/nekrotycznych oraz frakcję wyciszonych/uśpionych, więc potencjalnie macierzystych komórek.

Przeprowadzone eksperymenty potwierdzają, iż hodowla 3D stanowi wiarygodną platformę do badań nad potencjalnymi nowymi strategiami wykorzystującymi komórki odpornościowe w terapii nowotworów. Bazując na danych porównujących efekty stymulacji komórek dendrytycznych (KD) przy użyciu lizatów i supernatantów pochodzących z hodowli sferycznej i adherentnej, można wyciągnąć wnioski, że komórki z kolonosfer oddziałują z KD w sposób zbliżony do komórek wyizolowanych z nowotworowej tkanki pobranej od pacjentów z RJG. Więc, wzajemne interakcje pomiędzy komórkami układu odpornościowego i komórkami nowotworowymi są w modelu sferycznym bardziej wiarygodnie odzwierciedlone niż w przypadku wykorzystania adherentnych hodowli komórek nowotworowych. Kolonosfery stanowią ciekawą i efektywną alternatywę dla izolacji nowotworowych komórek o potencjale macierzystym z tkanek bezpośrednio pochodzących od pacjenta do prowadzenia wstępnych doświadczeń i optymalizacji procedur.

Ponadto, doświadczenia przeprowadzone na modelu sferycznym potwierdziły użyteczność kolonosfer do analizy właściwości potencjalnych związków o charakterze przeciwnowotworowym. Eksperymenty bazujące na kolonosferach dostarczyły wiarygodne i powtarzalne wyniki, które niejednokrotnie różniły się od danych uzyskanych z wykorzystaniem modelu adherentnego, potwierdzając tym samym różną wrażliwość komórek utrzymanych w formie 2D i 3D na zastosowane terapeutyki, oraz ujawniając większą oporność hodowli sferycznych na ewentualne uszkodzenia spowodowane lekami. Kolonosfery uzyskano z dwóch linii komórkowych RJG różniących się stopniem zaawansowania choroby w skali TNM, tak więc ich odmienna reaktywność wobec stosowanych związków potwierdza pośrednio, że komórki utrzymywane w tej formie stanowią swoiste fenokopie pierwotnego guza. W zastosowanym modelu badawczym potwierdzono, że najefektywniejsze w przypadku indukcji śmierci komórek nowotworowych są strategie wykorzystujące więcej niż jeden związek leczniczy do terapii. Takie podejście pozwala jednocześnie modulować kilka komórkowych szlaków sygnalizacyjnych lub metabolicznych, co zostało wykazane w omawianych badaniach.

Podsumowując, model sferyczny hodowli komórek RJG dobrze odzwierciedla cechy komórek występujących w guzie litym *in vivo*, ich wrażliwość na uszkodzenia wywołane związkami terapeutycznymi, potencjał proliferacyjny czy zdolność do modulowania odpowiedzi ze strony układu odpornościowego, dzięki czemu reprezentuje łatwo dostępne, wygodne i wiarygodne narzędzie badawcze w dziedzinie biologii nowotworów, jak i w określaniu interakcji pomiędzy komórkami nowotworowymi i komórkami układu odpornościowego.

1. Wprowadzenie

Rak jelita grubego (RJG) stanowi trzeci najczęściej diagnozowany typ nowotworu złośliwego na świecie (1). Szacuje się, iż w Polsce od 1980 r. nastąpił prawie trzykrotny wzrost liczby zachorowań na RJG u kobiet i czterokrotny wzrost u mężczyzn. Pięcioletnie przeżycie wśród pacjentów w ciągu pierwszej dekady XXI wynosiło około 48% u mężczyzn i 49% u kobiet. RJG plasuje się na czwartej pozycji wśród najczęstszych przyczyn śmierci na nowotwory, przez co przypisuje mu się odpowiedzialność za 12% zgonów nowotworowych (dane z *Krajowego Rejestru Nowotworów*, onkologia.org.pl).

Sugeruje się, iż za oporność na stosowaną chemio- i radioterapię, a także częste nawroty chorób nowotworowych odpowiedzialne są komórki o cechach macierzystych komórek pluripotencjalnych, tzw. nowotworowe komórki macierzyste (NKM, *ang. cancer stem cells, CSCs* lub *tumor initiating cells, TICs*). Zgodnie z tą teorią, NKM cechuje zdolność do samoodnowy i różnicowania się w każdy występujący w guzie typ komórki. Ponadto, tylko NKM mają zdolność do formowania i odbudowywania guza oraz wytwarzania jego fenokopii po przerzutowaniu (2-4). Występowanie NKM zostało opisane dotychczas w białaczkach (5) oraz nowotworach litych, m.in. czerniaku (6), raku piersi (7), trzustki (8), płuc (9), prostaty (10), jelita grubego (11, 12) oraz guzach mózgu (13-15). W związku z powyższym, charakterystyka NKM wydaje się być niezbędna, aby w pełni zrozumieć patomechanizm nowotworzenia.

Istnieje wiele technik służących do wykrycia oraz izolacji NKM, z czego najpowszechniej wykorzystywane są testy funkcjonalne (np. zdolność komórek do formowania sfer), molekularne (np. metody bazujące na technikach PCR), sortowanie komórek (wykorzystujące cytometrię przepływową lub oparte na izolacji magnetycznej komórek) i ksenotransplantacje do zwierząt laboratoryjnych z niedoborem odporności (Tabela 1). Każde z wymienionych podejść cechuje się zaletami, choć posiada także swoiste ograniczenia, stąd też idealne podejście do analizy właściwości NKM powinno bazować na połączeniu kilku z powyższych technik. Charakterystyka NKM jest często przeprowadzana w oparciu o obecność na powierzchni komórek określonych antygenów. Dla NKM wykrywanych w RJG najczęściej wykorzystywane są CD133, CD29, CD44, CD166, BMI-1, LGR-5, EpCAM (11, 12, 16-22) (Tabela 2). Należy jednak podkreślić, że nie ma jednego, idealnego markera, który pozwoliłby na bezpośrednią identyfikację NKM w RJG, stąd też postulowane jest użycie kombinacji kilku wybranych białek (23).

Ponadto, występowanie niektórych markerów na powierzchni komórki jest zależne i specyficzne dla danego pacjenta, a także uwarunkowane typem, lub nawet podtypem, nowotworu (24).

Tabela 1. Zestawienie i porównanie technik wykorzystywanych do izolacji komórek o właściwościach NKM. Własne opracowanie w oparciu o dane literaturowe (25-27).

	Metoda	Zalety	Wady
Izolacja komórek w oparciu o markery NKM	Cytometria przepływową wraz z sortowaniem populacji komórkowych	Izolacja i ocena ilościowa nawet rzadkich populacji komórkowych, separacja wieloparametrowa	Czasochłonna optymalizacja, analiza danych wymaga znacznej wiedzy teoretycznej na temat pożądanych populacji komórkowych, odpowiednia jedynie dla komórek w zawiesinie, niska żywotność wyizolowanych komórek, wysokie koszty
	Izolacja magnetyczna (MACS)	Łatwa, prosta i relatywnie tania metoda	Separacja oparta o jedynie jeden parametr, technika odpowiednia jedynie dla komórek w zawiesinie
Testy funkcjonalne	Zdolność tworzenia agregatów komórkowych	Łatwa metoda pozwalająca na określenie ilościowe populacji komórek	Czasochłonna procedura optymalizacji składu pożywki hodowlanej
	Hodowla komórek w agarze	Łatwa i relatywnie tania metoda pozwalająca na analizę ilościową komórek	Niska specyficzność
	Poboczna populacja z użyciem Hoechst 33342	Stosunkowo łatwa i prosta metoda, nie wymaga stosowania specjalnych markerów komórkowych	Wymaga czasochłonnej optymalizacji i użycia złożonego sprzętu, cechuje ją niska specyficzność, niewielka czystości frakcji, wymaga zastosowania toksycznego Hoechst 33342
	Analiza poziomu aktywności enzymu ALDH w komórkach o potencjale macierzystym	Szybka i tania metoda, bardziej wiarygodna w porównaniu do użycia markerów powierzchniowych	Niska specyficzność
	Analiza oporności komórek na terapię	Technika szybka, tania, szeroko stosowana	Niska specyficzność i czułość, zwykle czasochłonna
	Analiza komórek hipoksyjnych	Prosta, nie wymaga użycia dodatkowych odczynników	Wymaga czasochłonnej optymalizacji i użycia drogiego, złożonego sprzętu
	Analiza tempa podziałów komórkowych	Tanie odczynniki (np. PKH-26 i CFSE), szybka	Niska specyficzność i czułość
	Ksenotransplantacja	Efektywna i bardziej wiarygodna w porównaniu do użycia markerów powierzchniowych	Wymaga użycia zwierząt laboratoryjnych, dość droga ze względu na ich koszty utrzymania
Analizy molekularne	Techniki PCR	Wygodny, multiplexowy test, dość tani i relatywnie szybki, o wysokiej czułości	Nie pozwala na dokładne wykrycie NKM w analizowanej próbce, brak analizy morfologicznej komórek
Testy oparte na obrazowaniu	Immunohistochemia	Niedroga, specyficzna	Pozwala tylko na analizę próbki tkanki, wymaga dobrze wyszkolonego specjalisty w dziedzinie histologii
	Immunocytochemia	Szeroko zakrojona, bardzo efektywna i specyficzna metoda, stosunkowo niedroga	Może występować reaktywność krzyżowa, problemy z sygnałem pochodzącym z tła, pozwala tylko na analizę jakościową

W badaniach *in vitro* komórek nowotworowych powszechnie wykorzystuje się hodowle prowadzone w formie adherentnej, czyli pojedynczej warstwy komórek

przylegających do naczynia hodowlanego (model 2D). Jednak model ten nie odzwierciedla naturalnych warunków wzrostu guza *in vivo*. Stąd też na znaczeniu wydaje się zyskiwać tzw. model sferyczny. W hodowli sferycznej komórki nowotworowe tworzą zorganizowane trójwymiarowe agregaty, swobodnie unoszące się w pożywce hodowlanej. Konwencjonalne hodowle komórkowe 2D nie są w stanie naśladować złożoności i heterogenności guzów nowotworowych, rosnących *in vivo* w konformacji trójwymiarowej (3D) z określoną organizacją i architekturą, której nie można odtworzyć w hodowli jednowarstwowej. W konsekwencji, liczne sygnały zewnątrzkomórkowe, które kierują różnymi procesami komórkowymi, są tracone w hodowlach 2D. Model sferyczny naśladuje naturalną dystrybucję komórek nowotworowych w guzie litym, dzięki czemu komórki w obrębie określonych mikroregionów sfery 3D cechuje różna dostępność do tlenu (np. warunki hipoksyjne wewnątrz sfery), czynników wzrostowych i składników odżywczych, a także zróżnicowanie pod względem zdolności proliferacyjnych, umiejscowienia w cyklu komórkowym, podatności na uszkodzenia DNA i wydajności systemów naprawczych, akumulacji mleczanu (modulującego aktywność komórek układu immunologicznego) oraz ekspresji niektórych genów (28-31) (Rycina 1). Ze względu na fakt, że w przypadku hodowli sferycznych wykorzystuje się pożywki bezsurowicze, dzięki czemu ostateczny skład pożywki dostarczanej komórkom w hodowli można bardzo precyzyjnie zaplanować i wzbogacać tylko o cytokiny i czynniki wzrostowe, których obecność jest pożądana i niezbędna dla sukcesu ekspansji. Te same czynniki są wykorzystywane powszechnie w badaniach na hodowlach komórek niezróżnicowanych, o bardzo pierwotnym fenotypie, co powoduje, iż model sferyczny jest wzbogacony o komórki o cechach NKM (12, 28, 32-35). Koncepcja ta jest oparta o założenie, że prymitywne komórki, takie jak NKM, są w stanie wytworzyć sferę i przetrwać w medium bezsurowiczym, nawet, gdy nie utrzymują połączeń ze składnikami macierzy/mikrośrodowiska. Natomiast komórki zróżnicowane, nieposiadające cech NKM, w analogicznych warunkach ulegają *anoikis*, czyli śmierci komórkowej spowodowanej brakiem interakcji międzykomórkowych (29, 36-38). Ponadto, występowanie komórek o cechach NKM zostało potwierdzone także dla komercyjnie dostępnych nowotworowych linii komórkowych utrzymywanych w postaci sfer, m. in. w nowotworach płuc, mózgu, piersi, wątroby, jelit, prostaty, trzustki czy kości (35, 39-47). Należy jednak podkreślić, że istnieją prace sygnalizujące brak różnic w ilości

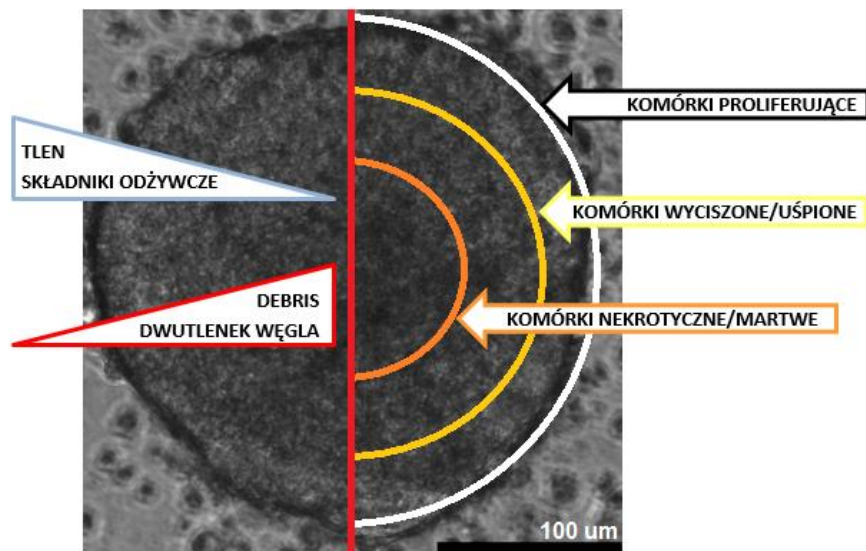
komórek o fenotypie NKM pomiędzy modelem adherentnym, a hodowlą 3D (48-50), lub nawet informujące o większej liczbie tych komórek w hodowli adherentnej (50).

Tabela 2. Wybrane markery wykorzystywane do określania komórek o cechach NKM oraz pełniona przez nie funkcja. Tabela własna stworzona na podstawie danych literaturowych (25, 51-53).

Nazwa markera NKM	Funkcja/znaczenie markera
ALDH1	Enzym detoksyfikacyjny przekształcający retinol do kwasu retinowego, który reguluje proliferację komórkową.
BMI-1	Wewnątrzkomórkowe białko hamujące czynniki transkrypcyjne regulujące cykl komórkowy i różnicowanie komórek. Używany do opisywania długo żyjących i wyciszonych komórek posiadających właściwości macierzyste. Komórki BMI-1- pozytywne mogą dawać początek komórkom wykazującym ekspresję LGR-5.
CD133	Glikoproteina błonowa zlokalizowana na powierzchni szybko dzielących się komórek macierzystych, zarówno prawidłowych, jak i zmienionych nowotworowo. Przypisywanych jest jej wiele funkcji, tj. regulacja właściwości macierzystych, oporności na terapię, modulacja metabolizmu komórkowego, autofagii.
CD166	Cząsteczka adhezyjna, której zaburzenia ekspresji są łączone ze zdolnością komórek do inwazji i przerzutowania.
CD24	Cząsteczka adhezyjna, która jest zaangażowana w utrzymywanie połączeń międzykomórkowych oraz pomiędzy komórkami i macierzą zewnątrzkomórkową. Jej ekspresja koreluje ze zwiększoną inwazyjnością komórek nowotworowych.
CD29	β 1 integryna regulująca adhezję komórek i ich przyleganie do elementów macierzy pozakomórkowej. Zaburzenia ekspresji CD29 prowadzą do dysplazji w obrębie komórek nabłonka jelit.
CD44	Transbłonowa glikoproteina, receptor dla kwasu hialuronowego i cząsteczka adhezyjna. CD44 odpowiada za interakcje pomiędzy komórkami oraz pomiędzy komórkami a macierzą pozakomórkową, tym samym regulując migrację komórek. Poprzez modulację ścieżki Wnt odpowiada za utrzymanie właściwości macierzystych.
EpCAM/ESA/CD326	Nabłonkowa cząsteczka adhezyjna zaangażowana w proliferację oraz różnicowanie komórek.
LGR-5	Glikoproteina przezbłonowa zaangażowana w regulację kanonicznej ścieżki Wnt. Reguluje procesy samoodnowy i zdolności do różnicowania się komórek. Wykorzystywana to opisywania aktywnych form NKM, które odpowiadają np. za odbudowę tkanki guza po terapii.
OCT4	Czynnik transkrypcyjny wpływający na embriogenezę, utrzymanie komórek o potencjale macierzystym, wzrost oraz przerzutowanie komórek guza.
SOX2	Czynnik transkrypcyjny, który zapobiega różnicowaniu komórek. Poziom SOX2 pozytywnie koreluje ze zdolnością komórek nowotworowych do przerzutowania. SOX2 kontroluje także ekspresję OCT4.

Poszukiwanie nowych środków terapeutycznych skierowanych przeciwko określonym nowotworom jest mało efektywne. Jedynie około 5% związków, które wykazywały aktywność w badaniach przedklinicznych *in vitro*, okazało się wystarczająco skutecznymi dla ukończenia III fazy badań klinicznych i zarejestrowania, jako leki. Dla porównania, odsetek ten w przypadku leków opracowywanych dla terapii chorób układu naczyniowego wynosi około 20% (54). Jest wiele przyczyn wpływających na tak małą wydajność procesu wyłaniającego nowe związki cechujące się właściwościami przeciwnowotworowymi. Kluczowe znaczenia ma wybór modelu

stosowanego do testowania związku m.in. w przedklinicznych badaniach skriningowych *in vitro* (55). Powszechnie przeprowadza się testy cytotoksyczności oparte na hodowlach adherentnych, które prawdopodobnie częściowo przyczyniają się do wzrostu, i tak już wysokiego, wskaźnika niepowodzeń badań klinicznych dla nowych cząstek. Oczywiście, podejście wykorzystujące model 2D ma bez wątpienia wiele zalet, (do których można zaliczyć m.in.: łatwość w utrzymaniu hodowli, proste metody pasażu, przystępne ceny pożywek hodowlanych itd.), a w przeszłości znacznie przyczyniło się do zwiększenia wiedzy na temat biologii nowotworów oraz do zapoczątkowania badań nad opracowywaniem nowych leków przeciwnowotworowych. Jednakże, model ten nie odzwierciedla naturalnych warunków wzrostu guzów litych (55). Stąd też wydaje się, że hodowla sferyczna byłaby bardziej odpowiednia w tych badaniach, chociażby ze względu na fakt, iż komórki występujące w sferach cechowałyby różny dostęp do zawartego w medium związku przeciwnowotworowego, a co za tym idzie, różna podatność na wywołaną nim śmierć komórkową. A takie właśnie zjawiska obserwuje się w obrębie guzów litych u pacjentów w czasie terapii.



Rycina 1. Rozkład komórek w obrębie sfery. Rycina własna oparta o wyniki własnych badań i dane literaturowe przedstawione w niniejszej rozprawie.

W literaturze istnieją doniesienia na temat wykorzystania kwasu acetylosalicylowego (aspiryna, ASA) w prewencji nowotworów i redukcji ryzyka śmierci spowodowanego nowotworami (56), w tym RJG (57, 58). Należy jednak podkreślić, że mechanizm działania ASA w kontekście nowotworzenia, nie został wyjaśniony, choć sugeruje się, że aspiryna może wpływać na komórki poprzez hamowanie aktywności

cyklooksygenaz, COX-1 i COX-2 (56), bądź inhibicję ścieżki sygnalizacyjnej mTOR i PI3K, ważnych w regulacji proliferacji komórek (59, 60). Ponadto, sugeruje się, że ASA może wywierać wpływ na komórki o właściwościach NKM zakłócając aktywność NF- κ B (61, 62) lub inhibicję PTGS i aktywację PPAR γ (63). Inna grupa związków o potencjale przeciwnowotworowym, której celem jest receptor dla EGF (przeciwciała anti-EGFR) cechuje różną efektywność działania, która zależy zarówno od typu nowotworu i jego podłoża genetycznego, jak i od rodzaju stosowanej terapii (64). Jednakże stosowanie terapii skierowanej przeciwko EGFR często prowadzi do wystąpienia oporności na lek poprzez wystąpienie nowych, wtórnych mutacji (65, 66).

Hodowle sferyczne wydają się reprezentować wiarygodne i użyteczne narzędzie badawcze także w dziedzinie immunoterapii, w tym ukierunkowanej na komórki o właściwościach NKM (67-70). Może to być związane z tym, że sfery mogą indukować inną odpowiedź ze strony komórek układu immunologicznego niż hodowle adherentne, ze względu na inny profil ekspresji genów i odmienny zestaw wydzielanych białek (71, 72). W przypadku chorób nowotworowych można wyróżnić dwie różne klasy antygenów związanych ze zmutowanymi komórkami, tj. antygeny specyficzne dla guza (ang. *tumor-specific antigens, TSAs*), które są kodowane przez zmutowane lub przearanżowane geny, oraz antygeny związane z guzem (ang. *tumor-associated antigens, TAAs*), które także występują na powierzchni komórki, jednak są kodowane przez normalne, liniowo-specyficzne geny (73). Okazuje się jednak, że komórki nowotworowe mogą unikać odpowiedzi immunologicznej poprzez obniżanie poziomu wybranych TAA (74), a więc bardzo prawdopodobne wydaje się, że prymitywne, nieodróżnicowane NKM selektywnie regulują ekspresję określonych TAA, przez co, stają się praktycznie niewykrywalne dla komórek układu odpornościowego. Potwierdzeniem tej hipotezy jest zmniejszona ekspresja białek niezbędnych do aktywacji limfocytów T, z klasy MHC I i MHC II, lub cząstek wymaganych do pobudzenia komórek NK, np. NKG2D, na powierzchni NKM, co pozwala im uniknąć bezpośredniego kontaktu z limfocytami (68, 71, 75). Zgodnie z danymi literaturowymi, NKM mogą wydzielać IL-4, IL-10, IL-13 oraz TGF- β , które negatywnie wpływają na funkcje komórek NK, limfocytów cytotoksycznych oraz komórek prezentujących antygeny (ang. *antigen-presenting cell, APC*) (71, 76-78). Dodatkowo, NKM cechuje zwiększony poziom białka PD-L1, kluczowego dla indukcji proliferacji, inwazyjności i przerzutowania nowotworu oraz rozwoju oporności na terapię. Jednocześnie białko PD-L1 opisuje się w kontekście regulacji

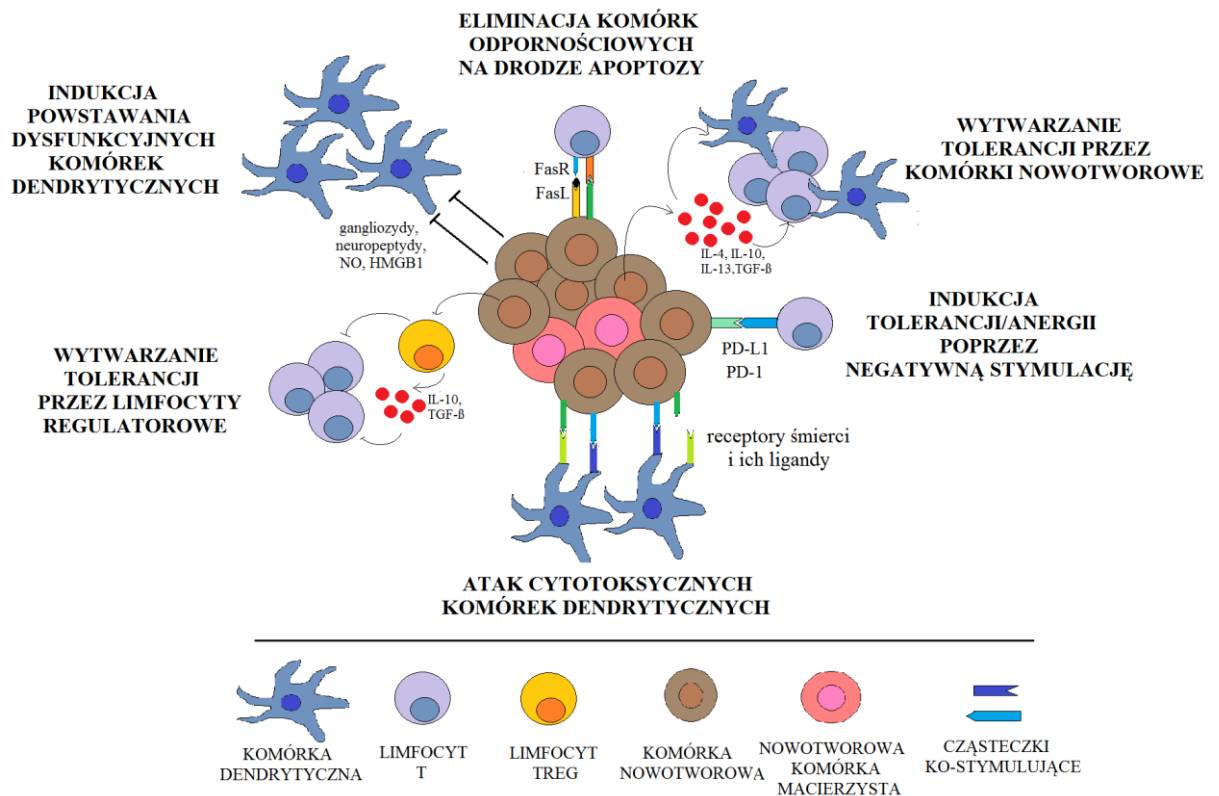
właściwości macierzystych komórek guza (79). Ponadto PD-L1 łączy się ze swoim receptorem na powierzchni limfocytów T i zwiększa ich tolerancję na komórki nowotworu, powodując ich funkcjonalną dezaktywację (ang. *anergy*). Prowadzi to do wytworzenia niewrażliwości komórek nowotworowych na sygnały proapoptotyczne wysyłane przez komórki CD8⁺ lub bezpośrednio przez efekторы ścieżki Fas (80). Wysoka ekspresja liganda FasL, na komórkach zmutowanych wywołuje śmierć limfocytów cytotoksycznych infiltrujących nowotwór, przy czym, te same komórki nowotworowe zwykle obniżają także ekspresję powierzchniowego receptora Fas, eliminując tym samym niebezpieczeństwo indukcji apoptozy (81-83). Z kolei limfocyty T regulatorowe (Treg), działające supresyjnie na inne komórki układu immunologicznego, w warunkach hipoksyjnych wydzielają IL-17, która z kolei wspiera rozwój i utrzymanie NKM, a tym samym przyczynia się do wzrostu guza (84).

Komórki dendrytyczne (KD, ang. *dendritic cell*, *DC*) zostały opisane po raz pierwszy w 1973 roku przez Stenmana i Cohna, którzy scharakteryzowali je, jako komórki prezentujące odmienne cechy niż makrofagi (85). Od tamtych lat KD były szeroko badane, a ich terapeutyczne zastosowanie jest przedmiotem licznych prób klinicznych. KD należą do komórek zdolnych do pobudzania odpowiedzi układu odpornościowego poprzez właściwość prezentacji antygenów limfocytom i/lub wydzielanie związków stymulujących te komórki. W warunkach homeostazy KD występują w swojej tzw. postaci niedojrzałej, ponieważ posiadają niewielką zdolność do wychwytywania antygenów, wykazują niewielką ekspresję cząsteczek ko-stymulujących, wysoką ekspresję wewnątrzkomórkowych białek MHC II oraz niewielką zdolność do sekrecji cytokin (86, 87). Dojrzewanie i aktywacja KD może być wywołana przez wiele czynników, do których zalicza się stany patologiczne, takie jak zakażenia bakteryjne lub wirusowe, uszkodzenia komórek lub tkanek organizmu (87). Pod wpływem tych czynników KD dojrzewają, co przejawia się zwiększeniem zdolności do pochłaniania antygenów, podwyższoną ekspresją białek z klasy MHC I i MHC II, wysokim poziomem cząsteczek odpowiedzialnych za ko-stymulację, obecnością na ich powierzchni receptora chemokin CCR7, a dodatkowo także wzmożonym wytwarzaniem cytokin i migracją do węzłów chłonnych, gdzie wpływają na aktywność limfocytów (88, 89). Aktywowane KD są wyjątkowo wydajnymi komórkami z grupy APC, które wymagają bardzo niewielkiego fragmentu antygeny, aby stymulować limfocyty; z tego

względem uważa się, że mogą być 100-razy bardziej efektywnymi inicjatorami odpowiedzi ze strony limfocytów T niż makrofagi (87).

KD stanowią bardzo zróżnicowaną populację komórek, którą dzieli się pod względem morfologii, pochodzenia, miejsca występowania czy ekspresji określonych markerów powierzchniowych na kilka odrębnych frakcji, szeroko opisanych w literaturze (88, 90). KD pełnią wiele funkcji w organizmie, jednak najlepiej poznane są ich zdolności do modulowania odpowiedzi immunologicznej poprzez regulowanie aktywności limfocytów T i indukcję ich przekształcania w limfocyty pamięci, efektorowe, czy dysfunkcyjne/anergiczne, a w niektórych sytuacjach, także wymuszanie ich śmierci (88, 91). Wydaje się, że kluczowy wpływ na dalsze losy limfocytów ma długość czasu interakcji KD z limfocytami (92). Udowodniono, że niedostateczna stymulacja limfocytów przez KD (a więc sytuacja, kiedy limfocyty T nie są w stanie odróżnić MHC/peptydu lub mają niskie powinowactwo do prezentowanego liganda bądź KD wykazują niewielką ilość cząsteczek ko-stymulujących) może prowadzić do anergii limfocytów, a nawet ich apoptozy (88). Warto zauważyć, że raz wygenerowane anergiczne limfocyty T będą hamowały rozwój odpowiedzi immunologicznej w przyszłości, m.in. poprzez supresję funkcji KD, a więc pośrednio będą odpowiedzialne za wytwarzanie tolerancji (93). Ponadto, istnieje subpopulacja KD wykazujących ekspresję CD56, które to białko jest uznane za cechę charakterystyczną komórek NK. CD56⁺-KD posiadają pewne zdolności cytotoksyczne, dzięki czemu rozpoznają i uszkodzają bądź nawet zabijają napotkane komórki nowotworowe wykorzystując różne ścieżki sygnalizacyjne, w które zaangażowane są receptory śmierci i skojarzone z nimi cząsteczki (67, 94-97). Pomimo, iż KD zwykle są opisywane w kontekście swych interakcji z limfocytami T, to posiadają także zdolność do modulacji funkcji limfocytów B. Wykazano, że KD poprzez wydzielanie odpowiednich czynników stymulujących lub poprzez prezentację natywnych antygenów limfocytom B, indukowały ich proliferację i różnicowanie do komórek plazmatycznych (88, 98, 99). Jak wiadomo, nadzór immunologiczny w nowotworach jest wysoce upośledzony, a różnicowanie i aktywacja wewnątrznowotworowych KD jest zaburzona, przez co generowana odpowiedź immunologiczna jest znacznie osłabiona bądź w ogóle nie występuje. Czynniki takie jak: niedotlenienie, nagromadzenie się adenozyiny, lipidów, podwyższony poziom mleczanu, obniżone pH, ale także wiele związków wydzielanych przez komórki towarzyszące nowotworom (tj. gangliozydy, neuropeptydy, tlenek azotu, HMGB1 i inne)

są odpowiedzialne za generowanie dysfunkcyjnych KD, a w wielu przypadkach mogą nawet doprowadzić do śmierci tych komórek APC (100) (Rycina 2).



Rycina 2. Wybrane interakcje pomiędzy komórkami nowotworowymi, a komórkami układu odpornościowego. Rycina własna stworzona na podstawie danych literaturowych przedstawionych we *Wprowadzeniu*.

W związku z powyższym, można przypuszczać, że specyficzne, ukierunkowane na NKM terapie mogłyby pozwolić na całkowite usunięcie komórek nowotworowych tworzących guz. Przykładem prężnie rozwijającej się dziedziny badań w tym kierunku są szczepionki przeciwnowotworowe, które aktywują limfocyty T i odpowiedź przeciwciał przeciwko TAA. Prezentowały one bardzo dobre rezultaty w badaniach przedklinicznych, jednak ich dość niewielka efektywność w badaniach klinicznych zdaje się być rozczarowująca. Należy podkreślić, że brak jest swoistych szczepionek specyficznych względem antygenów charakterystycznych dla komórek o właściwościach NKM. Należy jednocześnie podkreślić, że swoiste cechy NKM czynią je z natury bardziej, choć nie całkowicie, odporne na atak komórek układu odpornościowego (101), co utrudnia cały proces konstruowania i wdrażania nowych strategii terapeutycznych. W badaniach najczęściej wykorzystywane są załadowane antygenami nowotworowymi najsilniejsze komórki z układu komórek APC, czyli KD uwrażliwione względem

antygenów nowotworowych, które następnie inicjują odpowiedź komórkową i humoralną układu odpornościowego, ale także aktywują limfocyty NK, NKT (102-104). Istnieje kilka technik pozwalających na uwrażliwienie KD względem komórek nowotworowych, np. transfekcja KD z udziałem DNA (105) lub RNA (106) kodującego określony antygen lub białko nowotworowe, fuzja komórek nowotworowych z KD (107), upakowanie określonego, specyficznego dla komórki zmutowanej antygeny do KD (108) lub hodowla KD z komórkami nowotworowymi albo z pochodzącym z tych komórek lizatem (109-111). Badania wzajemnych oddziaływań KD z komórkami nowotworowymi utrzymywanymi w postaci sfer przeprowadzone m.in. na nowotworach piersi (68, 112), prostaty (113) czy płuc (70), potwierdziły, iż hodowla 3D może stanowić efektywną platformę do badań dotyczących immunoterapii nowotworów, w tym terapii ukierunkowanych na pierwotne NKM (114-116).

2. Cele pracy doktorskiej

Prezentowana praca została podzielona na trzy etapy, którym odpowiadają bezpośrednio publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej.

1. Celem **pierwszego etapu badań** było opracowanie warunków stabilnej hodowli sferycznej linii komórek raka jelita grubego HCT116 i HT29 oraz scharakteryzowanie kolonosfer i porównanie ich właściwości z hodowlami adherentnymi tych linii komórkowych. Ponadto, celem tego etapu była analiza populacji komórek o fenotypie CD133⁺. Wyznaczono następujące cele szczegółowe:

- optymalizacja warunków hodowli i stworzenie modelu sferycznego (kolonosfery) komercyjnie dostępnych linii komórkowych RJG, HCT116 oraz HT29, pierwotnie uzyskanych od pacjentów z RJG różniących się pod względem stopnia zaawansowania choroby nowotworowej,
- charakterystyka właściwości uzyskanych kolonosfer i porównanie ich właściwości z cechami komórek w modelu adherentnym linii RJG z uwzględnieniem następujących parametrów: fenotypu, zdolności proliferacyjnych, dystrybucji komórek w cyklu komórkowym, określenia proporcji martwych komórek,
- izolacja magnetyczna komórek nowotworowych z linii HCT116 oraz HT29 o fenotypie CD133⁺, reprezentujących potencjalne NKM, i porównanie cech komórek o fenotypie CD133⁺ oraz CD133⁻.

2. Cel **drugiego etapu badań** stanowiło określenie właściwości komórek dendrytycznych stymulowanych czynnikami pochodzącymi z linii komórkowych RJG, HCT116 i HT29, (tj. lizat, supernatant) oraz oszacowanie, jakie znaczenie miała forma hodowli komórek nowotworowych (hodowle adherentne *versus* sferyczne). Wyznaczono następujące cele szczegółowe:

- izolacja jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (ang. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) z kożuchów leukocytarnych od zdrowych dawców, zawierających monocytarne prekursorzy użyte do hodowli komórek dendrytycznych (KD) i autologicznych leukocytów,

- stymulacja uzyskanych *in vitro* KD przy użyciu materiału pochodzącego z hodowli adherentnych i sferycznych komórek linii HCT116 oraz HT29 (lizat oraz supernatant), a także LPSu, reprezentującego wewnętrzną kontrolę pozytywną,
- wykonanie ko-hodowli KD z autologicznymi limfocytami lub z komórkami nowotworowymi z linii HCT16 i HT29,
- charakterystyka właściwości stymulowanych KD pod względem: morfologii, fenotypu, zdolności do endocytozy, właściwości cytotoksycznych względem komórek nowotworowych oraz określenie proporcji różnych populacji limfocytów po zakończonej ko-hodowli ze stymulowanymi KD.

3. Celem **trzeciego etapu** badań była ocena wpływu 5-fluorouracylu (5-FU), przeciwciała przeciwko receptorowi EGF (anty-EGFR) oraz kwasu acetylosalicylowego (ASA, aspiryna) na właściwości i przeżywalność komórek kolonosfer linii HCT116 oraz HT29, z uwzględnieniem komórek o właściwościach NKM obecnych w hodowli sferycznej.

3. Materiały i metody

W badaniach przeprowadzonych *in vitro* wykorzystywano następujące rodzaje komórek.

1. Linie komórkowe raka jelita grubego. Według klasyfikacji stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu (klasyfikacja TNM) linii HCT116 (*colorectal carcinoma*) przypisywany jest stopień TNMIII, a linii HT29 wyprowadzonej z gruczolakoraka jelita grubego (*colorectal adenocarcinoma*) - TNM II.
2. Komórki dendrytyczne oraz autologiczne względem nich limfocyty wyizolowane z kożuchów leukocytarnych pochodzących od zdrowych anonimowych dawców z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Gdańsku.

Dodatkowo analizowano także nowotworowe komórki macierzyste utrzymane w postaci sferycznej, które były wyizolowane z fragmentów guzów raka jelita grubego pochodzących od 18 pacjentów hospitalizowanych w Katedrze i Klinice Chirurgii Ogólnej, Endokrynologicznej i Transplantacyjnej z Centrum Medycyny Inwazyjnej w Gdańsku. Ta część badań została przeprowadzona w ramach realizacji grantu N N402 684040 dr Magdaleny Szaryńskiej pt. „Analiza wpływu ludzkich komórek dendrytycznych na właściwości biologiczne i molekularne pierwotnych linii raka jelita grubego człowieka w modelu mysim”, w którym byłam wykonawcą od 26.11.2015 r. Grant uzyskał akceptację Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (nr zgody NKEBN/160/2010). Komplet danych klinicznych pacjentów, od których pobrano materiał znajduje się w publikacji „*Cancer stem cells as targets for DC-based immunotherapy of colorectal cancer*”, Scientific Reports, 8:1-22.

W celu oceny właściwości komórek oraz wpływu badanych związków wykorzystano szereg metod, których szczegółowy opis znajduje się w każdej z omawianych poniżej publikacji. Poniżej wybrano najważniejsze z nich.

- Analizy mikroskopowe kolonosfer.
- Barwienie oranżem akrydyny do oceny progresji autofagii.
- Cytometria przepływowa, która posłużyła do oceny:
 - aktywnej kaspazy-3,
 - aktywności endocytotycznej komórek dendrytycznych,
 - dystrybucji komórek w cyklu komórkowym,
 - fenotypu komórek nowotworowych, dendrytycznych i limfocytów,
 - proporcji komórek żywych/martwych,
 - potencjału mitochondrialnego,
 - stężenia cytokin w supernatantach,
 - właściwości proliferacyjnych.
- Hodowla kolonosfer w Matrigelu.
- Izolacja magnetyczna komórek o fenotypie CD133⁺.
- Izolację prekursorów komórek dendrytycznych w oparciu o ich adherentne właściwości.
- Określenie poziomu aktywności cyklooksygenazy 2.

4. Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

W każdej z przedstawionych poniżej publikacji uczestniczyłam w opracowaniu koncepcji badawczej. Ponadto, jestem wykonawcą wszystkich badań w załączonych artykułach, które przeprowadzałam samodzielnie lub we współpracy z innymi współautorami prac.

4.1. Publikacja 1. *In vitro* characterization of spheres derived from colorectal cancer cell lines

Czasopismo: International Journal of Oncology, 2018, 52:599-612

Celem pracy była analiza właściwości komórek utrzymanych w postaci kolonosfer wywodzących się z linii komórkowych HCT116 oraz HT29 i porównanie ich z cechami komórek występujących w modelu adherentnym tych linii. W pracy podjęto też próbę izolacji komórek o fenotypie CD133⁺, który jest przypisywany komórkom o właściwościach NKM, a także przeprowadzono ich charakterystykę w odniesieniu do subpopulacji CD133⁻.

Optymalizacja warunków ekspansji komórek w hodowli pozwoliła na określenie składu pożywki, która promowała tworzenie kolonosfer przez komórki zarówno linii HCT116, jak i HT29. Podstawą było wykorzystanie pożywki bez dodatku surowicy, tylko z wybranymi czynnikami, do których należał EGF i bFGF, zwiększającymi potencjał do podziałów i przeżycia pierwotnych komórek. Kolonosfery tworzone przez komórki obu linii charakteryzowały się innymi parametrami morfometrycznymi. Sfery z linii HCT116 miały większe rozmiary, osiągające ponad 300 µm, oraz gęściej upakowane komórki, a cały agregat miał bardziej regularny kontur. Z kolei kolonosfery z linii HT29 posiadały około 200 µm średnicy i cechowały się bardziej nieregularnym kształtem.

Analiza fenotypu wykazała, że komórki o fenotypie NKM, określonym w oparciu o najczęściej wykorzystywane w literaturze markery (tj. CD133, CD29, CD44, EpCAM, Bmi-1, Lgr-5), występowały zarówno w modelu sferycznym jak i adherentnym. Jednak w zależności od wykorzystanego markera, odsetek ten był zmienny i wskazywał, iż to postać 2D posiada wyższą proporcję komórek o ekspresji białek markerowych dedykowanych NKM. Hodowle adherentne charakteryzowały się praktycznie 100% odsetkiem komórek CD133⁺, podczas gdy kolonosfery z utworzone z komórek linii

HCT116 i HT29 miały odpowiednio po około 70% i 45% komórek o tym fenotypie. Należy jednak pamiętać o kontrowersjach dotyczących użyteczności stosowania wybranych markerów komórkowych do detekcji bądź charakterystyki NKM, podkreślając, że brak jest białek jednoznacznie mogących określić tę populację. Jest to związane z pochodzeniem komórek, typem, a nawet podtypem nowotworu oraz szeregiem mutacji wpływających na ich fenotyp.

Analiza żywotności wykorzystująca barwnik 7-AAD, pozwoliła na oszacowanie znacznego odsetka martwych komórek w hodowlach 3D osiągającego 70% populacji, który nie został zaobserwowany w modelu adherentnym. Barwienie komórek z wykorzystaniem aneksyny V i jodku propidyny pozwoliło stwierdzić, że około 90% spośród nich to komórki apoptotyczne, a pozostała frakcja jest utworzona z komórek nekrotycznych. Jest to cecha charakterystyczna sferycznych agregatów komórkowych odzwierciedlających architekturę guzów *in vivo*, w których najgłębiej umiejscowione komórki są uznane za apoptotyczne i/lub nekrotyczne. Dodatkowo, wysoka ilość tych komórek w hodowli sferycznej wiązała się z zastosowaniem pożywki wspierającej utrzymanie komórek niezróżnicowanych, prymitywnych, a komórki proliferujące i różnicujące się ulegały śmierci komórkowej z braku odpowiednich czynników wzrostowych bądź na drodze *anoikis*.

Pomimo tak wysokiej populacji komórek 7-AAD⁺ w hodowlach sferycznych, obserwowano utrzymujący się na stałym poziomie odsetek komórek żywych. Analiza właściwości proliferacyjnych, bazująca na zliczaniu żywych komórek podczas każdego pasażu oraz wykorzystująca barwnik CFSE (który wnika do komórek i wiąże się z wewnątrzkomórkowymi aminami emitując fluorescencję proporcjonalną do ilości zakumulowanego barwnika, tzn. im komórka rzadziej się dzieli, tym więcej CFSE występuje w jej wnętrzu posiada), pozwoliła wykazać, że w obrębie hodowli komórek sferycznych znajdują się komórki o wysokim tempie podziałów rekompensujących straty wywołane czynnikami wspomnianymi powyżej. Jednocześnie, model sferyczny cechuje się niższym tempem proliferacji w porównaniu do hodowli adherentnej. Wykorzystując dane uzyskane z analizy potencjału proliferacyjnego (opartej na barwieniu CFSE), stwierdzono także, iż w kolonosferach mniejszy odsetek komórek ulega podziałom komórkowym w porównaniu do komórek hodowanych w formie 2D, w których to prawie 100% i 75% populacji komórek podzieliło się odpowiednio w linii HCT116 i HT29. Wniosek ten był w zgodzie z wynikami dotyczącymi dystrybucji komórek w cyklu

komórkowym, gdzie przedstawiono, że model 3D posiada ponad 60% komórek zlokalizowanych w fazie G1/G0, która to odpowiada komórkom wyciszonym/uśpionym, do których, zgodnie z literaturą, zalicza się NKM.

Wykorzystując technikę izolacji magnetycznej dokonano separacji komórek w oparciu o ekspresję białka CD133 na ich powierzchni, uzyskując frakcję CD133⁺, która zgodnie z danymi literaturowymi, reprezentuje subpopulację komórek o cechach NKM, oraz frakcję CD133⁻. Wyizolowane subpopulacje były następnie utrzymywane w pożywce bezsurowiczej. Po siedmiu dniach hodowli zaobserwowano, że zarówno frakcja pozytywna, jak i negatywna, pod względem białka CD133 wytwarzała sfery w tych warunkach, jednakże znacznie różniły się one wielkością (około 232 μm vs. 97 μm , odpowiednio dla HCT116-CD133⁺ i HCT116-CD133⁻ oraz 235 μm vs. 83 μm , odpowiednio dla HT29-CD133⁺ i HT29-CD133⁻). Populacje CD133⁻ z obydwu linii komórkowych formowały sfery, które miały znamienne mniejsze rozmiary w porównaniu do rodzicielskich kolonosfer.

Analiza fenotypowa ujawniła, że komórki frakcji CD133⁺ wykazywały jednocześnie ekspresję białek CD29 i CD44 w około 80% i 60% odpowiednio dla linii HCT116 i HT29, przy czym dla CD133⁻ odsetek tych komórek wynosił po 20%. Z kolei, populacja CD133⁻ została określona, jako CD44⁻CD29⁺. Co ciekawe, nie zaobserwowano różnic w ilości komórek EpCAM⁺, który był na wysokim, prawie 100% poziomie, w obydwu frakcjach. Porównując kolejne cechy uzyskanych subpopulacji, bazując na barwieniu z wykorzystaniem CFSE, odnotowano wyższe tempo proliferacji komórek frakcji CD133⁺, jednocześnie analiza odsetka komórek, które uległy podziałom ujawniła pewne różnice. Mianowicie, komórki linii HCT116 posiadały większy odsetek dzielących się komórek we frakcji CD133⁻, natomiast w obrębie komórek linii HT29 – we frakcji CD133⁺. Z kolei, dystrybucja komórek w cyklu ujawniła brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy frakcjami pozytywnymi oraz negatywnymi pod względem obecności białka CD133 wywodzącymi się z jednej linii komórkowej.

Aby określić sferogenność (zdolność do odtworzenia kolonosfer) komórki CD133⁺ i CD133⁻ zostały wysiane w różnych stężeniach na płytce, od 10 do $2,5 \cdot 10^3$ komórek/dołek hodowlany z pożywką bezsurowiczą. Subpopulacje CD133⁺ bardzo wydajnie odtworzyły sfery w ciągu siedmiu dni inkubacji, zwiększając znacznie ilość komórek znajdujących się w analizowanym dołku, natomiast frakcje CD133⁻ wytworzyły raczej niewielkich rozmiarów skupiska komórek, przypominających

lużno upakowane agregaty, w których zaobserwowano niższy przyrost ilości komórek. Uzyskane dane potwierdzają wyniki odnoszące się do tempa proliferacji komórek. Hodowla komórek w Matrigelu, która częściowo odpowiada strukturze macierzy zewnątrzkomórkowej, z którą oddziaływają komórki *in vivo*, pozwoliła na określenie zdolności do degradacji macierzy i ekspansji komórek obu frakcji z obydwu linii. Eksperyment potwierdził zdolności migracyjne komórek z obydwu frakcji pochodzących z linii HCT116, co było prawdopodobnie powiązane z większym stopniem agresywności nowotworu sklasyfikowanego jako TNMIII.

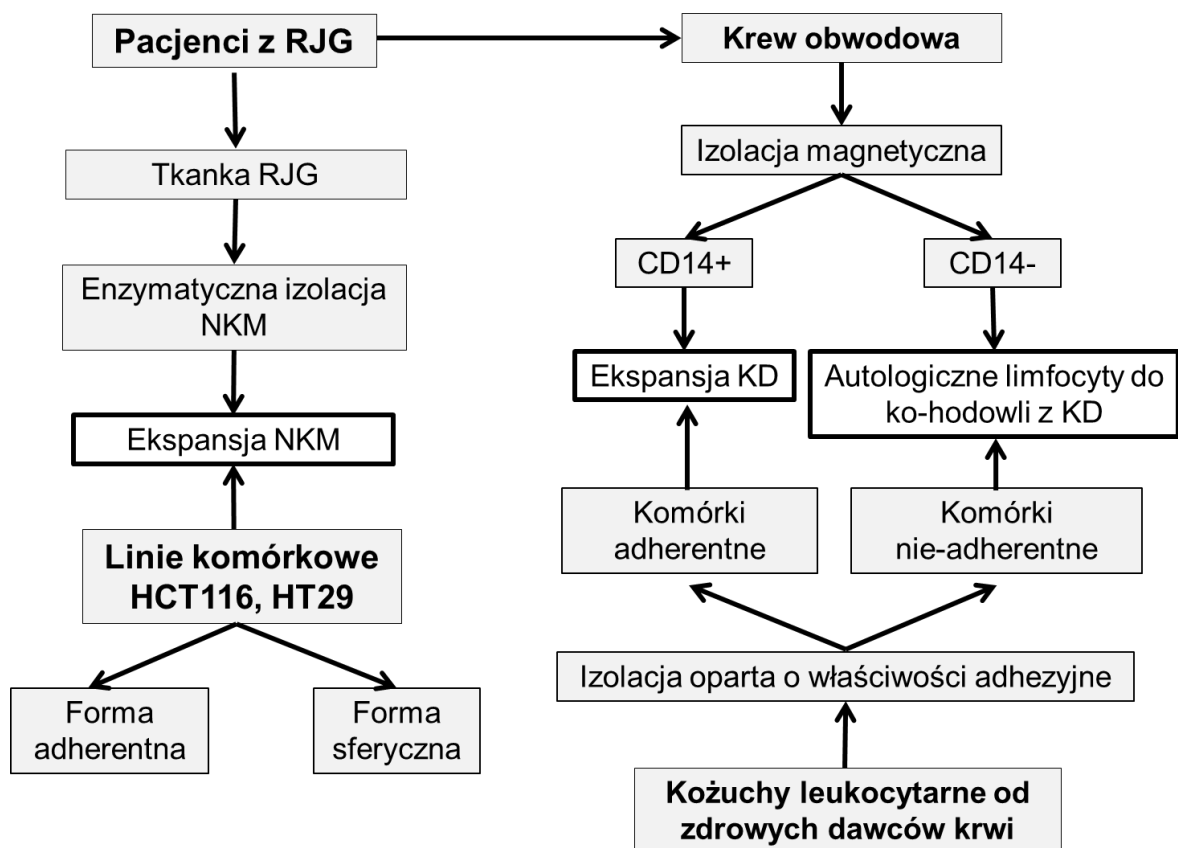
Podsumowując, wydaje się, że hodowla sferyczna lepiej odzwierciedla warunki wzrostu guza *in vivo*, w porównaniu do modelu adherentnego. Przeprowadzone badania wykazujące heterogenność populacji komórkowych w obrębie kolonosfer, w których komórki o cechach NKM nie dominowały w 100%, zdają się tylko potwierdzać to założenie. Hodowle sferyczne stanowią bardziej wiarygodny model badawczy, w którym występują komórki proliferujące, jak i te o bardziej wyciszonych cechach, a ponadto komórki martwe/nekrotyczne, także obserwowane w warunkach naturalnych, a sama forma 3D naśladuje architekturę wzrastających guzów litych, czego nie obserwuje się w hodowlach adherentnych.

Z kolei izolacja magnetyczna komórek o fenotypie CD133⁺ udowodniła, że komórki te posiadają zdecydowanie większy potencjał sferogeny oraz zdolność proliferacyjną niezbędną do odtworzenia kolonosfer w porównaniu do frakcji komórek CD133⁻. Natomiast wykorzystanie tylko jednego białka do separacji komórkowej celem pozyskania populacji komórek o cechach NKM wydaje się nie dość wiarygodna, gdyż zaobserwowano, iż komórki CD133⁻ także posiadają pewne właściwości, które mogłyby zostać przypisane NKM. Należy także podkreślić, że kolonosfery pochodzące z wykorzystanych linii komórkowych przejawiały niekiedy rozbieżne cechy, co najprawdopodobniej jest związane z różnicami w agresywności i stopniu zróżnicowania komórek występujących w obrębie linii, które są przypisane innym stopniom w klasyfikacji TNM.

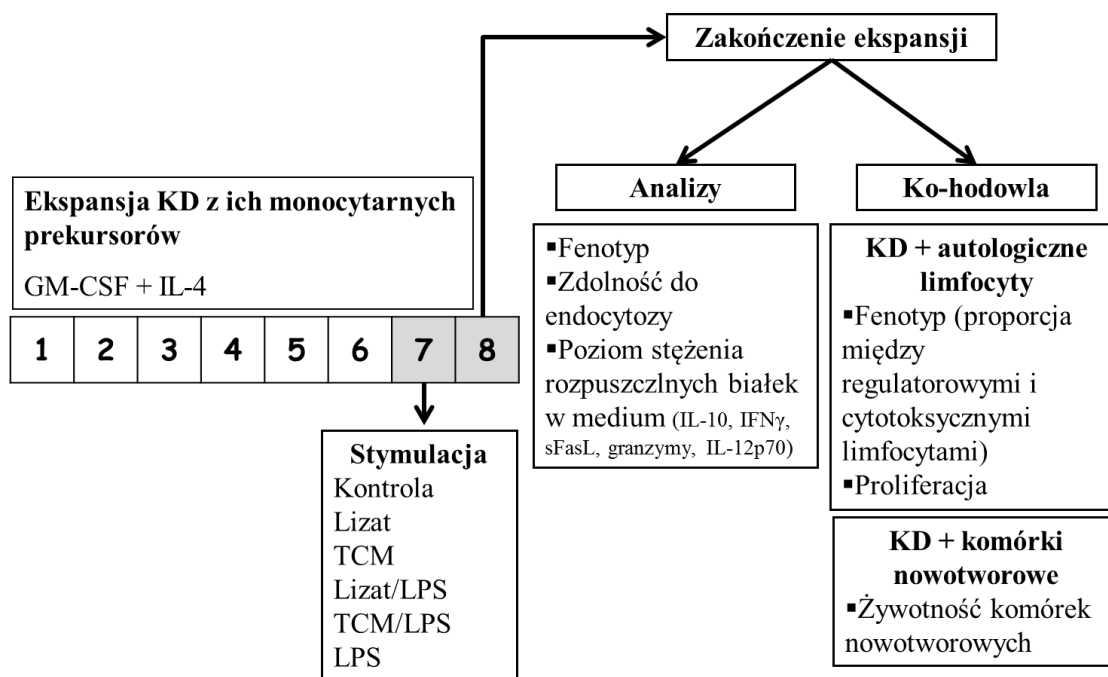
4.2. Publikacja 2. *Cancer stem cells as targets for DC-based immunotherapy of colorectal cancer*

Czasopismo: Scientific Reports, 2018, 8:1-22.

Celem pracy było określenie potencjalnej przydatności komórek dendrytycznych (KD) modyfikowanych *in vitro* w terapii przeciwnowotworowej. Dodatkowo porównano wpływ warunków hodowli komórek linii RJG na właściwości KD po zakończonej procedurze stymulacji przy użyciu komórkowych lizatów lub supernatantów z hodowli komórek nowotworowych (ang. *tumor conditioned medium, TCM*), natomiast LPS ze ściany bakterii *E. coli* stanowił wewnętrzną kontrolę pozytywną. Aby w pełni wyjaśnić złożoność prezentowanej pracy, poniżej załączono dwa schematy wyjaśniające procedury wykorzystane do jej realizacji (Rycina 3 i Rycina 4).



Rycina 3. Schemat obrazujący ogólną procedurę postępowania wykorzystaną w niniejszym artykule.



Rycina 4. Schemat przedstawiający metodologię wykorzystaną w omawianym artykule.

Komórki dendrytyczne, które otrzymano w wyniku różnicowania ich monocytarnych prekursorów z kożuchów leukocytarnych pobranych od zdrowych dawców były stymulowane materiałem pochodzącym z dwóch badanych linii komórkowych, HCT116 oraz HT29 hodowanych w postaci sferycznej oraz adherentnej.

Po 24-godzinnym traktowaniu KD materiałem z linii RJG, prezentowały one zmienioną morfologię i znacznie wydłużone wypustki w porównaniu do komórek niestymulowanych. Jednoczesna inkubacja z TCM i LPSem (TCM/LPS) powodowała najbardziej widoczne dojrzewanie KD, które osiągały nawet do 700 μm długości. Wszystkie stymulatory istotnie wpływały na zwiększenie rozmiarów badanych komórek immunokompetentnych. Jedynie KD inkubowane z samym TCM tylko nieznacznie zwiększyły swoje rozmiary.

Analiza ekspresji białek określających dojrzewanie i aktywność funkcjonalną KD została przeprowadzona w oparciu o najczęściej wykorzystywane w tym celu markery, tj. CD11c, HLA-DR oraz CD80 i CD83. Podsumowując uzyskane wyniki dotyczące fenotypu można stwierdzić, że czynniki stymulujące KD, które były pobrane z adherentnych komórek linii RJG, w większym stopniu wpływały na aktywację i dojrzewanie komórek niż odpowiadający mu materiał z hodowli sferycznej. Co więcej,

zastosowanie stymulacji mieszanych z dwoma ko-stymulantami (lizat/LPS lub TCM/LPS) wpłynęło bardziej znamienne na zwiększenie odsetka dojrzałych i zaktywowanych KD w porównaniu do pojedynczych stymulacji (lizat, TCM). Ponadto, materiał pobrany z hodowli 2D indukował zmniejszenie frakcji KD zdolnych do indukcji apoptozy poprzez ekspresję na swojej powierzchni liganda dla receptora Fas, FasL (komórki FasL⁺). Warto podkreślić, że inkubacja KD z lizatem lub TCM z hodowli sferycznych linii komórkowych RJG wywołała taki sam efekt.

Kolejny etap prac polegał na oszacowaniu wpływu zmodyfikowanego materiałem nowotworowym KD na właściwości autologicznych limfocytów. W tym celu prowadzone były ko-hodowle dwóch wcześniej wspomnianych populacji komórkowych. Przeprowadzona analiza fenotypowa limfocytów po ko-hodowli wykazała brak różnic w liczbie limfocytów T regulatorowych, określonych za pomocą antygenów CD4 oraz CD25 w odniesieniu do początkowej liczby tych limfocytów. Co więcej, KD traktowane przy użyciu mieszanin lizat/LPS i TCM/LPS także nie wywierały wpływu na zmiany w obrębie subpopulacji limfocytów Treg. Jedynie stymulacja KD przy użyciu LPS wpłynęła istotnie na zwiększenie odsetka komórek CD4⁺CD25⁺.

Analizując fenotyp limfocytów w oparciu o białka CD3 i CD56, przypisywanych limfocytom NKT, zaobserwowano, iż ich liczba ulega nieznacznemu spadkowi po zastosowaniu KD stymulowanych materiałem z hodowli adherentnych linii komórkowych RJG, przy czym wartość ta była istotna statystycznie jedynie w przypadku stymulatorów uzyskanych z linii HT29. Co ciekawe, TCM uzyskany ze sferycznych modeli jedynie nieznacznie modulował liczbę limfocytów CD3⁺CD56⁺, jednak w połączeniu z LPS znacząco podwyższał odsetek tych limfocytów. Porównując obydwie badane linie RJG zauważono, iż KD stymulowane związkami pochodzącymi z linii komórkowej HT29, zarówno w formie 2D jak i 3D, najwydatniej modulowały właściwości NKT.

Analizie poddano także zdolność stymulowanych KD do modulowania właściwości proliferacyjnych autologicznych limfocytów. KD po traktowaniu lizatem komórkowym wywodzącym się z kolonosfer linii HCT116 i HT29, wydawały się najefektywniej wzmacniać podziały komórkowe limfocytów, przy czym zarówno lizat jak i TCM z kolonosfer obydwu linii RJG, w połączeniu z LPSem, wywołały słabsze efekty w porównaniu do komórek traktowanych pojedynczymi czynnikami stymulującymi.

Natomiast materiał pochodzący z adherentnych komórek z linii HT29 obniżał zdolność stymulowanych KD do indukcji proliferacji limfocytów.

Następny etap analiz skupiony był na określeniu zdolności KD do endocytozy obcych antygenów, gdyż jak powszechnie wiadomo, dojrzałe KD cechuje właściwość prezentacji antygenów innym komórkom układu odpornościowego. Zaobserwowano, iż zdolność do endocytozy KD była zależna od linii komórkowej i sposobu utrzymywania jej hodowli (forma adherentna lub sferyczna). Najefektywniejsza endocytoza była obserwowana, gdy KD inkubowano z materiałem z adherentnej linii komórkowej HCT116, a szczególnie z lizat/LPS i TCM/LPS. W przypadku tych stymulatorów pobranych z kolonosfer komórek linii HCT116, także odnotowano wzrost właściwości endocytarnych KD, jednak nie osiągały one tak znamiennych wartości jak z przypadku ich analogów z adherentnych odpowiedników. Co ciekawe, linia komórkowa HT29 prezentowała odmienny wpływ na zdolności endocytotyczne KD. Zaobserwowano, iż wszystkie zastosowane opcje stymulacji pochodzące z formy sferycznej tej linii nasilały endocytozę KD, przy czym ich adherentne analogi powodowały niewielkie osłabienie tej cechy u stymulowanych KD względem niedojrzałych KD stanowiących kontrolę. Zaobserwowano silną ujemną korelację pomiędzy ekspresją białka CD44 na powierzchni komórek nowotworowych linii HT29, z których pobrano lizat i TCM do stymulacji, a obniżeniem aktywności endocytotycznej KD.

Aby zweryfikować, czy zastosowane warunki modyfikacji KD mają wpływ na wykształcenie populacji cytotoksycznych KD, przeprowadzono ko-hodowle KD z komórkami linii HCT116 oraz HT29 utrzymywanymi w formie 2D oraz 3D. Wzrost odsetka martwych komórek nowotworowych, określonych jako CD133⁺7-AAD⁺, odnotowano w przypadku ko-inkubacji komórek kolonosfer obu linii RJG z KD stymulowanymi materiałem z odpowiadających im hodowli sferycznych. Zaobserwowano silną dodatnią korelację pomiędzy fenotypem stymulowanych materiałem z komórek z modelu sferycznego KD, a ich właściwościami cytotoksycznymi. Natomiast ko-hodowla zmodyfikowanych KD z nowotworowymi komórkami adherentnymi nie wpływała istotnie na odsetek martwych komórek w hodowli, i była na poziomie odpowiadającym cytotoksyczności wywołanej inkubacją komórek nowotworowych z niestymulowanymi KD, tak więc nie wpływała na potencjał cytotoksyczny KD.

Supernatant z hodowli stymulowanych KD był badany pod względem stężenia wybranych białek wydzielanych przez KD, które są specyficzne dla bardziej ukierunkowanych frakcji KD. Analiza stężeń granzymów, IFN γ , IL-10, IL-12p70 oraz FasL, ujawniła, że KD wykazywały największy potencjał sekrecyjny po traktowaniu lizatem lub TCM z linii HT29 niezależnie od formy, a stymulacja łącznie z LPS wzmacniała ten efekt. Dla przykładu, określenie stężenia granzymów w pożywce hodowlanej, uznanych za związki wydzielane przez cytotoksyczne KD, wykazała ich wysokie stężenie (około 230 razy wyższą względem KD stanowiących kontrolę) w supernatancie z hodowli stymulowanych KD. Z kolei sferyczne odpowiedniki linii RJG wykazywały bardzo zróżnicowany wpływ na właściwości sekrecyjne KD po stymulacji. W ich przypadku często dopiero po zastosowaniu dwóch czynników jednocześnie pojawiały się statystycznie znamienne wzrosty stężeń białek rozpuszczalnych, szczególnie widać to na przykładzie IFN γ i IL-10.

Podsumowując uzyskane w pracy wyniki, wydaje się, że wykorzystanie modeli sferycznych linii komórkowych RJG do modyfikacji właściwości KD, lepiej oddaje efekt uzyskiwany z wykorzystaniem KD, które endocytowały cząsteczki pochodzące z tkanki guza pobranej bezpośrednio od pacjentów z RJG, w porównaniu do materiału wywodzącego się z modelu adherentnego. Obserwacje te wskazują też na to, że protokół modyfikacji powinien zostać ściślej zoptymalizowany, dzięki czemu KD byłyby bardziej efektywne funkcjonalnie. Zauważono, że występowanie określonych konfiguracji markerów dla komórek o cechach NKM znacząco wpływa na dojrzewanie i aktywację KD po stymulacji lizatem lub supernatantem z hodowli komórek nowotworowych linii RJG. Dodatkowo, ten efekt stymulujący został wzmocniony przez zastosowanie LPS, którego obecność wykazano *in vivo* w niszy dla NKM w RJG. Obecność cząsteczek powierzchniowych CD29 i CD44 wywierała odmienny wpływ na właściwości KD. Wydaje się ponadto, że komórki CD133⁺ osłabiały funkcje KD, gdyż im więcej tych komórek występowało w próbce materiału zastosowanego do stymulacji KD, tym mniejszy odsetek zaktywowanych KD odnotowano po inkubacji. Poniższa praca pozwoliła również określić, iż komórki z hodowli sferycznej bardziej przypominały komórki uzyskane od pacjentów z RJG w kontekście zdolności modyfikacji właściwości KD *in vitro*.

4.3. Publikacja 3. *Effects of 5-FU and anti-EGFR antibody in combination with ASA on the spherical culture system of HCT116 and HT29 colorectal cancer cell lines*

Czasopismo: International Journal of Oncology, data publikacji online: 23 maja 2019,
DOI: 10.3892/ijo.2019.4809

W pracy podjęta została próba określenia wpływu 5-fluorouracylu (5-FU), aspiryny (ASA) oraz przeciwciała skierowanego przeciwko receptorowi EGFR (anty-EGFR) na właściwości komórek występujących w kolonosferach wywodzących się z dwóch linii komórkowych RJG, HCT116 i HT29. Hodowle sferyczne były traktowane pojedynczymi związkami lub ich kombinacjami, tj. 5-FU+ASA, anty-EGFR+ASA oraz anty-EGFR+5-FU. W pracy analizowano także komórki o właściwościach NKM i ewentualny wpływ zastosowanych związków na ich aktywność.

Do badań wybrano w oparciu o dane literaturowe oraz przeprowadzone doświadczenia wstępne następujące stężenia badanych związków: 50 μ M 5-FU, 1,5 mM ASA oraz 20 μ g/ml anty-EGFR. Badane związki istotnie redukowały rozmiary traktowanych kolonosfer, zarówno z linii HCT116, jak i HT29, po 72 godzinach inkubacji, przy czym rozległość obserwowanych była zależna od linii komórkowej oraz rodzaju użytego związku.

W pierwszej z przytaczanych tu publikacji "*In vitro characterization of spheres derived from colorectal cancer cell lines*" w hodowlach adherentnych linii komórkowych RJG opisano wyższy odsetek komórek z ekspresją białek CD133, CD29, CD44, w porównaniu z odpowiadającymi im kolonosferami. Z tego względu w relacjonowanych doświadczeniach porównano zdolności sferogenne komórek linii RJG, zarówno hodowli 2D jak i 3D, po inkubacji z 5-FU, ASA i anty-EGFR, a następnie umieszczeniu ich w pożywce bezsurowiczej. Komórki adherentne po inkubacji nie były w stanie stworzyć agregatów komórkowych, niezależnie od typu linii komórkowej. Należy jednak zauważyć, że niewielkich rozmiarów konglomeraty komórkowe wytworzyły się po traktowaniu ASA, a także w mniejszym stopniu po anty-EGFR i anty-EGFR+5-FU. Z kolei komórki traktowanych hodowli sferycznych wykazywały zdecydowanie wyższy potencjał do odtworzenia sfer. Odbudowa agregatu komórkowego przez komórki po inkubacji z 5-FU i ASA była znacznie zahamowana, natomiast komórki traktowane samą ASA lub anty-EGFR wydawały się być dość efektywnie odtwarzać sfery.

Następnie określono wpływ zastosowanych związków i ich kombinacji na frakcję komórek o fenotypie NKM (CD133, CD44, CD29). Odnotowano spadek subpopulacji komórek CD133⁺ w sferach z linii HCT116, za wyjątkiem prób traktowanych 5-FU oraz 5-FU razem z anty-EGFR. Kombinacja anty-EGFR i ASA obniżyła odsetek komórek NKM w kolonosferach do 25%, przy równoczesnym wzroście frakcji komórek CD29⁺CD44⁺CD133⁻. Hodowla sferyczna wzbogacona o komórki CD133⁺ z linii komórkowej HT29 została istotnie statystycznie zredukowana tylko w przypadku ko-stymulacji 5-FU+ASA, natomiast żaden z zastosowanych związków nie wpłynął istotnie na procent komórek CD29⁺CD44⁺CD133⁻.

Ścieżka sygnalizacyjna zapoczątkowana przez receptor i ligand Fas jest obecnie intensywnie badana ze względu na to, że zaobserwowano jej właściwości promujące progresję nowotworową, a dodatkowo – utrzymujące homeostazę i agresywność NKM. Z tego względu weryfikacja wpływu wybranych związków na populacje komórek nowotworowych FasL⁺ oraz FasR⁺ stała się kolejnym celem poniższego projektu. Procent komórek wykazujących ekspresję FasL w kolonosferach linii HCT116 był znamienne niższy tylko w przypadku stymulacji ASA, natomiast dla linii HT29 największy spadek odnotowano po traktowaniu 5-FU razem z ASA. Nie wystąpiły natomiast żadne istotne zmiany proporcji komórek HCT116-FasR⁺ po zakończeniu inkubacji ze związkami. Z kolei, kolonosfery z komórek linii HT29 inkubowane z anty-EGFR i jego połączeniami z 5-FU i ASA, obniżyły do około 2% ilość HT29-FasR⁺. Zauważono dużą różnicę pomiędzy odsetkiem komórek FasR⁺ w kontrolnych (nie traktowanych) kolonosferach pochodzących z różnych linii komórkowych RJG: wynosił on około 40% dla linii HCT116 i tylko 5% dla linii HT29.

Badane związki indukowały śmierć komórek, którą określono cytometrycznie poprzez inkubację komórek z barwnikiem 7-AAD. Największą proporcję martwych komórek w kolonosferach linii HCT116 zaobserwowano po ko-stymulacji z 5-FU+ASA, anty-EGFR+ASA i anty-EGFR+5-FU. Analiza potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej wykazała, że każdy z użytych związków wywołał wzrost odsetka komórek ze zdepolaryzowaną błoną ($\Delta\psi_m$). Określenie poziomu aktywnej formy kaspazy-3, która jest uznana za kaspazę wykonawczą w procesie apoptozy, ujawniło tendencje do obniżenia jej ekspresji w komórkach traktowanych. Najbardziej widoczne było to dla komórek inkubowanych z anty-EGFR w połączeniu z ASA lub 5-FU. Jest to ciekawe, ze względu na fakt, że barwienie aneksyną V i jodkiem propidyny wykazało,

że właśnie kolonosfery z komórek linii HCT116 traktowane tymi samymi kombinacjami związków wywołały istotny przyrost komórek apoptotycznych.

Badania wpływu 5-FU, ASA i anty-EGFR na kolonosfery linii HT29 wykazały istotne różnice w porównaniu do hodowli sferycznych linii HCT116. Kolonosfery linii HT29 wykazały największy wzrost proporcji martwych komórek po zastosowaniu dwóch związków jednocześnie, tj. 5-FU+ASA, anty-EGFR+ASA i anty-EGFR+5-FU. Wykorzystane opcje stymulacji wpłynęły jedynie nieznacznie na populację komórek ze zdepolaryzowaną błoną mitochondrialną ($\Delta\psi_m$). Podobnie jak w przypadku linii HCT116, ujawniono, że komórki traktowane, za wyjątkiem inkubacji z 5-FU, wykazują tendencję do zmniejszania proporcji komórek z aktywną formą kaspazy wykonawczej, a najniższy jej odsetek odnotowano w przypadku stymulacji wykorzystujących anty-EGFR samodzielnie bądź w połączeniu z ASA lub 5-FU. Pomimo to, kolonosfery komórek HT29 traktowanych anty-EGFR i jego połączeniami z ASA i 5-FU cechował istotny wzrost komórek apoptotycznych połączony ze spadkiem frakcji nekrotycznej w swoich hodowlach po zastosowaniu wybranych czynników o aktywności przeciwnowotworowej.

Badanie zdolności proliferacyjnych komórek kolonosfer po inkubacji z badanymi związkami przy wykorzystaniu barwnika CFSE wykazało znaczne różnice pomiędzy obydwoma liniami komórkowymi RJG. Kolonosfery z linii HCT116 wykazywały wyższe tempo proliferacji po każdej ze stymulacji, choć najwyższe wartości zostały uzyskane dla stymulacji, z użyciem anty-EGFR (samodzielnie lub w połączeniu z innymi związkami). Zaobserwowano także tendencję do wzrostu liczby komórek aktywnie ulegających podziałom komórkowym. Wyjątek stanowiły sfery traktowane ASA w połączeniu z 5-FU i anty-EGFR. Aby uzyskać pełniejszy obraz wpływu użytych środków na kolonosfery z linii HCT116 przeanalizowano rozmieszczenie komórek w cyklu komórkowym, ze szczególnym uwzględnieniem komórek będących w fazie G0/G1, które uznaje się za komórki wyciszone, prymitywne, o właściwościach NKM. Zaobserwowany został znamieny spadek frakcji tychże komórek po inkubacji z 5-FU, 5-FU+ASA oraz anty-EGFR+ASA, natomiast pozostałe stymulatory tylko nieznacznie wpłynęły na analizowaną subpopulację.

Przeprowadzone badania wykazały natomiast, że na tempo proliferacji kolonosfery z linii HT29 nie wpłynęły żadne z użytych związków. Przy czym ilość aktywnie dzielących się komórek została zredukowana po inkubacji z anty-EGFR

i anty-EGFR+5-FU. Ponadto frekwencja komórek będących w fazie G0/G1 cyklu komórkowego nie uległa zmianie pod wpływem większości z użytych stymulatorów, z wyjątkiem inkubacji z ASA, która obniżyła ilość komórek wyciszonych w HT29-kolonosferach.

W kolonosferach z linii komórkowej HT29 po traktowaniu ASA i 5-FU+ASA odnotowano pewne zmiany morfologiczne. Przeprowadzono barwienie traktowanych kolonosfer oranżem akrydyny (OA), który przenika do wnętrza komórki, a po zatrzymaniu w kwaśnych pęcherzykach, takich jak autolizosomy, tworzy agregaty, które emitują jasnoczerwoną fluorescencję w sposób zależny od stężenia OA, podczas gdy cytoplazma komórkowa pozostaje zielona. Barwienie OA ujawniło, że kolonosfery z linii komórkowej HT29, ale nie HCT116, po traktowaniu ASA i 5-FU+ASA wykazują wzmożoną autofagię. Analiza poziomu białka LC3-I/II za pomocą techniki Western Blot potwierdziła progresję autofagii w traktowanych ASA i 5-FU+ASA kolonosferach linii HT29.

W ostatnim etapie podjęto próbę określenia wpływu 5-FU, ASA, anty-EGFR i ich połączeń na ekspresję cyklooksygenazy 2 (COX-2). Początkowo określony został poziom komórek COX-2⁺, który dla kolonosfer z linii HCT116 wynosił około 13%, a w linii HT29 – około 16%. Żaden z wykorzystanych związków nie wpłynął na zmianę tych wartości w przypadku żadnej z ww. linii komórkowych. Postanowiono przeprowadzić dodatkowo ocenę aktywności enzymatycznej wspomnianego białka bazując na jego zdolności do przekształcania kwasu arachidonowego w prostaglandyny. Inkubacja kolonosfer linii HCT116 z 5-FU, ASA oraz 5-FU+ASA nieznacznie jedynie zredukowała aktywność COX-2, podczas gdy inkubacja z przeciwciałami anty-EGFR zwiększyła ją aż 12-krotnie. Z kolei komórki sfer z linii HT29 wykazywały podwyższoną aktywność COX-2 po traktowaniu związkami o potencjale przeciwnowotworowym wybranymi do projektu, z wyjątkiem 5-FU. Jednak jedynie inkubacja kolonosfer z anty-EGFR oraz anty-EGFR+ASA wywołała istotne statystycznie zmiany.

Podsumowując, w przedstawionej pracy została przeprowadzona złożona analiza wpływu wybranych związków o potencjale przeciwnowotworowym na wybrane procesy i szlaki sygnałowe w komórkach nowotworowych obecnych w kolonosferach pochodzących z dwóch linii RJG. Jedną z przyczyn odmiennej podatności komórek modelu sferycznego na badane czynniki może być ich pochodzenie, ponieważ komórki

HCT116 reprezentują niezróżnicowaną i agresywną linię komórkową opisaną jako TNMIII, a komórki HT29 są mniej inwazyjne (odpowiadające TNMII).

Uzyskane wyniki potwierdzają, że zastosowanie pojedynczego związku wywołuje mniej znaczące efekty w porównaniu do zmian obserwowanych przy użyciu mieszanin dwóch środków. Ma to bardzo duże znaczenie z punktu widzenia wygenerowania nowych komórek o potencjale NKM. Większa liczba komórek, która przeżyje inkubację z lekiem, może potencjalnie uzyskać właściwości NKM, co jest zjawiskiem bardzo niepożądanym dla postępu terapii. Co więcej, nie w pełni jednoznaczne wyniki dotyczące obu analizowanych linii komórkowych RJG sugerują, że testowane leki mogą wykorzystywać nieco inne mechanizmy, działające na różne procesy i szlaki sygnałowe w komórce. Na pewno jedną z przyczyn jest odmienny status genetyczny oraz stopień zaawansowania RJG obu zastosowanych linii, co może sugerować, że cechy indywidualne pacjentów powinny być brane pod uwagę w czasie planowania terapii. Dodatkowo, wydaje się, że przedstawione wyniki potwierdzają, iż model 3D hodowli komórkowej jest wiarygodnym narzędziem badawczym w badaniu biologii guzów oraz ich wrażliwości na nowe związki przeciwnowotworowe.

5. Podsumowanie i wnioski

Zaprezentowane wyniki prac oryginalnych przedstawiają szeroko zakrojoną charakterystykę hodowli sferycznej dwóch linii RJG, HCT116 oraz HT29, a także jej porównanie do aktualnie powszechnie wykorzystywanego 2D modelu hodowli adherentnych.

Artykuł „*In vitro characterization of spheres derived from colorectal cancer cell lines*” powstał na bazie szczegółowej optymalizacji metodyki prowadzenia doświadczeń na sferach. Praca ta prezentuje bogatą analizę kolonosfer utworzonych z komórek komercyjnie dostępnych linii komórkowych RJG, HCT116 oraz HT29, różniących się pod względem stopnia agresywności komórek nowotworowych. Wyniki te stanowiły punkt wyjścia dla bardziej złożonych doświadczeń z użyciem komórek immunokompetentnych (KD) oraz związków o potencjale przeciwnowotworowym.

Przedstawione wyniki jednoznacznie potwierdzają, że hodowla sferyczna wydaje się lepiej naśladować sposób wzrostu guza *in vivo* w porównaniu do modelu 2D. Biorąc pod uwagę obniżony potencjał proliferacyjny, zmniejszoną frakcję komórek dzielących się, znaczną populację komórek występujących w stanie wyciszenia w kolonosferach, ale także różny dostęp komórek do tlenu i składników odżywczych, model sferyczny, choć nie w pełni, jednak w znacznym stopniu, odzwierciedla charakterystyczną architekturę guzów litych. W związku z powyższym, można pokusić się o stwierdzenie, że hodowla 3D stanowi swego rodzaju most łączący ze sobą warunki hodowli/utrzymania komórek nowotworowych *in vitro* i *in vivo*.

Eksperymenty oparte o izolację magnetyczną komórek RJG o fenotypie CD133⁺, ujawniły, że populacja ta posiada potencjał sferogeny, zdecydowanie wyższy niż komórki frakcji negatywnej. Jednocześnie te badania potwierdziły, że użycie tylko jednego markera (w tym wypadku białka CD133) jest niewystarczające by jednoznacznie wyselekcjonować komórki NKM, ponieważ obie subpopulacje posiadały właściwości, które byłoby można przypisać komórkom najbardziej prymitywnym. Porównując właściwości komórek kolonosfer niepoddanych izolacji magnetycznej z cechami komórek CD133⁺ oraz CD133⁻ można przypuszczać, że te dwie frakcje wzajemnie na siebie pozytywnie oddziałują. Sugeruje to między innymi ocenę wielkości sfer, kiedy

zaobserwowano, że natywne kolonosfery cechowały się większym rozmiarem w porównaniu do agregatów utworzonych po izolacji magnetycznej.

Wyniki uzyskane w ramach realizacji zadań drugiej części pracy badawczej, które zostały przedstawione w pracy „*Cancer stem cells as targets for DC-based immunotherapy of colorectal cancer*”, dotyczą charakterystyki procedury modyfikacji *in vitro* komórek dendrytycznych w kontekście ich potencjalnej przeciwnowotworowej przydatności terapeutycznej.

Wydaje się, że wykorzystanie modelu sferycznego komórek linii RJG, jako źródła czynników stymulujących KD oraz do analizy potencjału przeciwnowotworowego KD miało tu kluczowe znaczenie. Obserwacje zdają się ponownie potwierdzać, że model 3D stanowi lepszą podstawę do badań nad potencjalnymi nowymi strategiami wykorzystującymi komórki odpornościowe w terapii nowotworów. Najlepiej widać to po porównaniu efektów stymulacji komórek KD przy użyciu lizatów i TCM pochodzących z hodowli sferycznej, adherentnej oraz z ekspansji komórek RJG pobranych od pacjentów. Hodowle sferyczne mogłyby stać się sposobem na namnażanie komórek nowotworowych w czasie przygotowywania komórek do immunoterapii, przed podaniem pacjentowi jego własnych autologicznych komórek KD zmodyfikowanych *in vitro*. Wydaje się, że takie podejście mogłoby pozwolić na stworzenie szczepionek specyficznych względem swoistych antygenów każdego pacjenta. Jednakże ze względu na praktycznie nieograniczony dostęp komórek linii komórkowych, oraz łatwość w utrzymaniu hodowli sferycznych kolonosfery stanowią relatywnie tanią alternatywę dla izolacji NKM z tkanek bezpośrednio pochodzących od pacjenta do prowadzenia wstępnych doświadczeń i optymalizacji procedur. Poza tym, wyniki publikacji wyraźnie akcentują potrzebę stworzenia ściśle określonego i zoptymalizowanego protokołu modyfikacji KD *in vitro*, dzięki czemu pacjenci mogliby mieć łatwiejszy dostęp do immunoterapii z użyciem KD. Cenne wydają się zaprezentowane obserwacje dotyczące tego, że LPS znacząco zwiększa potencjał anty-nowotworowy KD po stymulacji z lizatem i TCM, tym bardziej, że jest to przecież cząsteczka powszechnie występująca w niszy jelita grubego.

Kolejna część doświadczeń przeprowadzona na modelu sferycznym i opublikowana w pracy „*Effects of 5-FU and anti-EGFR antibody in combination with ASA on the spherical culture system of HCT116 and HT29 colorectal cancer cell lines*” wykazała, że komórki hodowane w formie 3D stanowią dobry model również do analizy

określonych związków o potencjale terapeutycznym. Eksperymenty przeprowadzone na kolonosferach dawały wiarygodne i powtarzalne wyniki, które niejednokrotnie różniły się od danych uzyskanych z wykorzystaniem modelu adherentnego (w oparciu o wyniki zaprezentowanych tu publikacji i literaturę z tej dziedziny). Na potwierdzenie tej tezy przemawia także różna wrażliwość komórek utrzymanych w formie 2D i 3D na zastosowane terapie, ujawniając większą oporność hodowli sferycznych na ewentualne uszkodzenia spowodowane lekami. Kolonosfery z obu RJG użyte w pracy różniące się stopniem zaawansowania choroby w skali TNM, odpowiadały w odmienny sposób na wykorzystane związki, potwierdzając niejako, że komórki utrzymywane w tej formie stanowią swoiste fenokopie pierwotnego guza. Oryginalne linie komórkowe HCT116 oraz HT29 cechuje odmienny status genetyczny, w tym mutacji dotyczących białka KRAS, które stanowi swoisty prognostyk powodzenia terapii przy użyciu przeciwciał anti-EGFR. Mimo to, wykazano, że niezależnie od statusu genu *KRAS*, pozytywny efekt terapeutyczny może zostać uzyskany poprzez blokadę receptora EGF, szczególnie w połączeniu z innymi lekami. Podsumowując wnioski płynące z wyżej omawianej pracy, można stwierdzić, że najefektywniejsze w przypadku zwalczania komórek nowotworowych są strategie oparte o więcej niż jeden związek terapeutyczny. Takie podejście pozwala jednocześnie modulować kilka komórkowych szlaków sygnalizacyjnych lub metabolicznych.

Reasumując, model sferyczny hodowli komórek RJG dobrze naśladuje m. in. aranżację komórek w guzie litym *in vivo*, ich podatność na uszkodzenia, zdolności podziałowe czy zdolność do modulowania odpowiedzi ze strony układu odpornościowego, dzięki czemu reprezentuje łatwo dostępne, wygodne i wiarygodne narzędzie badawcze, zarówno w dziedzinie biologii nowotworów, włącznie z wpływem, jaki wywierają komórki nowotworowe na elementy układu komórek APC.

SUMMARY IN ENGLISH

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common types of cancers worldwide. Despite the great progress of medical sciences, CRC is still characterized by high mortality. This is most likely due to the occurrence of cancer stem cells (CSCs) which are insensitive to conventional chemotherapy since they have the ability to self-renew. Thus, they are considered to be the cause of the recurrence of cancer. The aim of this study was to characterize spherical models of CRC cell lines and to evaluate their properties after interactions with cells of the immune system, as well as selected anti-cancer drugs.

The spherical cultures of two CRC cell lines, HCT116 and HT29 cell lines mimic better tumor growth *in vivo* compared to their parental cell lines maintained as 2D model in adherent cultures. The spherical model reflects the properties and architecture of a solid tumor through heterogeneous access to oxygen and nutrients, decreased proliferative potential of cells and the presence of a significant fraction of quiescent and dead/necrotic cells.

The performed experiments confirmed that 3D culture is a reliable platform for studies of potential new strategies that use immune cells in cancer therapy. Based on data comparing the effects of dendritic cell (DC) stimulation with lysates and supernatants derived from both spherical and adherent cultures, it can be concluded that cells from the colonospheres interact with DCs in a manner similar to cells isolated from tumor tissue collected from CRC patients. Accordingly, the interaction between cells of the immune system and cancer cells is more reliably reflected in 3D cell cultures than in 2D CRC cultures. Therefore, colonospheres are a relatively inexpensive alternative for the isolation of cancer stem-like cells from cancer tissues directly derived from patients to conduct initial experiments and optimize procedures.

In addition, the usefulness of the CRC spherical cultures was confirmed by the analysis of the properties of potential anticancer drugs. Experiments performed on colonospheres produced reliable and reproducible results, which often differed from the data obtained using the adherent model. Thus, the different sensitivity of cells maintained in 2D and 3D cultures to the tested therapeutics was revealed as well as greater

resistance of cells in spherical cultures to drug-induced damage. The colonospheres were obtained from two CRC cell lines which differ in disease progression defined by TNM scale. Hence, they responded in a different way to the compounds used, confirming that the cells cultured in this form represent specific phenocopies of the primary tumor. Further research confirmed findings of other authors that the most effective methods of combating cancer cells are strategies using more than one therapeutic compound targeting different cancer cell biology aspects. 3D cell cultures allow also for the simultaneous modulation of several cellular signaling or metabolic pathways, as demonstrated in the reported studies.

In conclusion, the performed experiments showed that spherical cultures of CRC cell lines mimic well, among others, the arrangement of cells in the solid tumor *in vivo*, their susceptibility to drug-induced damage, proliferative ability or the capability to modulate the immune response. Thus, 3D cell cultures represent an easily accessible, convenient and reliable research tool in the field of cancer biology and allow studying the interactions between cancer cells and cells of the immune system.

1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most frequently diagnosed type of malignant tumor worldwide (1). It is estimated that since 1980 there has been almost a three-fold increase in the number of CRC new cases in women and a four-fold increase in men in Poland. The 5-year survival amongst patients in the first decade of the 21st century was about 48% in men and 49% in women. CRC occupies fourth position among the most common causes of cancer death, which makes that type of cancer responsible for 12% of cancer deaths (data from the *National Cancer Registry*, onkologia.org.pl).

It is suggested that cells with the characteristics of pluripotent stem cells, so-called cancer stem cells (CSCs) or tumor initiating cells (TICs), are responsible for resistance to chemotherapy and radiotherapy, as well as frequent recurrences of neoplastic diseases. According to CSC-theory, CSC-like cells are characterized by the ability to self-renew and differentiate into any cell type in the tumor. In addition, only these cells have the ability to form and rebuild tumor and to produce its phenocopies after metastasis (2-4). Their occurrence has been confirmed so far in leukemias (5) and solid tumors, including: skin (6), breast (7), pancreas (8), lung (9), prostate (10), brain (13-15), and large intestine (11, 12). Therefore, the CSC-characteristics appear to be necessary to fully understand the pathomechanism of tumorigenesis.

Many techniques are considered to be useful for detection and isolation of CSC-like cells. Most commonly used methods among others are functional tests (e.g. ability of cells to form spheres), molecular tests (e.g. methods based on PCR techniques), cells sorting (using flow cytometry or magnetic isolation) and xenotransplantation to laboratory animals with immunodeficiency (Table 1). Each of these approaches has advantages, although they also have specific limitations, hence the ideal attitude to the analysis of properties of CSC-like cells should be based on the combination of several of the aforementioned techniques. Descriptions of the CSC-like cells' characteristics are usually based on the selected antigens located on the cell surface. CRC-CSC-like cells are commonly characterized with CD133, CD29, CD44, CD166, Bmi-1, Lgr-5, EpCAM (11, 12, 16-22). However, it should be stressed that there is no single perfect marker exclusively dedicated to identification of CRC-CSC-like cells, hence the use of a combination of the above proteins is postulated (23). In addition,

the presence of some markers on the cell surface is dependent and specific to a given patient, as well as the type or even subtype of cancer (24).

Table 1. Comparison of methods commonly used for CSCs-isolation. Table based on the literature data (25-27).

	Method	Advantages	Disadvantages
Cellular sorting based on the expression of CSC-markers	Flow cytometry	Able to isolate and quantify even rare cellular populations, multi-parameter separation	Requires time-consuming optimization, processing may cause bias cell analysis, suitable for cell suspension only, low viability of recovered cells, high cost since it requires a complex equipment
	Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS)	Easy and fast, relatively cheap approach	Mono-parameter separation, limited to cellular suspension only
Functional tests	Colony formation assay	Easy and able to quantitate CSCs	Complex optimization of the culture medium composition
	Soft agar assay	Easy and able to quantitate CSCs, relatively cheap	Low specificity
	Side population Hoechst 33342	Relatively easy and simple method, does not require specific cellular markers	Requires time-consuming optimization and using a complex equipment, low specificity, lack of purity, Hoechst 33342 toxicity
	ALDH assay	Fast, cheap and stable method (stable in comparison to surface markers)	Low specificity
	Therapy resistance assay	Fast and simple, widely acceptable, wide spectrum of death-related genes or available drugs can be used	Low specificity, sensitivity, usually time-consuming
	Hypoxic resistance assay	Simple, requires no specific reagents	Requires time-consuming optimization and using of a complex equipment
	Cellular division	Cheap reagents (PKH-26 and CFSE), time effective	Low specificity
	Transplantation into animals	Widely acceptable	Requires use of specific laboratory animals, quite expensive
Molecular approach	PCR techniques	Flexible, multiplex assay, time and cost effective, high sensitivity	Does not allow accurate CSCs detection in verified sample, lack of morphological analysis of cells
Image-based approach	Immunohistochemistry	Inexpensive, highly specific	Limited to tissue sample, needs well trained specialist in the field of histology
	Immunocytochemistry	Broad-based and powerful method, relatively inexpensive, very specific	Cross-reactivity, problems with background signal, qualitative analysis only

Table 2. CSC-dedicated markers and their roles. Table based on the data obtained from literature (25, 51-53).

CSC-marker's name	Function/significance
ALDH1	Detoxifying enzyme which contributes to cell proliferation and differentiation through activation of retinoid signaling.
BMI-1	Intracellular protein which suppresses transcriptional regulators of cell cycle and lineage differentiation. It maintains stem cell properties and describes long-lived and quiescent cells. It can give rise to LGR-5 ⁺ cells.
CD133/Prominin-1	Transmembrane cell surface protein localized on the surface of intensively proliferating cells. It is believed to affect multicellular functions including stemness, tumorigenesis, and resistance to therapy, metabolism, autophagy, and apoptosis.
CD166/ALCAM	Cell adhesion molecule which is important for the cell survival, motility, cell growth, and metastases. Its malfunctions may contribute to the detachment of tumor cells and therefore to local invasion and tumor progression.
CD24	Small cell surface protein molecule which is involved in cell-cell and cell-matrix interactions. Its expression correlates with greater invasiveness of cancer.
CD29	Integrin β 1, a cell surface receptor that assists in adherence to the extracellular matrix elements. Its deletion is related to hyperplasia and dysplasia in the intestinal epithelium.
CD44	Multifunctional class I transmembrane glycoprotein which acts as a specific receptor for hyaluronic acid and promotes cellular migration. Due to interactions with Wnt signaling pathway, it regulates the stemness of the CSC-like cells.
EpCAM/ESA/CD326	Epithelial cell adhesion molecule expressed in several types of normal/benign and malignant epithelial cells. It is involved in multiple cellular processes such as proliferation and differentiation.
LGR-5	Transmembrane glycoprotein which is a downstream target of the canonical Wnt pathway. It regulates cellular self-renewal and multipotency to differentiate. It describes rather active form of CSC-like cells.
OCT4	Transcription factor which influences embryogenesis, stem cell maintenance, tumor growth and metastasis.
SOX2	Transcription factor which prevents differentiation of progenitor cells. The level of SOX2 correlates positively with metastasis and lymph node infiltration. SOX2 also controls the expression of OCT4.

The culture of cancer cells in the form of a monolayer, i.e. a single layer of cells adhering to the culture vessel (2D model) is commonly used in *in vitro* analyses of neoplastic diseases. However, this model does not reflect the natural conditions of tumor growth *in vivo*. Therefore, the spherical model of cancer cells culturing seemed to gain the recognition in that research field. In spherical culture tumor cells form organized three-dimensional cellular aggregates that float freely in the culture medium. Conventional 2D models are unable to mimic the complexity and heterogeneity of tumors as they grow in a three-dimensional (3D) conformation with a specific organization and architecture *in vivo* that cannot be reproduced in 2D monolayer culture. As a result, numerous signals that modulate various cellular pathways are lost when the cells are artificially maintained in the 2D form. The spherical model mimics the natural distribution of cells in the solid tumor, so that the cells within the specific microregions

of the sphere are characterized by different access to oxygen (e.g. hypoxic conditions) and nutrients, as well as differences in the proliferative capacity, distribution in the cell cycle, susceptibility to DNA damage and the efficiency of repair systems, lactate accumulation (modulating the activity of immune cells) and the expression of various genes (28-31) (Figure 1). Spherical cultures are maintained in the serum-free media containing numerous cytokines which are used in the studies focusing on the undifferentiated cells with a primitive phenotype. Thus, it is postulated that this model might be enriched with CSC-like cells (12, 28, 32-35). This theory is based on the assumption that primitive cancer cells, such as CSC-like cells, are able to create spheres and survive when they do not maintain connections with microenvironmental components, whereas differentiated cells would undergo anoikis, i.e. cell death caused by a lack of intercellular interactions under these conditions (29, 36-38). Moreover, the occurrence of CSC-like cells has been confirmed for commercially available cancer cell lines maintained in the form of spheres in lung, brain, breast, liver, intestine, prostate, pancreatic and bones cancers (35, 39-47). However, the enrichment with the CSC-like fraction is not a mandatory feature of the spheres. There are works demonstrating the lack of differences in the number of CSC-like cells between the adherent and 3D cultures (48-50), whereas some others informed about the greater number of these stem cells in the adherent cultures (50).

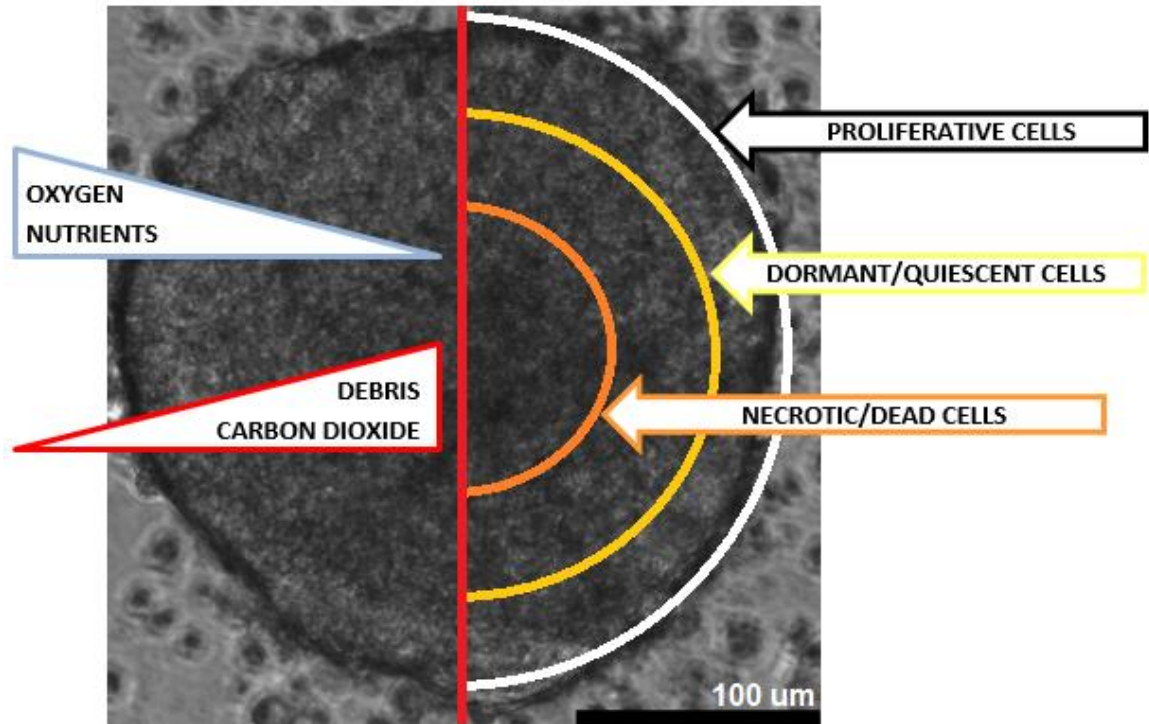


Figure 1. The distribution of cells within the sphere. The Figure was created based on own research results and data obtained from the literature presented in this work.

The search for new therapeutic agents directed against specific cancers seems to be ineffective. Only about 5% of compounds that were active in the *in vitro* tests of preclinical studies were effective enough to complete the phase III of clinical trials and to be registered as drugs. Many potential drugs have been suspended in the clinical trials or withdrawn. In comparison, analogical percentage for the diseases of the vascular system is approximately 20% (54). There are many reasons affecting such a low-efficiency process selecting new compounds with anticancer properties. The crucial factor seems to be the choice of the model used in pre-clinical screening *in vitro* (55). Presumably cytotoxicity tests based on adherent cultures partially contribute to the high failure rate of clinical trials for the new anticancer compounds. Undoubtedly the approach based on the 2D model has many advantages, such as easy process of adherent culture maintaining, simple methods of passage, affordable prices of culture media, etc. Monolayer model of cell culturing contributed significantly not only to the expand of the knowledge in the field of cancer biology but also to initiating of the development of anticancer drugs' experiments in the past. However, this model does not reflect the natural conditions of the solid tumors' progression (55). Hence, it seems that spherical culture would be more suitable in such studies because cells present in the spheres would

have different access to the antitumor compound contained in the medium and they would present different susceptibility to agents-induced death.

There are some reports of the use of acetylsalicylic acid (aspirin, ASA) in the prevention of cancers and reduction of the cancer-related death risk (56), including CRC (57, 58). However, the mechanism of ASA action in the context of neoplasia has not been elucidated, although it is suggested that it may modulate the COX-1 and COX-2 activity (56), or inhibit mTOR and PI3K signaling pathways (59, 60). In addition, it is postulated that ASA may affect CSC-like cells through interfering with NF-Kb (61, 62) or inhibiting PTGS and activating PPARG (63). In turn, compounds from the group of anti-EGF receptor antibodies (anti-EGFR antibodies) are characterized by different efficacy depending on the type of cancer and the occurring type of mutations (64). However, the use of anti-EGFR therapy often results in the acquisition of drug resistance due to the occurrence of secondary mutations caused by the action of compound (65, 66).

Spherical cultures seem to represent a reliable and useful research tool also in the field of immunotherapy, especially when they target CSC-like cells (67-70). Spheres may induce a different immune response in comparison to the adherent models due to a different profile of gene expression and secreted compounds (71, 72). Two varied classes of antigens associated with mutant cells can be distinguished in the neoplastic diseases, i.e. tumor-specific antigens (TSAs), which are encoded by mutant or rearranged genes, and tumor-associated antigens (TAAs), which are encoded by normal, linear-specific genes (73) but their expression is altered by cancer transformation. However, it turns out that cancer cells may avoid the immune response by lowering the level of selected TAAs (74), so it seems very likely that primitive, undifferentiated CSC-like cells selectively regulate the expression of specific TAAs, thus immune cells do not treat them as a threat and allow their further development. The reduced expression of proteins deriving from the MHC I and MHC II classes which are necessary for the activation of T cells, or lowered amount of molecules required to NK cells stimulation (e.g. NKG2D), on the surface of CSC-like cells let them avoid direct contact with lymphocytes and thus confirming the theory (68, 71, 75).

According to literature data, CSC-like cells can secrete IL-4, IL-10, IL-13 and TGF- β , which negatively affect the functions of NK cells, cytotoxic lymphocytes and antigen presenting cells (APCs) (71, 76-78). Additionally, CSC-like cells might be characterized by increased expression of PD-L1, identified as a key component of the

modulation of cellular proliferation, therapeutic resistance, tumor invasion and metastasis, and a regulator of stem-like properties of tumor cells (79). In addition, PD-L1 binds to its receptor on the surface of T lymphocytes and increases their tolerance to tumor cells, causing their functional inactivation (anergy). What is more, it also leads to resistance of cancer cells to the death induced by CD8⁺ cells or Fas (80). The mutant cells display high expression of FasL which may induce death of cytotoxic lymphocytes infiltrating the tumor, where in the same tumor cells usually reduce the expression of FasR because it could initiate the apoptotic pathway (81-83). In turn, T regulatory lymphocytes which usually act suppressive on other cells of the immune system under hypoxic conditions may secrete IL-17, which promotes the development of CSC-like cells, thus contributing to tumor growth (84).

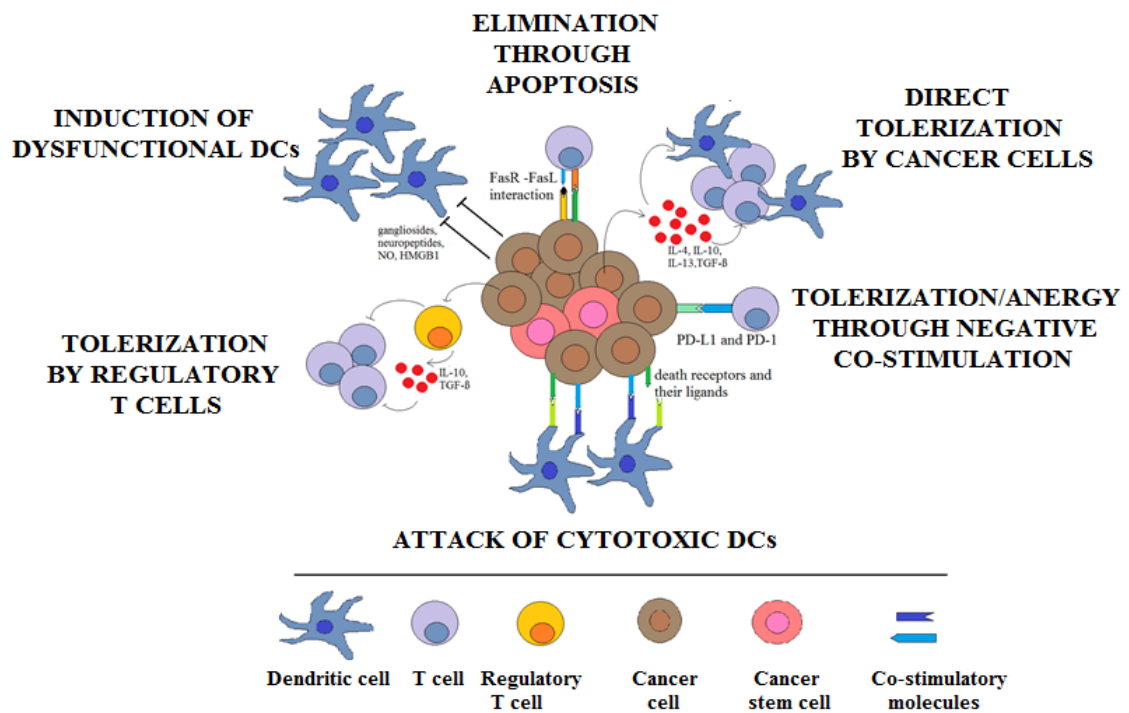


Figure 2. Interactions between cancer cells and immune cells. Figure created on the base of data presented in the literature mentioned in text.

Dendritic cells (DCs) were firstly described in 1973 by Stenman and Cohn, who identified them as cellular population with distinct features than macrophages (85). Since then, DCs gain scientists' interest and were intensively analyzed to this day. DCs belong to antigen presenting cells (APCs) which can activate adaptive immune system's cells due to presentation of invader's antigens and/or secretion of co-stimulatory compounds. In the homeostasis, DCs present in human body are in their immature state. It means that

they are rather weak APCs which have great capacity to capture antigens; however they present reduced expression of co-stimulatory molecules, high expression of intracellular MHC II in late endosome-lysosomal compartments and limited secretion of cytokines (86, 87). Maturation/activation of the DCs may be triggered by many stimuli and pathological conditions such as diseases, viral and microbial pathogens, damaged cells/tissues (87). DCs undergo different physiological changes during maturation, e.g. reduced ability to antigens' engulfment, increased expression of surface MHC I and MHC II molecules, co-stimulatory molecules, C-C chemokine receptors (CCR7), additionally, they also present high ability to produce cytokines and drain lymph nodes to influence the T cells behavior (88, 89). DCs are approximately 100-fold more effective T cells' stimulators in comparison to macrophages since they require scant amount of antigens to do so (87). DCs are rather heterogeneous population of cells and varied DCs subsets were distinguished according to their morphology, origin, localization and expression of specific markers (88, 90). In brief, DCs modulate primary immune responses by affecting the action of T cells and force them to die or to convert into anergic, memory or effector T cells (88, 91). In fact, the length of period of time that T cells and DCs interact with each other triggers changes in the T population (92). Thus, for example naive T cells under intensive stimulation become effector T cells, some of them die, while others may transform themselves into effector memory T cells (however the exact pathway influencing that conversion is not fully described) (88). Interestingly, inadequate stimulation by DCs (when T cells cannot distinguish properly MHC/peptide or they have low affinity for their cognate ligand, or DCs presented only scant amount of the co-stimulatory molecules) may result in anergy or even apoptosis of T cells. Of note, once generated anergic T cells can suppress development of an immune response in the future via the inhibition of DCs functions, thus indirectly induce tolerance mechanism (93). Interestingly, according to some data, CD56⁺-DCs, which are unrelated to NK cells, may also carry cytotoxic functions and recognize and impair/kill cancer cells through many different pathways (broadly described in the literature) (67, 94-97). DCs are usually described in the context of interactions with T cell, but they may also modulate the behavior of B cell. For example, DCs may induce the proliferation and differentiation of B cells into plasma cells by secretion of proper molecules or by presentation of unprocessed antigens to them to switch the Ig-associated isotype (88, 98, 99). Unfortunately, immune surveillance in cancer is highly impaired and usually intratumoral

DCs' differentiation and/or activation are inefficient, thus affecting the immune response. Hypoxia and/or low oxygen level, accumulation of adenosine, elevated level of lactate, decreased pH, abnormal accumulation of lipids and many molecules secreted by cancer-associated cells (gangliosides, neuropeptides, NO, HMGB1 and other molecules) are responsible for generation of dysfunctional DCs or even lead to their death (100) (Figure 2).

In view of the foregoing, it can be assumed that specific CSC-directed therapies could allow complete removal of tumor-forming cells. The anticancer vaccines activating T lymphocytes and antibody-response against TAA represent a rapidly growing field of research. They presented very good results in the preclinical studies but their relatively low effectiveness in clinical trials seems to be disappointing. It should be stressed that there are no specific CSC-antigen vaccines. Based on the analyses of the features of CSC-like cells it can be assumed that these cells may be more insensitive to immune cells' attack, though not completely (101). DCs loaded with cancer antigens which may initiate the cellular and humoral immune response and activate NK, NKT lymphocytes are most frequently used cells in the experiments targeting cancer cells (102-104). There are several techniques to load DCs with cancer cell-deriving material, e.g. DCs transfection involving DNA (105) or RNA (106) encoding a specific antigen or tumor protein; tumor cell fusion with DC (107); packing a cancer cell-specific mutant antigen to DCs (108); co-culture of DCs with whole tumor cells or with lysate derived from these cells (109-111). Studies of mutual interactions of DCs with tumor cells maintained in the form of spheres carried out on breast (68, 112), prostate (113) and lung (70) tumors, confirmed that 3D culture could be an effective platform for research on cancer immunotherapy, including therapies targeting primary CSC-like cells (114-116).

2. Objectives of the research

The presented work has been divided into three stages, which correspond directly to the publications included in the doctoral dissertation.

Objectives of the first step of the project:

- optimization of the culture conditions, creation and maintaining of the spherical cultures (colonospheres) of commercially available colorectal cancer cell lines HCT116 and HT29 which differ from each another in terms of the stage of disease' advance,
- characterization of HCT116- and HT29-derived spheres and comparing their features to the traits of the corresponding cells maintained in the monolayer of the adherent culture of CRC,
- magnetic isolation of cancer cells expressing CD133 molecule on their surface, which is believed to be present on the CSC-like cells, and comparing the features between populations with different pattern of CD133 expression, CD133⁺ and CD133⁻.

In summary, the salient goal of the project's first step was to establish stable and reliable spherical cultures from adherent cultures of the CRC cell lines, and characterize the colonospheres. Afterwards, HCT116- and HT29-spheres' features were compared to their adherent correspondents. Then, analyses of isolated CD133⁺-CSC-like cells compared to CD133⁻-fraction were performed.

Objectives of the second part of the project:

- isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from the leukocyte-platelet coats obtained from anonymous healthy volunteers and then culturing of dendritic cells (DCs) and autologous lymphocytes,
- stimulation of DCs derived from the adherent and spherical cultures of HCT116 and HT29 CRC cell lines with the lysates and tumor-conditioned media (TCM), and with lipopolysaccharide (LPS) that was used as positive control,
- co-culturing of the stimulated-DCs with autologous lymphocytes, and stimulated-DCs with cells from the HCT116 and HT29 CRC cell lines maintained in the form of monolayer and colonospheres,

- characterization of *in vitro* modified DCs' features in terms of their morphology, and phenotype, ability to perform endocytosis and cytotoxicity in respect to CRC-derived cells as well as analyzing the lymphocytes' traits followed co-culture with stimulated DCs.

The second part of the doctoral dissertation was aimed to assess the traits of DCs modified with agents, such as spherical-derived lysate, TCM and bacterial LPS, according to their activation status, phenotype, endocytosis performance and capability to induce proliferation of autologous lymphocytes in comparison to the adherent culture. This stage provided valuable information that could contribute to the use of therapies using antigen-presenting cells.

Objectives of the third part of the project:

- assessment of the impact of 5-fluorouracil (5-FU), aspirin (ASA) and antibody directed against EGFR (anti-EGFR) on the features of HCT116- and HT29-derived colonospheres,
- determination of the activity of 5-FU, ASA and anti-EGFR used in single agent-treatment or in their combinations in treated colonospheres.

The last part of experiments was carried out to determine the influence of the aforementioned drugs on the behavior and survival of HCT116- and HT29-derived colonospheres. Then, the project was aimed to establish the effects of anti-cancer agents in single- or combined-treatment of the CSC-like cells in 3D cultures.

3. Materials

Cellular materials used in the articles included in the doctoral dissertation:

- colorectal cancer cell lines:
 - HCT116 – *colorectal carcinoma*, according to TNM staging system it is assigned as TNMIII,
 - HT29 – *colorectal adenocarcinoma*, classified as TNMII,
- monocyte-derived dendritic cells and autologous lymphocytes isolated from the leukocyte-platelet coats obtained from healthy anonymous volunteers donated for Regional Blood Bank in Gdansk.

In the experiments presented in the article titled “*Cancer stem cells as targets for DC-based immunotherapy of colorectal cancer*”, patient-derived cancer stem cells were used. These cells were isolated from tissues obtained from 18 patients from the Department of General, Endocrine and Transplant Surgery, Medical University of Gdansk, after the resection of colon part affected by cancer. The part of the research in which patient-derived CSC-like cells were used, was performed as a part of the implementation of the project belonging to PhD Magdalena Szaryńska, no. N N402 684040, entitled „Analiza wpływu ludzkich komórek dendrytycznych na właściwości biologiczne i molekularne pierwotnych linii raka jelita grubego człowieka w modelu mysim”. MSc. Agata Olejniczak-Kęder was a major investigator of the work since November 26th, 2015. The project was approved by the Independent Bioethics Commission at the Medical University of Gdansk (no. NKEBN/160/2010). Clinical characteristics of the patients enrolled in the project was showed in the published article.

4. Reviews of the publications included in the doctoral dissertation

MSc. Agata Olejniczak-Kęder was involved in the development of the research concept in each of the publications presented below. In addition, in each of the attached articles she was the conductor of all tests, which she carried out alone or in cooperation with other coauthors of the work.

4.1. Publication 1. *In vitro* characterization of spheres derived from colorectal cancer cell lines

International Journal of Oncology, 2018, 52:599-612

The aim of the study was to analyze the properties of cells maintained in the form of colonospheres derived from the HCT116 and HT29 cell lines and compare their traits with the cell characteristics found in the adherent model of these lines. Additionally, the paper attempted to isolate cells with the CD133⁺ phenotype, which is attributed to CSC-like cells, as well as their characteristics with respect to the CD133⁻ subpopulation.

After optimization of the culture conditions of CRC cells in the suspension, both HCT116 and HT29 cell lines formed colonospheres in the serum-free medium. However, spheres were characterized by different morphometric features. The HCT116-spheres were larger, reaching over 300 μm , and they created more densely-packed cellular aggregates with regular outline. In turn, the HT29-colonospheres had approximately 200 μm in diameter and presented more irregular shape.

The phenotype analysis showed that cells with the CSC-like phenotype, determined by markers most frequently postulated in the literature (i.e. CD133, CD29, CD44, EpCAM, Bmi-1, Lgr-5), occurred in both spherical and adherent models. However, depending on the marker in use, the percentage varied and, surprisingly, indicated that the 2D form contained higher percentage of cells expressing CSC-dedicated marker proteins, e.g. adherent models had practically 100% of cells, whereas colonospheres derived from HCT116 and HT29 CRC cell lines displayed approximately 70% and 45% of CD133⁺ cells, respectively. It should be stressed that usefulness of cell markers is often undermined, since there are no proteins unambiguously dedicated to CSC-like cells. It is probably caused by the fact that cell phenotype is related to cell origin, type or subtype of cancer and the number of phenotype-affecting mutations.

The viability analysis using the 7-AAD dye allowed to estimate the percentage of dead cells in 3D cultures. Both CRC-spheres presented significant fraction of non-viable cells reaching even 70% of the cellular population. Interestingly, adherent model of culturing did not contain such cells or their number did not exceed 2%. Cell staining using annexin V and propidium iodide allowed to determine that about 90% of non-living cells were apoptotic, whereas the remaining fraction was composed of necrotic cells. Presence of dead cells is a characteristic feature of spherical cellular aggregates, thus they reflect the architecture of tumors *in vivo* in which the innermost cells are considered to be apoptotic and/or necrotic. In addition, the significant amount of these cells in the spherical culture was associated with the use of medium that supported maintaining only undifferentiated, primitive cells. Therefore, proliferating or differentiating cells underwent death, probably so-called anoikis, due to the lack of growth factors in serum-free medium or the lack of contact with the matrix (*Introduction contains a description of anoikis*).

Despite the significant fraction of 7-AAD⁺ cells, a constant percentage of living cells was observed in both CRC-spherical cultures. An analysis of proliferative properties was conducted based on counting living cells during each passage and using a CFSE dye that penetrates into cells and binds to their intracellular amines emitting a fluorescence proportional to the number of cells. The test led to the conclusion that the spherical model is characterized by a lower rate of proliferation in comparison to the adherent culture. Using data obtained from the proliferation analysis (based on CFSE staining), it was also found that in the colonospheres smaller percentage of cells underwent cell divisions compared to cells cultured in 2D, in which almost 100% and 75% of the cell population in HCT116 and HT29 CRC lines were divided, respectively. This conclusion was in line with the results from the distribution of cells in the cell cycle, where it was shown that 3D model had more than 60% of cells located in the G1/G0 phase, which is believed to correspond to quiescent/dormant cells, that according to the literature are CSC-like cells.

Using the magnetic isolation technique, cells were separated based on the expression of CD133 protein on their surface. Two populations were yielded: the CD133⁺ fraction that in the literature is classified as a cellular subpopulation with CSC's features, and the non-CSC-like CD133⁻ fraction. Both of the isolated fractions were maintained in the serum-free media. After seven days of culturing, both CD133⁺ and CD133⁻ CRC-

cells produced spheres under these conditions. However, created aggregates differed significantly in size (approximately 232 μm vs. 97 μm for HCT116-CD133⁺ and HCT116-CD133⁻, respectively, and 235 μm vs. 83 μm for HT29-CD133⁺ and HT29-CD133⁻, respectively). CD133⁻-populations deriving from both CRC cell lines formed significantly smaller spheres compared to parental colonospheres (spheres which were not subjected to magnetic isolation).

Phenotypic analysis revealed that CD133⁺ cells also simultaneously expressed CD29 and CD44 and approximately 80% and 60% of cells from the HCT116- and HT29-derived CRC lines were CD44⁺CD29⁺, respectively. On the other hand, in CD133⁻-fractions the percentage of CD44⁺CD29⁺ cells did not exceed 20% of the population. In turn, the CD133⁻-cells were defined as CD44⁻CD29⁺. Interestingly, no differences in the percentage of EpCAM⁺ cells were observed and all analyzed fractions contained approximately 100% of these cells. Comparing other features of the obtained subpopulations, based on staining with CFSE dye, higher rates of proliferation were observed for the CD133⁺ fractions. However, the analysis of the percentage of cells which underwent cellular divisions revealed some divergences, since HCT116-CD133⁻ fraction had greater percentage of dividing cells, whereas in HT29-CRC line elevated division ability was noted in CD133⁺ fraction. In turn, the distribution of cells in the cycle demonstrated no statistically significant differences between the positive and negative CD133 fractions amongst cells deriving from one CRC-line. To determine the spherogenicity (the ability to reproduce the colonospheres), CD133⁺ and CD133⁻ cells were plated at different concentrations reaching from 10 to $2.5 \cdot 10^3$ cells per well on plates designed for culture suspension in serum-free medium. Both CD133⁺ subpopulations efficiently reconstructed spheres after seven days of incubation. Additionally, the number of cells in the wells housing CD133⁺ cells significantly increased. Furthermore, CD133⁻ fractions produced rather small size clusters of cells resembling loosely packed aggregates, in which a definitely lower increase in the cell number was observed. Thus, obtained data confirmed the results relating to the conclusions from the analysis of the rate of cell proliferation. Moreover, cell culture in the Matrigel, which partially corresponds to the matrix interacting with cells *in vivo*, allowed determining the capability of CD133⁺ and CD133⁻ populations from both CRC lines to degrade the matrix and to perform expansion. The experiment also confirmed the migration abilities of cells

from both HCT116-derived fractions, which was probably related to higher degree of tumor aggressiveness since that CRC line was classified as TNMIII.

In conclusion, spherical cultures appear to better reflect the *in vivo* tumor growth in comparison to adherent model. Although based on certain CSC-markers, there has been no enrichment of colonospheres in CSC-like cells, the 3D culture mimics the architecture of growing solid tumors. Thus it is a reliable research model since we confirmed that it contains proliferating, as well as quiescent/dormant cells and dead/necrotic cells, which are observed in tumors in their natural conditions. In turn, magnetic isolation of CD133⁺ cells proved that these cells have greater spherogenic potential and the proliferative capacity, which are necessary to reconstitute the colonospheres in comparison to CD133⁻ fraction. However, it has to be stressed that the use of only one protein for cell separation does not seem to be a reliable approach to obtain CSC-like cells, since even CD133⁻ cells have been observed to have some properties that could be attributed to CSC-like cells. It also should be emphasized that colonospheres derived from the used cell lines exhibited divergent features. It is most likely related to the differences in the aggressiveness and the degree of differentiation of cells within the lines which are assigned to different degrees in the TNM classification.

4.2. Publication 2. *Cancer stem cells as targets for DC-based immunotherapy of colorectal cancer*

Scientific Reports, 2018, 8:1-22

The aim of the study was to determine the impact of the material derived from spherical and adherent models on the biological properties of dendritic cells (DCs) loaded with. Additionally, the goal was to determine which culture influences antigen-presenting cells in a manner similar to CSC-like cells isolated from the tissues obtained from CRC patients.

To fully explain the complexity of the conducted work, the schematic presentations of the performed procedures were shown in the two created Figures, Figure 3 and Figure 4.

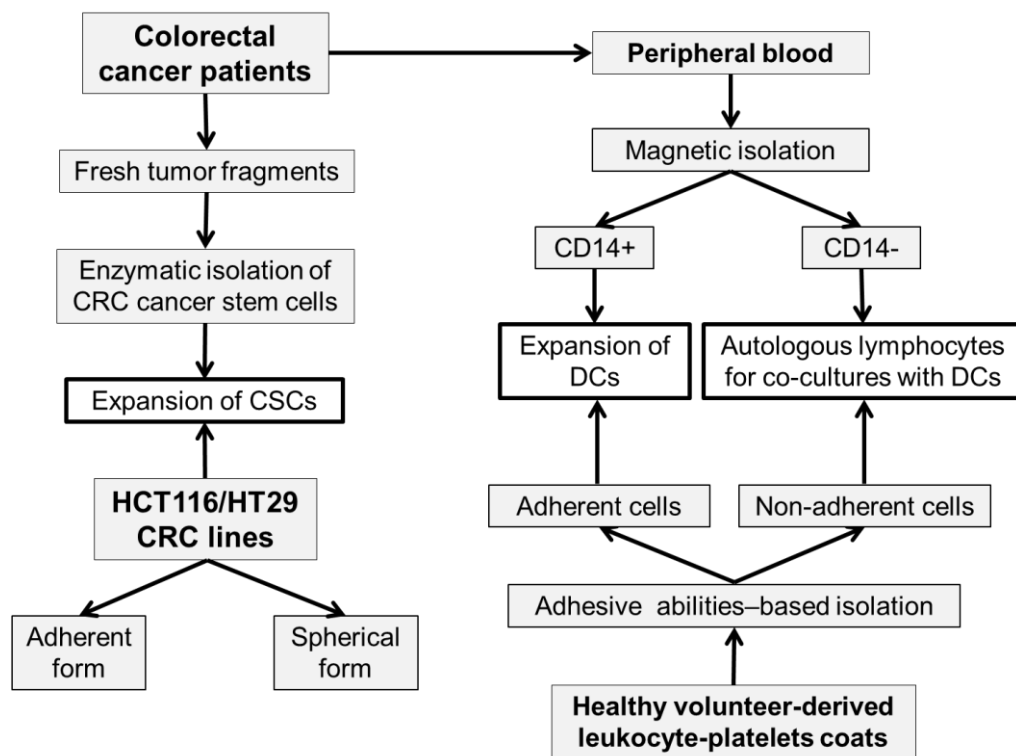


Figure 3. The diagram shows the general procedure used in the presented article.

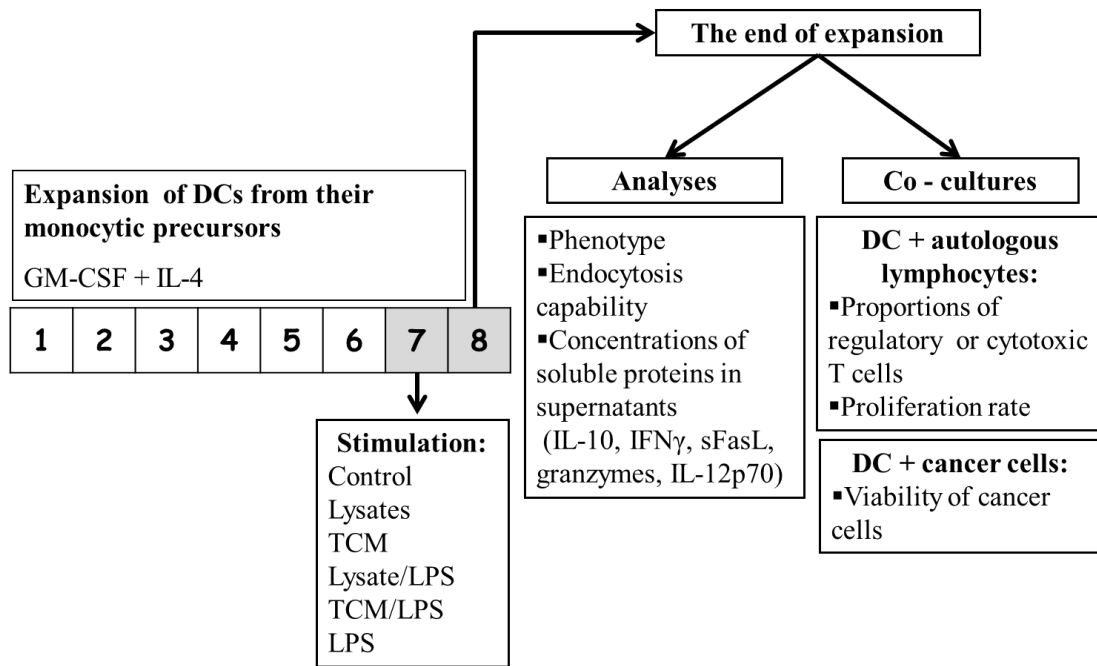


Figure 4. The scheme presents the set of methods used in the work.

DCs isolated from peripheral blood mononuclear cells from leukocyte-platelet coats derived from healthy blood donors were stimulated with material, a lysate from tumor cell proteins and a supernatant from cell cultures (hereinafter referred to as tumor conditioned medium, TCM) originating from two cancer cell lines, HCT116 and HT29 maintained in spherical and adherent form. E. coli bacterial wall-derived LPS was used as an internal positive control.

After 24-hour stimulation with material from CRC cell lines (cell lysate or TCM), DCs showed altered morphology and performed significantly elongated protrusions compared to non-stimulated cells. All of the stimulators and their combinations, except TCM, significantly increased the size of the tested immunocompetent cells. Simultaneous incubation of the DCs with TCM and LPS (TCM/LPS) resulted in the most visible maturation of DCs which lead to cells' elongation reaching up to 700 μm in length.

Analysis of the expression of proteins determining maturation and functional activity of DCs was based on the most commonly used markers, i.e. CD11c, HLA-DR, CD80 and CD83. Summing up the obtained phenotype results, it could be concluded that the material taken from the adherent CRC cell lines appeared to have greater impact on DCs activation and maturation in comparison to the material from corresponding spherical cultures. Moreover, the use of two co-stimulants, e.g. lysate/LPS or TCM/LPS, resulted in elevated percentage of functional DCs compared to single stimulations with

lysate or TCM. In addition, the material collected from the 2D culture induced a decrease in the fraction of DCs capable of inducing apoptosis by expressing on their surface ligand for Fas receptor (FasL⁺-cells). It is worth noting that incubation of DCs with lysate or TCM from colonospheres did not affect the amount of DC- FasL⁺-cells compared to unstimulated DCs.

The next part of project was aimed to estimate the influence of *in vitro* modified DCs on the properties of autologous lymphocytes. For this purpose co-cultures of the two mentioned immune cell populations were maintained. The phenotypic analysis of the amount of regulatory T lymphocytes was based on the CD4 and CD25 antigens expression. It was showed that DCs loaded with the material originated from 2D and 3D models did not impact the amount of CD4⁺CD25⁺-lymphocytes which was on the same level as after co-culture with immature DCs (iDCs). Even DCs treated with mixed material such as lysate/LPS or TCM/LPS also had no effect on the regulatory lymphocyte subpopulations, whereas LPS-stimulated DCs significantly increased the percentage of CD4⁺CD25⁺ cells. Lymphocytes phenotype was studied also according to presence of CD3 and CD56 surface proteins which are assigned to cytotoxic NK lymphocytes. Their number decreased slightly when adherent cell cultures of CRC cell lines were used to affect DCs. However, it was statistically significant only when the lysate and TCM derived from HT29-adherent form were used for DCs modification *in vitro*. Interestingly, sphere-derived TCM slightly modulated the amount of CD3⁺CD56⁺ lymphocytes after co-culture with DCs. Moreover, when LPS was added to such culture, DCs significantly increased the percentage of these lymphocytes. It was noticed that DCs modified with compounds derived from the HT29 cell line, independently on the culture conditions, most effectively modulated cytotoxic properties. The ability of *in vitro* stimulated DCs to modulate proliferative properties of the autologous population of lymphocytes has also been defined. HCT116- and HT29-derived lysate used for DCs stimulation seemed to potentiate the divisions of lymphocytes. Interestingly, DCs modified with lysate or TCM from the HCT116- and HT29-colonospheres more effectively increased lymphocyte proliferation in comparison to lysate/LPS or TCM/LPS from the corresponding spheres. In contrast, the material derived from adherent HT29 cell line reduced the ability of DCs to induce lymphocytes proliferation.

Since mature DCs are characterized by presentation of antigens to other cells of the immune system, the next stage of the analysis was focused on determining the capability

of *in vitro* modified DCs to take up some foreign proteins/molecules. It was observed that DCs' endocytosis was dependent on the cell line and type of culture (adherent or spherical form) used as a source of agent for DCs modification. The most effective endocytosis was noted when DCs were incubated with the adherent HCT116-derived agents, especially when lysate or TCM were combined with LPS. Material originating from HCT116-colonospheres also elevated the endocytotic properties of DCs, but they did not reach such significant values as in the case of their analogs from their adherent counterparts. Interestingly, HT29 cell line showed a different approach of modulating the antigen absorption capacity of DCs. All of the used HT29-colonospheres' stimulations intensified endocytosis of DCs, while their adherent analogs caused a slight weakening of this feature in stimulated DCs in comparison to immature DCs. A strong negative correlation was observed between expression of the CD44 protein on the surface of tumor cells from which lysate and TCM were obtained for DCs' stimulation and their decreased endocytotic activity.

In vitro modified DCs were co-cultured with HCT116 and HT29 cells maintained in adherent and spherical forms to determine the ability of immunocompetent cells to exert cytotoxic effects on mutant cells. The significant increase in the number of CD133⁺7-AAD⁺ cancer cells was observed followed the co-incubation of DCs' loaded with spherical cells-derived agents in comparison to control. A strong positive correlation was observed between the colonospheres-modified DCs' phenotype and their increased ability to induce cytotoxicity targeting cancer cells. In contrast, the co-culture of DCs stimulated with adherent CRC cells did not significantly affect the percentage of dead cells in the cancer in comparison to the cytotoxicity induced by incubation of tumor cells with unstimulated DCs. Thus, adherent culture-derived agents/compounds did not modulate DCs cytotoxic potential.

The supernatant from the DCs culture after their incubation with the CRC-derived material was tested for the concentration of selected proteins. DCs secrete many different molecules which are specific for the more specialized fractions of DCs. Interestingly, the analysis of protein concentrations, i.e. granzymes, IFN γ , IL-10, IL-12p70 or FasL, showed that DCs were the most secretive of the above-mentioned substance when they were stimulated with lysate or TCM from the HT29 line. In addition, the combination of these stimulants with LPS significantly increased the secretory activity of DCs. For example, supernatant from DCs stimulated with adherent HT29-lysate or TCM,

especially when combined with LPS, showed their high concentration of granzymes, which are compounds secreted by cytotoxic DCs, which was about 230 times higher than in control DCs. In turn, CRC cell lines expanded in spherical cultures seemed to be less likely to induce the secretory potential of the aforementioned proteins by DCs, thus the concentrations of specific proteins in the collected supernatants were at the DCs control level.

To sum up, it seems that the use of CRC spherical models to modify DCs properties better reflects the effect obtained using DCs loaded with antigens derived from tissue taken directly from cancer patients in comparison to adherent-stimulated DCs. However, when combined stimulation protocols were used co-treating DCs with lysate or TCM with LPS, DCs perform their functions more efficiently. Hence the crucial step in the DC-based therapies seemed to be the adjustment and optimization of the DCs modification protocol, thanks to which they would be more effective in carried out their duties.

4.3. Publication 3. *Effects of 5-FU and anti-EGFR antibody in combination with ASA on the spherical culture system of HCT116 and HT29 colorectal cancer cell lines*

International Journal of Oncology, published online on: May 23, 2019,

DOI: 10.3892/ijo.2019.4809

The attempt to determine the impact of 5-fluorouracil (5-FU), aspirin (ASA) and antibody directed against EGFR (anti-EGFR) on the HCT116- and HT29-colonospheres' properties was made. Spheres were treated with single agents or their combinations such as 5-FU+ASA, anti-EGFR+ASA and anti-EGFR+5-FU. Additionally, the impact of tested drugs and their combinations on the properties of CSC-like cells was assessed.

In the first step of the experiments the drugs' concentrations used for 72 hours of colonospheres stimulations were chosen based on the data obtained from preliminary tests and literature analysis. In all of the tests 50 μ M of 5-FU, 1.5 mM of ASA and 20 μ g/ml of anti-EGFR were used for stimulations.

All of the drugs used significantly affected the morphology of HCT116- and HT29-colonospheres followed by 72 hours of incubation. Although the extend of the morphological changes, the amount of debris and the general appearance of the spheres were CRC cell line-dependent and drug-dependent, all of the tested agents substantially reduced sizes of treated spheres. In the article "*In vitro characterization of spheres derived from colorectal cancer cell lines*" a very high level of CSC-like markers such as CD133, CD29 and CD44 was noted on the surface of adherent cell lines, which was even greater than in colonospheres which are postulated to be enriched with CSC-like cellular fraction. Thus, the comparison between tumor-initiating capability between adherent and spherical culture systems following the drugs' treatment was assessed. Cells maintained in the form of monolayer and colonospheres were incubated with agents for 72 hours, then they were washed and passaged into serum-free medium which sustains primitive CSC-like cells. Interestingly, pre-treated adherent cells were unable to form colonospheres under CSC-maintained conditions independently of CRC cell line despite the high percentage of cells expressing markers dedicated to undifferentiated cells. The most potent blockers of spheres' formation were combinations of 5-FU+ASA and anti-EGFR+ASA, whereas the formation of small cellular aggregated clusters was most evident for ASA-pre-treated cells in comparison to other incubations. Moreover, the impact of the agents on the 'secondary sphere' formation ability, reflecting their

tumor-initiating capability, showed that spherical cultures represented greater colonospheres-rebuilding potential. The combination of 5-FU+ASA suppressed recreation of spheres most effectively, whereas ASA and anti-EGFR alone or in combinations only slightly affected spheres' reaggregation. To sum up the experiments, the tumor-initiating capability of colonospheres is more effective in comparison to their adherent cultures, suggesting that 3D model is more resistant to the chemotherapy.

In the next stage an assessment of drugs' impact on the colonospheres' phenotype was performed. A significant reduction was noted in the CD133⁺ HCT116-cellular fraction after treatment with agents, except for 5-FU and anti-EGFR+5-FU. Interestingly, anti-EGFR+ASA lowered CD133⁺ subpopulation to 25% of the general population but simultaneously an elevated percentage of CD29⁺CD44⁺-cells was demonstrated. Furthermore, HT29-colonospheres displayed significantly lowered proportion of CD133⁺ cells only after 5-FU+ASA treatment, but none of the used agents influenced the percentage of CD29⁺CD44⁺CD133⁻-cells. In the phenotype analyses Fas ligand and its receptor were examined since their expression was described not only in a typical apoptosis pathway but also in the sustaining primitive CSC-like cells in the cultures. It was observed that FasL⁺ cells were reduced when HCT116- and HT29-colonospheres were treated with ASA and 5-FU+ASA, respectively. None of the agents affected the proportion of FasR⁺-HCT116-cells, whereas anti-EGFR and its combinations with 5-FU or ASA lowered the FasR⁺-HT29-fraction up to 2%. The most outstanding difference was observed in the proportion of FasR⁺ cells as in HCT116-spheres approximately 40% of cells displayed FasR, while in HT29-spheres that expression was shown in 5% of population.

The cells' death following agents' treatment was confirmed in the experiments due to 7-AAD staining. The experiments revealed that co-stimulations such as 5-FU+ASA, anti-EGFR+ASA and anti-EGFR+5-FU efficiently eliminated cells in HCT116-colonospheres. Then, an analysis of the mitochondria-involvement in process of HCT116-cells stimulation showed that all of the drugs increased cellular fraction with depolarized mitochondrial membrane ($\Delta\psi_m$). The initiator of the apoptosis process, active caspase-3, was verified herein. Interestingly, caspase-3 reductive tendency was observed in treated cells, but anti-EGFR alone or in combination with ASA or 5-FU the most effectively reduced the amount of caspase-3⁺-HCT116-cells. Despite the lowered caspase-3 activity in HCT116-colonospheres treated with anti-EGFR, anti-EGFR+ASA

and anti-EGFR+5-FU, the annexin-V/PI staining demonstrated statistically significant increase in the apoptotic cells number in comparison to control. In turn, in HT29-colonospheres contained most remarkable percentage of 7-AAD⁺ non-viable cells following incubations with more than one agent, e.g. 5-FU+ASA, anti-EGFR+ASA and anti-EGFR+5-FU. The cellular fraction with depolarized membrane ($\Delta\psi_m$) was only slightly affected by the tested drugs. As with HCT116-spheres, treated HT29-spheres contained reduced number of cells with active caspase-3, except for 5-FU-treated cells. Although anti-EGFR and its combinations with ASA and 5-FU were the most potent in the caspase expression lowering, these stimulators triggered a significant increase in apoptotic cells and simultaneously reduced the necrotic fraction in the culture.

CFSE dye was used to assess the proliferative abilities of colonospheres following a treatment. Interestingly, HCT116-spheres presented a greater rate of proliferation in comparison to the control. However, a treatment with anti-EGFR and its combinations with ASA and 5-FU seemed to be the most potent inducer of HCT116-colonospheres proliferation. CFSE staining was also used to verify the amount of dividing cells in the 3D cultures. It was concluded that treated spheres displayed elevated dividing tendency, but not for combinations in which ASA was used as a co-stimulator, e.g. 5-FU+ASA and anti-EGFR+ASA. Then, the cell cycle distribution with a particular reference to the G0/G1 phase was analyzed, since that part of the cell cycle is believed to house primitive dormant CSC-like cells. Following 5-FU, 5-FU+ASA and anti-EGFR+ASA treatment in HCT116-spheres a significant reduction of quiescent cells was observed, whereas the other agents did not influence their fraction. Interestingly, when the rate of proliferation of treated HT29-spheres was analyzed, no change of this capability was noted. The division of colonospheres was reduced only after incubation with anti-EGFR and anti-EGFR+5-FU, what suggested intensified dividing activity of remnant cells to preserve the constant rate of proliferation of the general population. Moreover, the cellular fraction occupying G0/G1 phase of the cell cycle was not impacted by most of the drugs with the exception of ASA which lowered the dormant fraction of HT29-cells.

Besides the lack of clearly visible changes in the proliferative capabilities or the number of dormant cells in the HT29-colonospheres after a treatment with ASA and 5-FU+ASA, some morphological features indicating autophagy were observed. To confirm that observation, acridine orange (AO) staining was carried out. AO penetrates into the interior of a cell and when trapped in acidic vesicles, such as

autophagolysosomes, it creates aggregates which emit bright red fluorescence in the AO concentration-dependent manner, while the cellular cytoplasm remains green. AO staining confirmed that ASA- and ASA+5-FU-treated HT29-spheres, but not HCT116-spheres, carried out intense autophagy process. Single replicate of Western Blot analysis of LC3-I/II level confirmed AO results concerning autophagy progression.

In the last stage of the project, the assessment of the drugs impact on the COX-2 was conducted, since this protein is associated with many pathological conditions such as cancer progression. At the beginning, the percentage of the COX-2⁺-cells in HCT116-colonospheres was established to 13%, while in HT29-derived spheres that fraction constituted approximately 16% of the general population. Surprisingly, none of the tested agents affected the proportion of cells expressing COX-2. Regardless the result, enzymatic activity verification was performed. The experiment was based on the capability of COX-2 to convert arachidonic acid into prostaglandins. Surprisingly again, 5-FU, ASA and 5-FU+ASA reduced the COX-2 activity only slightly, whereas anti-EGFR elevated it 12-folds in comparison to control. In turn, the significantly increased activity of COX-2 was noted following HT29-spheres incubation only with anti-EGFR and anti-EGFR+ASA.

To summarize, the presented work tested various drugs used in medicine as well as their influence on selected processes and signaling pathways in cancer cells maintained in the form of colonospheres derived from two CRC cell lines. It can be suspected that one of the reasons for the different susceptibility of 3D models of HCT116 and HT29 cells to the studied agents may be their origin, because HCT116 cells represent an undifferentiated and quite aggressive cell line described as TNMIII, while HT29 cells are less invasive what corresponds to TNMII. The obtained results confirm that the use of a single potentially antineoplastic compound is less effective in eradication of the cancer, since its main mass can be rebuilt by activated and non-affected by the drug CSC-like cells. Moreover, the ambiguous results from CRC cell lines suggest that the tested drugs act on different processes and signaling pathways in the cell, and therefore should be considered in the case of combined therapeutic treatment. Most importantly, it seems that the presented results confirm that the 3D cell culture model is a reliable research tool in studying the tumors' biology and their sensitivity to new anticancer compounds.

5. Summary

The results of the original articles present broad characteristics of the spherical cultures of two CRC cell lines, HCT116 and HT29, and their comparison to the commonly used adherent models.

In the first paper "*In vitro* characterization of spheres derived from colorectal cancer cell lines" the possibility of colonospheres creating from a commercially available HCT116 and HT29 CRC cell lines, which differ according to the degree of neoplastic disease, was presented. This is an important achievement showing that the creation and maintenance of 3D cultures does not have to be problematic after correctly determined process of optimizing culturing conditions. Those experiments demonstrated that colonospheres can be a fairly widely available research tool in the field of cancer biology. In addition, spherical cultures seem to better mimic the natural way of tumor growth, although based on CSC-dedicated markers postulated in the literature, no enrichment with primitive CSC-like cells has been reported in performed experiments. Nevertheless, given the reduced proliferative potential, the lowered fraction of dividing cells, the significant population of cells present in the silencing state, but also the access to oxygen and nutrients found in the culture medium, the spherical model, though not fully, but to a significant extent reflects the characteristic architecture and conditions for the growth of solid tumors which are not observed in adherent model. Hence, one may even be tempted to say that 3D model represents a bridge that links *in vitro* and *in vivo* culturing conditions for growing/maintaining cancer cells. Moreover, some experiments based on magnetic isolation of CRC cells with the CD133⁺ phenotype, revealed that this population has a certain spherogenic potential, which is definitely higher than in the CD133⁻ fraction. However, despite significant differences between these two subpopulations, it cannot be unequivocally stated that only CD133⁺ cells, but not CD133⁻ cells, represent CSC-like cells. Comparing the properties of the colonospheres against magnetic isolation with the features of CD133⁺ and CD133⁻ cells, it can be concluded that these two populations interact mutually positively with each other. So that when comparing the size of the spheres, it can be observed that the native/parental colonospheres were characterized by larger sizes than aggregates created after magnetic isolation.

Summing up the results of the interaction between immunocompetent DCs and HCT116 and HT29 cells in the article "*Cancer stem cells for targets for DC-based immunotherapy of colorectal cancer*", it seems that the use of spherical models of these two CRC lines for *in vitro* modification of DCs properties, better reflect the effect obtained using DCs loaded with patient-derived antigens compared to adherent-derived materials used for DCs stimulation. In addition, colonospheres present a more convenient and easily-available system of delivering tumor antigens to DCs compared to the patient's tissue. It should be stressed that working with patient-derived tissues is more complicated since they require a specified optimized isolation protocol and strictly defined culture conditions. What is more, collection of a reliable number of samples might be time-consuming and not every tissue specimen allow to produce cellular culture thus limiting the access to the material. Of course, CRC-derived spheres are not an ideal solution that would reflect all of the tumor properties, since one hallmark of the cancer is patient-specific set of cancer mutations. However, due to practically unlimited access to the material, i.e. cell lines, and the ease of maintaining spherical cultures of these lines, colonospheres are a relatively cheap alternative to CSC-isolation from tissues directly derived from the patients. In addition, the results of the publication clearly emphasize the requirement to create a strictly defined and optimized DCs modification protocol, thus they could be more functionally effective. The use of more than one DCs' stimulator or an enhancer of their maturation and activity, as shown in studies using a cellular lysate or TCM in combination with LPS, is a reliable approach. In the view of very strong immunosuppression of cancer cells, unmodified DCs are not sufficient promoters of cellular response to tumor.

The extensive research carried out on the spherical model in the work "*Effects of 5-FU and anti-EGFR antibody in combination with ASA on the spherical culture system of HCT116 and HT29 colorectal cancer cell lines*" seem to confirm the reliability of 3D model as an adequate system research. The experiments conducted on the colonospheres gave reliable and reproducible results, which quite often differed from the data obtained using the adherent model according to performed results and literature. This underlines the differences between these two forms of cell culture. Hence it seems to reveal the advantages of colonospheres over monolayer culture which better mimic the natural conditions of solid tumor growth in the suspension culture. This thesis is also supported by the different sensitivity of cells kept in 2D and 3D form to the applied

therapeutics, revealing a greater resistance of spherical cultures to a possible damage caused by drugs. Colonospheres from two cell lines varying in histopathological terms of the intestinal tissue also responded in a different way to used compounds, confirming in a way that the cells maintained in this form represent phenocopies of the primary tumor. The original cell lines, HCT116 and HT29, have a different set of cell mutations, including mutations related to proteins used for prognostic purposes to determine the potential benefits of therapy, including KRAS mutations. Nevertheless, it has been shown that regardless of the status of the *KRAS* gene, a positive therapeutic effect can be obtained by blocking the EGF receptor, particularly in combination with other drugs. Moreover, the most effective therapeutic approach should be based on combinations of different drugs rather than on one drug, because that treatment segments may simultaneously modulate several cellular signaling or metabolic pathways.

In summary, the spherical model of CRC cell culture mimics arrangement of cells in the solid tumor *in vivo*, their susceptibility to damage, the capability to divide or the ability to modulate the immune response, thus representing an easily accessible, convenient and reliable research tool, both in the field of cancer biology and the interaction of tumor cells with the immune system cells, in particular immunocompetent cells.

Wykaz cytowanego piśmiennictwa / *References*

1. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A and Bray F: Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 66: 683-691, 2017.
2. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL and Wahl GM: Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 66: 9339-9344, 2006.
3. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF and Weissman IL: Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414: 105-111, 2001.
4. Szarynska M, Olejniczak A and Kmiec Z: The role of cancer stem cells in pathogenesis of colorectal cancer. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 70: 1469-1482, 2016.
5. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA and Dick JE: A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367: 645-648, 1994.
6. Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, Van Belle PA, Xu X, Elder DE and Herlyn M: A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res* 65: 9328-9337, 2005.
7. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ and Clarke MF: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3983-3988, 2003.
8. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ and Heeschen C: Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 1: 313-323, 2007.
9. Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, Crowley D, Bronson RT and Jacks T: Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 121: 823-835, 2005.
10. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ and Maitland NJ: Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 65: 10946-10951, 2005.
11. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S and Dick JE: A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445: 106-110, 2007.
12. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C and De Maria R: Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445: 111-115, 2007.

13. Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M and Kornblum HI: Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15178-15183, 2003.
14. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J and Dirks PB: Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63: 5821-5828, 2003.
15. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F and Vescovi A: Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 64: 7011-7021, 2004.
16. Vermeulen L, Todaro M, de Sousa Mello F, Sprick MR, Kemper K, Perez Alea M, Richel DJ, Stassi G and Medema JP: Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 13427-13432, 2008.
17. Botchkina IL, Rowehl RA, Rivadeneira DE, Karpeh MS, Jr., Crawford H, Dufour A, Ju J, Wang Y, Leyfman Y and Botchkina GI: Phenotypic subpopulations of metastatic colon cancer stem cells: genomic analysis. *Cancer Genomics Proteomics* 6: 19-29, 2009.
18. Haraguchi N, Ohkuma M, Sakashita H, Matsuzaki S, Tanaka F, Mimori K, Kamohara Y, Inoue H and Mori M: CD133+CD44+ population efficiently enriches colon cancer initiating cells. *Ann Surg Oncol* 15: 2927-2933, 2008.
19. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH, Simeone DM, et al.: Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 10158-10163, 2007.
20. Zhang Z, Bu X, Chen H, Wang Q and Sha W: Bmi-1 promotes the invasion and migration of colon cancer stem cells through the downregulation of E-cadherin. *Int J Mol Med* 38: 1199-1207, 2016.
21. Leng Z, Xia Q, Chen J, Li Y, Xu J, Zhao E, Zheng H, Ai W and Dong J: Lgr5+CD44+EpCAM+ Strictly Defines Cancer Stem Cells in Human Colorectal Cancer. *Cell Physiol Biochem* 46: 860-872, 2018.
22. de Sousa e Melo F, Kurtova AV, Harnoss JM, Kljavin N, Hoeck JD, Hung J, Anderson JE, Storm EE, Modrusan Z, Koeppen H, et al.: A distinct role for Lgr5(+) stem cells in primary and metastatic colon cancer. *Nature* 543: 676-680, 2017.
23. Lange C, Syed T, Valestra PK, Lai E, Groysman A, Jie S, Agarwal M, Navo E, Rotman R, Dresner L, Djordjevic B: In measuring the radiosensitivity of breast cancer

stem cells (CSCs), cell surface biomarkers purporting to designate a CSC “phenotype” are an insufficient definition of CSCs, since >98% are not CSCs. In: 58th Annual Meeting of Radiation Research San Juan, PR, pp 126-127, 2012.

24. Yu Z and Pestell RG: MicroRNAs and Cancer Stem Cells. In: MicroRNAs in Cancer Translational Research. Cho W (ed.) Springer, Netherlands Dordrecht, pp 373-388, 2011.

25. Islam F, Gopalan V, Smith RA and Lam AK: Translational potential of cancer stem cells: A review of the detection of cancer stem cells and their roles in cancer recurrence and cancer treatment. *Exp Cell Res* 335: 135-147, 2015.

26. Abbaszadegan MR, Bagheri V, Razavi MS, Momtazi AA, Sahebkar A and Gholamin M: Isolation, identification, and characterization of cancer stem cells: A review. *J Cell Physiol* 232: 2008-2018, 2017.

27. Duan JJ, Qiu W, Xu SL, Wang B, Ye XZ, Ping YF, Zhang X, Bian XW and Yu SC: Strategies for isolating and enriching cancer stem cells: well begun is half done. *Stem Cells Dev* 22: 2221-2239, 2013.

28. Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W and Kunz-Schughart LA: Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J Biotechnol* 148: 3-15, 2010.

29. Weiswald LB, Richon S, Massonnet G, Guinebretiere JM, Vacher S, Laurendeau I, Cottu P, Marangoni E, Nemati F, Validire P, et al.: A short-term colorectal cancer sphere culture as a relevant tool for human cancer biology investigation. *Br J Cancer* 108: 1720-1731, 2013.

30. Weiswald LB, Bellet D and Dangles-Marie V: Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia* 17: 1-15, 2015.

31. Huang BW and Gao JQ: Application of 3D cultured multicellular spheroid tumor models in tumor-targeted drug delivery system research. *J Control Release* 270: 246-259, 2018.

32. Portillo-Lara R and Alvarez MM: Enrichment of the Cancer Stem Phenotype in Sphere Cultures of Prostate Cancer Cell Lines Occurs through Activation of Developmental Pathways Mediated by the Transcriptional Regulator DeltaNp63alpha. *PLoS One* 10: e0130118, 2015.

33. Cao L, Zhou Y, Zhai B, Liao J, Xu W, Zhang R, Li J, Zhang Y, Chen L, Qian H, et al.: Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines. *BMC Gastroenterol* 11: 71, 2011.

34. Lee SH, Hong JH, Park HK, Park JS, Kim BK, Lee JY, Jeong JY, Yoon GS, Inoue M, Choi GS, et al.: Colorectal cancer-derived tumor spheroids retain the characteristics of original tumors. *Cancer Lett* 367: 34-42, 2015.
35. Stankevicius V, Kunigenas L, Stankunas E, Kuodyte K, Strainiene E, Cicenias J, Samalavicius NE and Suziedelis K: The expression of cancer stem cell markers in human colorectal carcinoma cells in a microenvironment dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 484: 726-733, 2017.
36. Akrap N, Andersson D, Bom E, Gregersson P, Stahlberg A and Landberg G: Identification of Distinct Breast Cancer Stem Cell Populations Based on Single-Cell Analyses of Functionally Enriched Stem and Progenitor Pools. *Stem Cell Reports* 6: 121-136, 2016.
37. De Luca A, Fiorillo M, Peiris-Pages M, Ozsvari B, Smith DL, Sanchez-Alvarez R, Martinez-Outschoorn UE, Cappello AR, Pezzi V, Lisanti MP, et al.: Mitochondrial biogenesis is required for the anchorage-independent survival and propagation of stem-like cancer cells. *Oncotarget* 6: 14777-14795, 2015.
38. Qureshi-Baig K, Ullmann P, Rodriguez F, Frاسquilho S, Nazarov PV, Haan S and Letellier E: What Do We Learn from Spheroid Culture Systems? Insights from Tumorspheres Derived from Primary Colon Cancer Tissue. *PLoS One* 11: e0146052, 2016.
39. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Wicinski J, Cervera N, Finetti P, Hur MH, Diebel ME, Monville F, Dutcher J, et al.: Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res* 69: 1302-1313, 2009.
40. Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Zhou J, Claypool K and Tang DG: Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG2- cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Res* 65: 6207-6219, 2005.
41. Zhang HZ, Lin XG, Hua P, Wang M, Ao X, Xiong LH, Wu C and Guo JJ: The study of the tumor stem cell properties of CD133+CD44+ cells in the human lung adenocarcinoma cell line A549. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 56 Suppl: OL1350-1358, 2010.
42. Yi H, Cho HJ, Cho SM, Jo K, Park JA, Lee SH, Chang BJ, Kim JS and Shin HC: Effect of 5-FU and MTX on the Expression of Drug-resistance Related Cancer Stem Cell

Markers in Non-small Cell Lung Cancer Cells. *Korean J Physiol Pharmacol* 16: 11-16, 2012.

43. Xu Y, Xie Y, Wang X, Chen X, Liu Q, Ying M and Zheng Q: Identification of cancer stem cells from hepatocellular carcinoma cell lines and their related microRNAs. *Oncol Rep* 30: 2056-2062, 2013.

44. Wang L, Huang X, Zheng X, Wang X, Li S, Zhang L, Yang Z and Xia Z: Enrichment of prostate cancer stem-like cells from human prostate cancer cell lines by culture in serum-free medium and chemoradiotherapy. *Int J Biol Sci* 9: 472-479, 2013.

45. Rainusso N, Man TK, Lau CC, Hicks J, Shen JJ, Yu A, Wang LL and Rosen JM: Identification and gene expression profiling of tumor-initiating cells isolated from human osteosarcoma cell lines in an orthotopic mouse model. *Cancer Biol Ther* 12: 278-287, 2011.

46. Olempska M, Eisenach PA, Ammerpohl O, Ungefroren H, Fandrich F and Kalthoff H: Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 6: 92-97, 2007.

47. Zhou J, Wang CY, Liu T, Wu B, Zhou F, Xiong JX, Wu HS, Tao J, Zhao G, Yang M, et al.: Persistence of side population cells with high drug efflux capacity in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 14: 925-930, 2008.

48. Fan X, Ouyang N, Teng H and Yao H: Isolation and characterization of spheroid cells from the HT29 colon cancer cell line. *Int J Colorectal Dis* 26: 1279-1285, 2011.

49. Dittfeld C, Dietrich A, Peickert S, Hering S, Baumann M, Grade M, Ried T and Kunz-Schughart LA: CD133 expression is not selective for tumor-initiating or radioresistant cell populations in the CRC cell line HCT-116. *Radiother Oncol* 94: 375-383, 2010.

50. Calvet CY, Andre FM and Mir LM: The culture of cancer cell lines as tumorspheres does not systematically result in cancer stem cell enrichment. *PLoS One* 9: e89644, 2014.

51. Szarynska M, Olejniczak A, Kobiela J, Spsychalski P and Kmiec Z: Therapeutic strategies against cancer stem cells in human colorectal cancer. *Oncol Lett* 14: 7653-7668, 2017.

52. Hatano Y, Fukuda S, Hisamatsu K, Hirata A, Hara A and Tomita H: Multifaceted Interpretation of Colon Cancer Stem Cells. *Int J Mol Sci* 18, 2017.

53. Munro MJ, Wickremesekera SK, Peng LF, Tan ST and Itinteang T: Cancer stem cells in colorectal cancer: a review. *Journal of Clinical Pathology* 71: 110-116, 2018.

54. Hutchinson L and Kirk R: High drug attrition rates-where are we going wrong? *Nat Rev Clin Oncol* 8: 189-190, 2011.
55. Zanoni M, Piccinini F, Arienti C, Zamagni A, Santi S, Polico R, Bevilacqua A and Tesei A: 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Sci Rep* 6: 19103, 2016.
56. Thorat MA and Cuzick J: Role of aspirin in cancer prevention. *Curr Oncol Rep* 15: 533-540, 2013.
57. Drew DA, Cao Y and Chan AT: Aspirin and colorectal cancer: the promise of precision chemoprevention. *Nat Rev Cancer* 16: 173-186, 2016.
58. Garcia Rodriguez LA, Soriano-Gabarro M, Bromley S, Lanasa A and Cea Soriano L: New use of low-dose aspirin and risk of colorectal cancer by stage at diagnosis: a nested case-control study in UK general practice. *BMC Cancer* 17: 637, 2017.
59. Din FV, Valanciute A, Houde VP, Zibrova D, Green KA, Sakamoto K, Alessi DR and Dunlop MG: Aspirin inhibits mTOR signaling, activates AMP-activated protein kinase, and induces autophagy in colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 142: 1504-1515 e1503, 2012.
60. Kaur J and Sanyal SN: PI3-kinase/Wnt association mediates COX-2/PGE(2) pathway to inhibit apoptosis in early stages of colon carcinogenesis: chemoprevention by diclofenac. *Tumour Biol* 31: 623-631, 2010.
61. Saha S, Mukherjee S, Khan P, Kajal K, Mazumdar M, Manna A, Mukherjee S, De S, Jana D, Sarkar DK, et al.: Aspirin suppresses the acquisition of chemoresistance in breast cancer by disrupting an NFkappaB-IL6 signaling axis responsible for the generation of cancer stem cells. *Cancer Res* 76: 2000-2012, 2016.
62. Kastrati I, Litosh VA, Zhao S, Alvarez M, Thatcher GR and Frasier J: A novel aspirin prodrug inhibits NFkappaB activity and breast cancer stem cell properties. *BMC Cancer* 15: 845, 2015.
63. Moon CM, Kwon JH, Kim JS, Oh SH, Jin Lee K, Park JJ, Pil Hong S, Cheon JH, Kim TI and Kim WH: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs suppress cancer stem cells via inhibiting PTGS2 (cyclooxygenase 2) and NOTCH/HES1 and activating PPARG in colorectal cancer. *Int J Cancer* 134: 519-529, 2014.
64. Miyamoto Y, Suyama K and Baba H: Recent Advances in Targeting the EGFR Signaling Pathway for the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 18, 2017.

65. Van Emburgh BO, Arena S, Siravegna G, Lazzari L, Crisafulli G, Corti G, Mussolin B, Baldi F, Buscarino M, Bartolini A, et al.: Acquired RAS or EGFR mutations and duration of response to EGFR blockade in colorectal cancer. *Nat Commun* 7: 13665, 2016.
66. Zhao B, Wang L, Qiu H, Zhang M, Sun L, Peng P, Yu Q and Yuan X: Mechanisms of resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Oncotarget* 8: 3980-4000, 2017.
67. Bagheri V, Abbaszadegan MR, Memar B, Motie MR, Asadi M, Mahmoudian RA and Gholamin M: Induction of T cell-mediated immune response by dendritic cells pulsed with mRNA of sphere-forming cells isolated from patients with gastric cancer. *Life Sci*, 2019.
68. Wang B, Wang Q, Wang Z, Jiang J, Yu SC, Ping YF, Yang J, Xu SL, Ye XZ, Xu C, et al.: Metastatic consequences of immune escape from NK cell cytotoxicity by human breast cancer stem cells. *Cancer Res* 74: 5746-5757, 2014.
69. Kajihara M, Takakura K, Kanai T, Ito Z, Saito K, Takami S, Shimodaira S, Okamoto M, Ohkusa T and Koido S: Dendritic cell-based cancer immunotherapy for colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 22: 4275-4286, 2016.
70. Xu C, Fillmore CM, Koyama S, Wu H, Zhao Y, Chen Z, Herter-Sprie GS, Akbay EA, Tchaicha JH, Altabef A, et al.: Loss of Lkb1 and Pten leads to lung squamous cell carcinoma with elevated PD-L1 expression. *Cancer Cell* 25: 590-604, 2014.
71. Di Tomaso T, Mazzoleni S, Wang E, Sovena G, Clavenna D, Franzin A, Mortini P, Ferrone S, Doglioni C, Marincola FM, et al.: Immunobiological characterization of cancer stem cells isolated from glioblastoma patients. *Clin Cancer Res* 16: 800-813, 2010.
72. Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, Cammareri P, Vermeulen L, Iovino F, Tripodo C, Russo A, Gulotta G, Medema JP, et al.: Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell* 1: 389-402, 2007.
73. Schatton T and Frank MH: Antitumor immunity and cancer stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 1176: 154-169, 2009.
74. Khong HT, Wang QJ and Rosenberg SA: Identification of multiple antigens recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a single patient: tumor escape by antigen loss and loss of MHC expression. *Journal of Immunotherapy* 27: 184-190, 2004.
75. Talerico R, Todaro M, Di Franco S, Maccalli C, Garofalo C, Sottile R, Palmieri C, Tirinato L, Pangigadde PN, La Rocca R, et al.: Human NK cells selective targeting of

- colon cancer-initiating cells: a role for natural cytotoxicity receptors and MHC class I molecules. *J Immunol* 190: 2381-2390, 2013.
76. Inoda S, Hirohashi Y, Torigoe T, Morita R, Takahashi A, Asanuma H, Nakatsugawa M, Nishizawa S, Tamura Y, Tsuruma T, et al.: Cytotoxic T lymphocytes efficiently recognize human colon cancer stem-like cells. *Am J Pathol* 178: 1805-1813, 2011.
77. Volonte A, Di Tomaso T, Spinelli M, Todaro M, Sanvito F, Albarello L, Bissolati M, Ghirardelli L, Orsenigo E, Ferrone S, et al.: Cancer-initiating cells from colorectal cancer patients escape from T cell-mediated immunosurveillance in vitro through membrane-bound IL-4. *J Immunol* 192: 523-532, 2014.
78. Wu A, Wei J, Kong LY, Wang Y, Priebe W, Qiao W, Sawaya R and Heimberger AB: Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. *Neuro Oncol* 12: 1113-1125, 2010.
79. Dong P, Xiong Y, Yue J, Hanley SJB and Watari H: B7H3 As a Promoter of Metastasis and Promising Therapeutic Target. *Front Oncol* 8: 264, 2018.
80. Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, Tatiparti K, Bhise K, Kashaw SK and Iyer AK: PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Front Pharmacol* 8: 561, 2017.
81. Peter ME, Hadji A, Murmann AE, Brockway S, Putzbach W, Pattanayak A and Ceppi P: The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. *Cell Death Differ* 22: 885-886, 2015.
82. Chen L, Park SM, Tumanov AV, Hau A, Sawada K, Feig C, Turner JR, Fu YX, Romero IL, Lengyel E, et al.: CD95 promotes tumour growth. *Nature* 465: 492-496, 2010.
83. Strasser A, Jost PJ and Nagata S: The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 30: 180-192, 2009.
84. Yang S, Wang B, Guan C, Wu B, Cai C, Wang M, Zhang B, Liu T and Yang P: Foxp3+IL-17+ T cells promote development of cancer-initiating cells in colorectal cancer. *J Leukoc Biol* 89: 85-91, 2011.
85. Steinman RM and Cohn ZA: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137: 1142-1162, 1973.
86. Steinman RM: Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol* 30: 1-22, 2012.

87. Santos PM and Butterfield LH: Dendritic Cell-Based Cancer Vaccines. *J Immunol* 200: 443-449, 2018.
88. Lipscomb MF and Masten BJ: Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* 82: 97-130, 2002.
89. Worbs T, Hammerschmidt SI and Forster R: Dendritic cell migration in health and disease. *Nat Rev Immunol* 17: 30-48, 2017.
90. Collin M and Bigley V: Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology* 154: 3-20, 2018.
91. Reis e Sousa C: Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 6: 476-483, 2006.
92. Lanzavecchia A and Sallusto F: Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 290: 92-97, 2000.
93. Vendetti S, Chai JG, Dyson J, Simpson E, Lombardi G and Lechler R: Anergic T cells inhibit the antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol* 165: 1175-1181, 2000.
94. Roothans D, Smits E, Lion E, Tel J and Anguille S: CD56 marks human dendritic cell subsets with cytotoxic potential. *Oncoimmunology* 2: e23037, 2013.
95. Lakomy D, Janikashvili N, Fraszczak J, Trad M, Audia S, Samson M, Ciudad M, Vinit J, Vergely C, Caillot D, et al.: Cytotoxic dendritic cells generated from cancer patients. *J Immunol* 187: 2775-2782, 2011.
96. Joo HG, Fleming TP, Tanaka Y, Dunn TJ, Linehan DC, Goedegebuure PS and Eberlein TJ: Human dendritic cells induce tumor-specific apoptosis by soluble factors. *Int J Cancer* 102: 20-28, 2002.
97. Ayres FM, Narita M, Takahashi M, Yano T, Liu A, Toba K, Furukawa T and Aizawa Y: Human dendritic cells mediate anti-tumor activity against hematopoietic tumor cells without direct contact and Fas/FasL killing pathway. *Oncol Rep* 11: 1017-1023, 2004.
98. Wykes M, Pombo A, Jenkins C and MacPherson GG: Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response. *J Immunol* 161: 1313-1319, 1998.
99. Dubois B, Massacrier C, Vanbervliet B, Fayette J, Briere F, Banchereau J and Caux C: Critical role of IL-12 in dendritic cell-induced differentiation of naive B lymphocytes. *J Immunol* 161: 2223-2231, 1998.
100. Veglia F and Gabrilovich DI: Dendritic cells in cancer: the role revisited. *Curr Opin Immunol* 45: 43-51, 2017.

- 101.Codd AS, Kanaseki T, Torigo T and Tabi Z: Cancer stem cells as targets for immunotherapy. *Immunology* 153: 304-314, 2018.
- 102.Lim DS, Kim JH, Lee DS, Yoon CH and Bae YS: DC immunotherapy is highly effective for the inhibition of tumor metastasis or recurrence, although it is not efficient for the eradication of established solid tumors. *Cancer Immunol Immunother* 56: 1817-1829, 2007.
- 103.Yu JS, Liu G, Ying H, Yong WH, Black KL and Wheeler CJ: Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T-cells in patients with malignant glioma. *Cancer Res* 64: 4973-4979, 2004.
- 104.Sabado RL and Bhardwaj N: Cancer immunotherapy: dendritic-cell vaccines on the move. *Nature* 519: 300-301, 2015.
- 105.Daftarian P, Kaifer AE, Li W, Blomberg BB, Frasca D, Roth F, Chowdhury R, Berg EA, Fishman JB, Al Sayegh HA, et al.: Peptide-conjugated PAMAM dendrimer as a universal DNA vaccine platform to target antigen-presenting cells. *Cancer Res* 71: 7452-7462, 2011.
- 106.Koido S, Kashiwaba M, Chen D, Gendler S, Kufe D and Gong J: Induction of antitumor immunity by vaccination of dendritic cells transfected with MUC1 RNA. *J Immunol* 165: 5713-5719, 2000.
- 107.Gong J, Chen D, Kashiwaba M and Kufe D: Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Nat Med* 3: 558-561, 1997.
- 108.Butterfield LH, Ribas A, Potter DM and Economou JS: Spontaneous and vaccine induced AFP-specific T cell phenotypes in subjects with AFP-positive hepatocellular cancer. *Cancer Immunol Immunother* 56: 1931-1943, 2007.
- 109.Dashti A, Ebrahimi M, Hadjati J, Memarnejadian A and Moazzeni SM: Dendritic cell based immunotherapy using tumor stem cells mediates potent antitumor immune responses. *Cancer Lett* 374: 175-185, 2016.
- 110.Bauer C, Bauernfeind F, Sterzik A, Orban M, Schnurr M, Lehr HA, Endres S, Eigler A and Dauer M: Dendritic cell-based vaccination combined with gemcitabine increases survival in a murine pancreatic carcinoma model. *Gut* 56: 1275-1282, 2007.
- 111.Mahdian R, Kokhaei P, Najjar HM, Derkow K, Choudhury A and Mellstedt H: Dendritic cells, pulsed with lysate of allogeneic tumor cells, are capable of stimulating MHC-restricted antigen-specific antitumor T cells. *Med Oncol* 23: 273-282, 2006.

- 112.Chandrasekaran S, Marshall JR, Messing JA, Hsu JW and King MR: TRAIL-mediated apoptosis in breast cancer cells cultured as 3D spheroids. *PLoS One* 9: e111487, 2014.
- 113.Jachetti E, Caputo S, Mazzoleni S, Brambillasca CS, Parigi SM, Gioni M, Piras IS, Restuccia U, Calcinotto A, Freschi M, et al.: Tenascin-C Protects Cancer Stem-like Cells from Immune Surveillance by Arresting T-cell Activation. *Cancer Res* 75: 2095-2108, 2015.
- 114.Xu Q, Liu G, Yuan X, Xu M, Wang H, Ji J, Konda B, Black KL and Yu JS: Antigen-specific T-cell response from dendritic cell vaccination using cancer stem-like cell-associated antigens. *Stem Cells* 27: 1734-1740, 2009.
- 115.Pham PV, Le HT, Vu BT, Pham VQ, Le PM, Phan NL, Trinh NV, Nguyen HT, Nguyen ST, Nguyen TL, et al.: Targeting breast cancer stem cells by dendritic cell vaccination in humanized mice with breast tumor: preliminary results. *Onco Targets Ther* 9: 4441-4451, 2016.
- 116.Yin T, Shi P, Gou S, Shen Q and Wang C: Dendritic cells loaded with pancreatic Cancer Stem Cells (CSCs) lysates induce antitumor immune killing effect in vitro. *PLoS One* 9: e114581, 2014.

Publikacje wchodzące w skład dysertacji / *Publications included in PhD dissertation*

1. Agata Olejniczak, Magdalena Szaryńska, Zbigniew Kmieć

“In vitro characterization of spheres derived from colorectal cancer cell lines”

International Journal of Oncology, 2018, 52:599-612

<https://www.spandidos-publications.com/ijo/52/2/599>

2. Magdalena Szaryńska, Agata Olejniczak, Jarosław Kobiela, Dariusz Łaski, Zbigniew Śledziński, Zbigniew Kmieć

“Cancer stem cells as targets for DC-based immunotherapy of colorectal cancer”

Scientific Reports, 2018, 8:1-22

<https://www.nature.com/articles/s41598-018-30525-3>

3. Agata Olejniczak-Kęder, Magdalena Szaryńska, Agata Wrońska, Kamila Siedlecka-Kroplewska, Zbigniew Kmieć

“Effects of 5-FU and anti-EGFR antibody in combination with ASA on the spherical culture system of HCT116 and HT29 colorectal cancer cell lines”

International Journal of Oncology, data publikacji online: 23 maja 2019,

DOI: 10.3892/ijo.2019.4809

<https://www.spandidos-publications.com/ijo/55/1/223>