

**mgr Aleksandra Filipiak-Duliban**

**Modele 3D jako alternatywne metody badań  
lekooporności nowotworów**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. Claudine Kieda

Promotor pomocniczy: dr Klaudia Brodaczewska

Klinika: Laboratorium Onkologii Molekularnej i Terapii Innowacyjnych;  
Wojskowy Instytut Medyczny w Warszawie



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2022 r.

---

**Słowa kluczowe: 3D, czerniak, lekooporność, mikrośrodowisko guza, rak nerki, sferoidy**

**Keywords: 3D, drug resistance, melanoma, RCC, tumor microenvironment, spheroids**

---

Ta praca była finansowana przez:

- Narodowe Centrum Nauki grant nr 2016/23/B/NZ1/03211.
- Wojskowy Instytut Medyczny grant nr 5/8958 (467).
- Wojskowy Instytut Medyczny grant nr 1/9014 (505)
- Program Interdyscyplinarnych Studiów Doktoranckich wykorzystujących sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) w medycynie spersonalizowanej realizowany w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój – POWER; finansowany przez Fundusze Europejskie Wiedza Edukacja Rozwój – Unia Europejska Fundusz Społeczny.



Unia Europejska  
Europejski Fundusz Społeczny



*Składam serdeczne podziękowania:*

*prof. Claudine Kieda za pomoc, cenne uwagi oraz poświęcony mi czas;*

*dr Klaudii Brodaczewskiej za ogromną pomoc i czuwanie nad przebiegiem  
przeprowadzonych badań;*

*Aleksandrze Majewskiej za wsparcie oraz pomoc w przeprowadzonych badaniach;*

*Pracownikom, Doktorantom oraz Studentom pracującym w LOMTI za miłą atmosferę pracy  
oraz pomoc.*

---

**Wykaz publikacji stanowiących prace doktorską:**

Filipiak-Duliban A, Brodaczewska K, Majewska A, Kieda C. Spheroid culture models adequately imitate distinctive features of the renal cancer or melanoma microenvironment. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2022 May 10. doi: 10.1007/s11626-022-00685-8. Epub ahead of print. PMID: 35536385.

Filipiak-Duliban A, Brodaczewska K, Kajdasz A, Kieda C. Spheroid Culture Differentially Affects Cancer Cell Sensitivity to Drugs in Melanoma and RCC Models. *Int J Mol Sci.* 2022 Jan 21;23(3):1166. doi: 10.3390/ijms23031166. PMID: 35163092; PMCID: PMC8835769.

Abou Khouzam R, Brodaczewska K, Filipiak A, Zeinelabdin NA, Buart S, Szczylik C, Kieda C, Chouaib S. Tumor Hypoxia Regulates Immune Escape/Invasion: Influence on Angiogenesis and Potential Impact of Hypoxic Biomarkers on Cancer Therapies. *Front Immunol.* 2021 Jan 20;11:613114. doi: 10.3389/fimmu.2020.613114. PMID: 33552076; PMCID: PMC7854546.

---

## Spis treści

Wykaz skrótów .....	6
Streszczenie .....	7
Abstract.....	8
1. Wstęp .....	9
1.1. Mikrośrodowisko guza.....	10
1.1.1. Elementy niekomórkowe .....	11
1.1.2. Elementy komórkowe.....	12
1.1.3. Hipoksja .....	13
1.2. Progresja nowotworu i rozwój lekooporności.....	14
1.2.1. Inicjacja, promocja i progresja choroby nowotworowej.....	14
1.2.2. Lekooporność – przyczyna niepowodzeń w terapiach antynowotworowych.....	17
1.3. Modele badań nad nowotworami stosowane w biologii.....	20
1.3.1. Standardowe modele badań nowotworów .....	20
1.3.2. Alternatywne modele badań nowotworów .....	21
Założenia i cel pracy.....	21
Kopie opublikowanych prac .....	23
Podsumowanie i wnioski.....	58
Oświadczenia wszystkich współautorów publikacji określające indywidualny wkład (udział merytoryczny i procentowy) każdego z nich w ich powstanie.....	59
Bibliografia .....	65

---

## Wykaz skrótów

2D: hodowle dwuwymiarowe

2DH: hodowle dwuwymiarowe w hipoksji

2DN: hodowle dwuwymiarowe w normoksji

3D: hodowle trójwymiarowe

ALDH: dehydrogenaza aldehydowa (ang. Aldehyde Dehydrogenase)

CAFs: fibroblasty związane z nowotworem (ang. Cancer Associated Fibroblasts)

CSC: komórki macierzyste nowotworu

CYP: cytochrom (ang. Cytochrome)

ECM: macierz zewnątrzkomórkowa (ang. Extracellular Matrix)

EGF: naskórkowy czynnik wzrostu (ang. Epidermal Growth Factor),

EMT: przejście epitelialno mezenchymalne (ang. Epithelial Mesenchymal Transition)

FGF: czynnik wzrostu fibroblastów (ang. Fibroblast Growth Factor)

GST: transferazy glutationu-S (ang. Glutathione-S transferase)

HIF1 $\alpha$ : czynniki indukujący hipoxie 1 alfa (ang. Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$ )

MDR: odporność wielolekowa (ang. Multi Drug Resistance)

Mmp: metaloproteinazy macierzy (ang. Matrix Metalloproteinase)

mTor: szlak ssaczego celu rapamycyny (ang. mammalian Target of Rapamycin Kinase)

PDGF: płytkopochodny czynnik wzrost (ang. Platelet-derived Growth Factor)

pO<sub>2</sub>: ciśnienie parcjalne tlenu (ang. partial pressure of oxygen)

RCC: nowotwór nerki (ang. Renal cell carcinoma)

TGF: czynnik wzrostu nowotworów (ang. Tumor Growth Factor)

TKI: inhibitory kinaz tyrozynowych (ang. Tyrosine Kinase Inhibitors)

TME: mikrośrodowisko nowotowru (ang. Tumor Microenvironment)

TNF: czynnik nekrotyczny nowotworu (ang. Tumor Necrosis Growth Factor)

VEGF-A: naczyniowy czynnik wzrostu A (ang. Vascular endothelial growth factor A)

VHL: tumor suppressor von Hippel-Lindau

---

## Streszczenie

Syngeniczne modele zwierzęce są jednym z najlepszych modeli do badań nad terapiami nowotworowymi. Jednak nie zawsze mogą one zostać wykorzystane, często przez ich wysoki koszt, czy też z powodów etycznych. Z tych względów wybierane są dwuwymiarowe modele komórkowe. Metoda ta posiada wiele zalet, jednak nie uwzględnia szeregu ważnych aspektów tworzących naturalne środowisko guza. Alternatywą tych modeli są hodowle trójwymiarowe. Do tej pory opracowano ich wiele, ale ze względu na różne czynniki, np. wysoki koszt, czy trudność w powtórzeniu skomplikowanych technik, szerokie zastosowanie 3D w badaniach komórkowych jest ograniczone. Celem niniejszej pracy było opracowanie uniwersalnego, prostego, trójwymiarowego modelu, który będzie naśladował zjawiska zachodzące w mikrośrodowisku guza. Postawiono nacisk na: trójwymiarowy kształt guza, gradient ciśnienia tlenu oraz indukcję mechanizmów zwiększających agresywność nowotworu (takie jak: CSC, EMT). Ponad to opracowany model miał być łatwą alternatywą do badań z zastosowaniem leków oraz miał umożliwić zbadanie mechanizmów powodujących indukcję lekooporności. W celu zweryfikowania uniwersalności oraz użyteczności proponowanego modelu, wykorzystano dwa różniące się od siebie mechanizmem działania zwierzęce modele nowotworów – czerniak (B16F10) oraz rak nerki (RenCa). Opracowane modele porównano z odpowiadającymi im syngenicznymi modelami mysimi oraz modelami dwuwymiarowymi. Wykonano szereg testów z wykorzystaniem terapeutyków cechujących się różnym mechanizmem działania (ewerolimus, cisplatyna, doksorubicyna). Wykazano, że model czerniaka oraz raka nerki hodowlach trójwymiarowych, cechują różne mechanizmy związane z progresją raka – w raku nerki wzrosła populacja komórek o fenotypie CSC, natomiast w modelu czerniaka doszło do indukcji zjawiska EMT. Udowodniono, że zaproponowane modele odwzorowują mikrośrodowisko guza pod względem założonych cech. Wykazano, że sferoidy nowotworu skóry, wykazują mniejszą wrażliwość na wszystkie zastosowane leki, natomiast dla nowotworu nerki obserwowano niską wrażliwość tylko na doksorubicyna. Stwierdzono, różnica w wrażliwościach na leki między hodowlami dwu- i trójwymiarowymi nie wynika z kształtu sfery, ani ekspresji MDR1 i mTor. W analizie NGS oraz w późniejszych badaniach w sferoidach zweryfikowano wzrost ekspresji genów należących do cytochromu p450. Mimo to nie udało się zidentyfikować zmian powodujących lekooporność w sferoidach, wykazano, że hodowla 3D może być istotna w badaniach nad fizjologią raka i może zostać wykorzystana do testów, z zastosowaniem komórek pochodzących od pacjentów, jako klinicznie istotny i łatwo dostępny instrument.

---

## **Abstract**

Syngeneic animal models are highly valuable tools in cancer therapy research. However, they cannot always be used, due to their high cost or for ethical reasons. Therefore two-dimensional cell culture models are often chosen. This method has many advantages, but does not take into account many important aspects of natural tumor microenvironment. Three-dimensional cultures can be an alternative to these methods. So far, many of them have been developed, but due to various factors, e.g. high cost or the difficulty of recreating, complicated techniques, the wide application of 3D in cell research is limited. The aim of this study was to develop a universal and simple three-dimensional model that will mimic the phenomena occurring in the tumor microenvironment. Emphasis was placed on: three-dimensional tumor shape, proper oxygen pressure and induction of mechanisms increasing tumor aggressiveness (such as: CSC, EMT). In addition, the developed model should be an easy alternative to drug research. In order to verify the universality and usefulness of the proposed model, two animal tumor models with different mechanisms of action were used - melanoma (B16F10) and kidney cancer (RenCa). The developed models were compared with the corresponding syngeneic mouse models and two-dimensional models. A number of tests were performed with the use of therapeutics with different mechanisms of action (everolimus, cisplatin, doxorubicin). It was shown that the melanoma model and kidney cancer in three-dimensional cultures are characterized by different mechanisms related to cancer progression - in renal cancer, the population of CSC cells increased, while in the melanoma model, the EMT phenomenon was induced. It has been proven that the proposed models reflect the tumor microenvironment in terms of the assumed features. It was shown that skin tumor spheroids showed a lower sensitivity to all applied drugs, while renal tumor displayed only a lowered sensitivity to doxorubicin. It was found that the difference in drug sensitivities between 2D and 3D cultures, does not result from the three-dimensional shape of the spheres or by the expression of MDR1 and mTor. The increase in the expression of genes belonging to the cytochrome p450 related pathways was verified by the NGS analysis and qPCR in both spheroids models. Although no changes causing drug resistance in spheroids have been identified, it has been shown that the 3D method of culture can be important for cancer physiology studies. It can be used for patient cell testing as a clinically relevant and easily available mean.



---

## 1. Wstęp

Nowotwory to druga najczęstsza przyczyna zgonów na świecie [1]. Z roku na rok występowanie chorób nowotworowych wzrasta, szacuje się, że do roku 2040 zapadalność na raka wzrośnie do około 61,7% [1-3]. Przypuszcza się, że wynika to z wpływu czynników demograficznych takich jak: przyrost oraz starzenie się populacji, czy też po przez czynniki środowiskowe i społeczne [1, 2].

Rak nerkowokomórkowy (*ang.: RCC- Renal Cell Carcinoma*) jest klasyfikowany na czternastej pozycji najczęściej diagnozowanych nowotworów [4, 5]. Najczęściej przypadki raka nerki są nowotworami sporadycznymi. Do czynników ryzyka rozwoju raka nerki należą: palenie tytoniu, otyłość, cukrzyca oraz nadciśnienie tętnicze [6]. Również niektóre dziedziczne choroby czy też mutacje drastycznie zwiększają ryzyko rozwoju RCC. Obejmują one zespół von Hippel-Lindau, dziedziczny brodawkowaty nowotwór nerki, dziedziczną leiomiomatozę oraz zespół Birt-Hogg-Dubém [7]. Choroba von Hippel-Lindau (*ang.: VHL – von Hippel-Lindau*) jest dziedzicznym zespołem nowotworowym charakteryzującym się rozwojem wielu guzów naczyniowych, między innymi właśnie raka nerki. Zespół jest spowodowany inaktywacją białka VHL (pVHL), co prowadzi do powstania sztucznego zjawiska hipoksji wynikającego z zahamowania procesu degradacji czynnika indukowanego niedotlenieniem 1 - alfa (*ang.: HIF1 $\alpha$  – Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$* ) [8]. W konsekwencji dochodzi do zwiększenia produkcji czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (*ang.: VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor*), płytkopochodnego czynnika wzrostu (*ang.: PDGF – Platelet-derived Growth Factor*) i transformującego czynnika wzrostu alfa (*ang.: TGF- $\alpha$  – Transcription Growth Factor alpha*). Czynniki te indukują proces angiogenezy (zjawisko omówione w kolejnym podrozdziale) [9]. Wyróżniamy trzy typy RCC: jasnokomórkowy, brodawkowaty oraz chromofobowy. Najczęściej rozpoznawanym typem jest rak jasnokomórkowy, występuje u około 70-75% diagnozowanych przypadków [10]. Mutacja lub utrata genu VHL jest uważana za jedną z najczęstszych przyczyn inicjujących rozwój jasnokomórkowego raka nerki (*ang.: ccRCC – clear-cell Renal Carcinoma*). Somatyczną utratę VHL obserwuje się u większości pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem ccRCC nie wywołanym przez czynniki genetyczne [11]. Rak nerki jest chorobą, którą można wykryć wcześniej i skutecznie leczyć za pomocą strategii chirurgicznych lub ablacyjnych, mimo to u jednej trzeciej przypadków wystąpią lub rozwijają się przerzuty [11]. Pacjenci u których wystąpiły, są leczeni lekami biologicznymi i/lub chemioterapią. W leczeniu często stosuje się inhibitory kinazy tyrozynowej (*ang.: TKI – Tyrosine Kinase Inhibitors*) hamujące proces angiogenezy i szlaki ssaczego celu

---

rapamycyny (ang.: mTOR – *mammalian Target of Rapamycin Kinase*), takie jak: kabozantynib, lenwatinib, pazopanib, temsirolimus, ewerolimus i związki terapeutyczne oparte na przeciwciałach, takie jak bewacyzumab [12].

Innym bardzo groźnym typem nowotworu, o zupełnie innym przebiegu choroby jest czerniak. Powstaje on z przekształconych melanocytów i jest klasyfikowany na szesnastej pozycji najczęściej diagnozowanych nowotworów wśród obu płci [13]. Kobiety wykazują znacznie wyższą przeżywalność w stosunku do mężczyzn, prawdopodobnie z powodu interakcji hormonów płciowych z komórkami czerniaka. Równocześnie wykazano, że kobiety cechuje silniejsza odpowiedź układu odpornościowego [13, 14]. Do czynników ryzyka rozwoju czerniaka należą: posiadanie jasnej skóry, duża liczba znamion, silna i częsta ekspozycja na promieniowanie UV, wiek oraz występowanie raka skóry u członków rodziny [14-16]. Czerniaka możemy podzielić na dwa rodzaje ze względu na lokalizację tkanki guza pierwotnego: czerniaka skórniego i nieskórniego. Czerniak skórny (eksponowany na słońce) jest znacznie częstszy – występuje u około 91,2% pacjentów, natomiast czerniak nieskórny (osłonięty przed słońcem) stanowi mniej niż 10% wszystkich przypadków oraz cechuje się znacznymi zmianami genetycznymi [16]. Czerniaka we wczesnych stadiach można skutecznie leczyć poprzez chirurgiczne usunięcie zmiany, jednak po wystąpieniu przerzutów kolejną linią obrony stają się terapie lekowe. Do niedawna jedyną opcją leczenia chorych na czerniaka z przerzutami była chemioterapia, coraz częściej stosuje się również terapie celowane (np.: inhibitory białka BRAF) czy też terapie immunologiczne (np.: inhibitory immunologicznego punktu kontrolnego) [17].

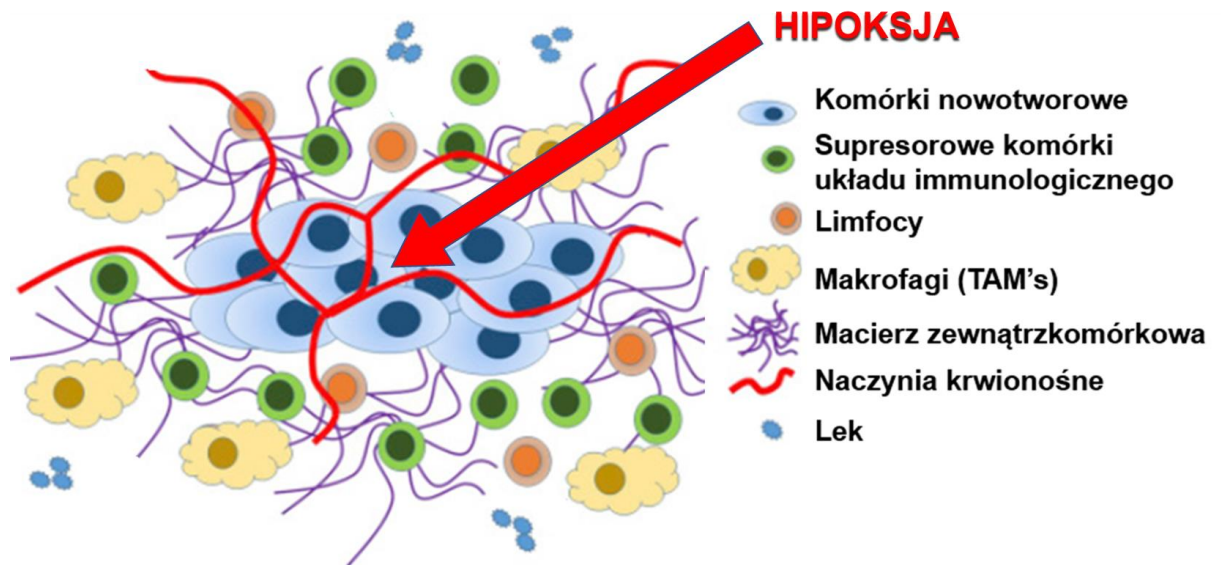
Pomimo ciągłego rozwoju medycyny oraz nowych metod terapii, leczenie oraz badanie chorób nowotworowych nadal są wyzwaniem. Coraz częściej po pewnym czasie od zastosowania terapeutyków, u pacjentów rozwija się silna lekooporność, która często wynika z kompleksowości budowy środowiska guza i różnych mechanizmów, które w nim zachodzą [18].

### **1.1. Mikrośrodowisko guza**

Mikrośrodowisko guza (ang.: *TME - Tumor Microenvironment*) składa się z wielu elementów komórkowych i komponentów zewnątrzkomórkowych. TME nie tylko odgrywa kluczową rolę podczas inicjacji, progresji i metastazy nowotworów, ale także ma szczególnie wpływ na skuteczność leczenia (Fig. 1) [19, 20].

Głównymi elementami komórkowymi mikrośrodowiska guza są komórki podścieliska: komórki śródbłonna, fibroblasty oraz komórki układu odpornościowego (Fig. 1) [20-22].

Natomiast do macierzy zewnątrzkomórkowej (ang.: *ECM- Extracellular Matrix*) zaliczamy: kolagen, fibronektyny, lamininy, witronektyny, tenascyny-C, cytokiny, hormony, czynniki wzrostu oraz wiele innych [23]. W zdrowym organizmie elementy te działają jako struktura wspierająca narządy (Fig. 1) [23]. W chorobie nowotworowej stają się one niezbędne do utrzymania TME, poprzez wspieranie komórek rakowych oraz dostarczanie im składników odżywczych [20, 23-25].



Rysunek 1. **Schemat Budowy mikrośrodowiska guza.** Źródło: Elizabeth L. Siegler et al.. 2016, Journal of Cellular Immunotherapy – modyfikowany [26] .

### 1.1.1. Elementy niekomórkowe

Niekomórkowe elementy TME takie jak ECM mogą być produkowane przez wszystkie typy komórek budujące TME. Tworzą skomplikowaną sieć włókien, która nie tylko odgrywa ważną rolę w zdolności komórek nowotworowych do inwazji i przerzutowania, ale także wpływa na wrażliwość na leczenie farmakologiczne [27]. Macierz zewnątrzkomórkowa uczestniczy w wielu procesach, takich jak proliferacja, czy migracja komórek [19]. ECM stanowi wsparcie odżywcze dla wszystkich komórek. Decyduje o wytrzymałości mechanicznej zapewniając wsparcie strukturalne, w celu utrzymania charakterystycznej trójwymiarowej architektury TME [24, 28-30]. ECM sprzyja również komunikacji międzykomórkowej poprzez transportowanie/przepuszczanie czynników wzrostu i cytokin. Ponadto odpowiada za tworzenie błony podstawnej wraz z komórkami nabłonka, śródbłonka i zrębu [19].

---

### 1.1.2. Elementy komórkowe

Fibroblasty (*ang.: CAFs – Cancer Associated Fibroblasts*) to najliczniejsza grupa komórek zaliczanych do TME, są one rekrutowane z krwi oraz zdrowych tkanek otaczających nowotwór. Ulegają aktywacji przez czynniki wydzielane w TME takie jak: TGF $\beta$ , FGF2, czy PDGF. Aktywowane fibroblasty wpływają na przebudowę ECM, po przez produkcję cytokin oraz uwalnianie enzymów proteolitycznych, takich jak metaloproteinazy (*ang.: MMP - matrix metalloproteinases*) i heparanazy. Enzymy te przekształcają utworzoną macierz zewnątrzkomórkową [23]. CAFs mają szczególne znaczenie w progresji nowotworu, a obecność ich dużej liczby często wiąże się ze złym rokowaniem klinicznym w wielu typach nowotworów [23, 31]. CAFs głównie odpowiadają za rekrutację makrofagów typu M2, regulatorowych limfocytów T i komórek supresorowych pochodzenia szpikowego. Ich obecność w TME sprzyja rozwojowi immunosupresji. Dodatkowo niektóre cytokiny wydzielane po przez uprzednio aktywowaną komórkę odpornościową (np. IL-1 $\beta$ ), indukują transformację prawidłowych fibroblastów w prozapalne, a to z kolei przyczynia się do ułatwienia rekrutacji wcześniej wymienionych komórek [25].

Komórki nieswoistego (makrofagi, komórki tuczne, neutrofile, komórki dendrytyczne, komórki supresorowe pochodzenia szpikowego i komórki NK) oraz swoistego układu immunologicznego (limfocyty T i B) to kolejny element podścieliska TME [23]. Komunikują się one zarówno z komórkami nowotworowymi jak i z CAFs bezpośrednio lub pośrednio poprzez cytokiny oraz chemokiny [28]. Modułują zachowanie komórek nowotworowych oraz wpływają na przebieg leczenia. Ważną rolę wśród komórek immunologicznych mikrośrodowiska guza ogrywiają makrofagi związane z nowotworem (*ang.: TAMs - Tumor-Associated Macrophages*) [28, 32]. Wyróżniamy dwa typy TAMs, które różnią się od siebie rodzajem cytokin, które je aktywują: M1 (aktywowane LPS lub cytokinami wydzielanymi przez limfocyty Th1), M2 (aktywowane cytokinami wydzielanymi przez limfocyty Th2). Makrofagi M1 mają właściwości przeciwnowotworowe; pośredniczą w cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał, wytwarzają reaktywne formy tlenu (*ang. Reactive oxygen species – ROS*) oraz czynnik martwicy nowotworu (*ang. Tumor Necrosis Factor - TNF*) [32, 33]. Natomiast Makrofagi M2 wykazują działanie promujące rozwój nowotworu; aktywują proces angiogenezy, immunosupresji, przerzutowania oraz przebudowy ECM [32, 33]. TAMs są także zaangażowane w rozwój lekooporności [23]. Komórki supresorowe pochodzenia szpikowego (MDSC), to kolejna populacja komórek układu odpornościowego, które

---

odgrywają dużą rolę w progresji nowotworu. Jest to niejednorodna populacja, która obejmuje komórki progenitorowe szpiku i niedojrzałe: makrofagi, granulocyty, komórki dendrytyczne, mające niezwykłą zdolność immunosupresyjną (np.: hamują odpowiedź komórek T) [34].

Komórki śródbłonna związane z nowotworem (*ang.: TEC – Tumor-associated Endothelial Cells*) różnią się od swoich odpowiedników w zdrowej tkance, wykazują odmienne właściwości proliferacyjne, migracyjne, inaczej reagują na czynniki wzrostu i chemioterapeutyki [23]. Komórki te, budując naczynia w rosnącym guzie, są zaangażowane w dostarczanie składników odżywczych komórkom nowotworowym, jak i również jako komórki niszy nowotworowej, tworzą środowisko sprzyjające rozwojowi choroby [35]. Komórki śródbłonna wyściełające powierzchnię światła naczyń krwionośnych są zwykle w spoczynku, ale podczas organogenezy, gojenia się ran, jak i właśnie choroby nowotworowej mogą zostać aktywowane, aby wejść w proces angiogenezy [27]. W rozrastającym się nowotworze zaczyna brakować składników odżywczych oraz tlenu, zjawisko to prowadzi do rozwoju stanu zwanego hipoksją, który w szczególności przyczynia się do aktywacji angiogenezy [36].

### **1.1.3. Hipoksja**

Hipoksję definiuje się jako niższe ciśnienie tlenu niż w stanach niepatologicznych [37]. Wartość biologicznego ciśnienia parcjalnego tlenu ( $pO_2$ ) w zdrowych tkankach nazywana jest fizjoksją i różni się w zależności od tkanki. Wartość  $pO_2$  w guzach jest przeważnie mniejsza niż odpowiadającej zdrowej tkance, nawet poniżej 1%, co charakteryzuje stan hipoksji [38, 39]. W wyniku tego zjawiska dochodzi do uruchomienia procesów inicjujących angiogenezę, czyli stanu, w którym w wyniku „kiełkowania” (*ang. Sprouting*) powstają nowe naczynia, głównie już z istniejących naczyń. Proces ekspansji nowych naczyń jest aktywowany w odpowiedzi na hipoksje, przez ścieżkę związaną HIF1 $\alpha$  [8]. W konsekwencji dochodzi do aktywacji produkcji VEGF zarówno przez komórki nowotworowe, jak i podścieliska [20, 27, 39-41]. Komórki śródbłonna aktywowane przez nowotwór wykazują zmienione profile ekspresji genów oraz receptorów komórkowych, co przyczynia się do powstawania nieprawidłowego unaczynienia nowotworu. Naczynia te są często nieszczelne, przez co wzrasta niedotlenienie. W rezultacie komórki nowotworowe przechodzą przez okresy niedotlenienia-reoksygenacji, a to przyczynia się do powstawania bardziej agresywnego fenotypu [27]. Jak wspomniano w poprzednim rozdziale ważnym modulatorem aktywności HIF-1 $\alpha$  jest VHL [38]. VHL działa w kompleksie, w którego skład wchodzi

---

liczne białka, posiada on funkcje ligazy E3 ubikwityny. W warunkach fizjoksji dochodzi do hydroksylacji określonych reszt proliny w dwóch funkcjonalnie niezależnych regionach domeny degradacji zależnej od tlenu (ODDD) czynnika HIF-1 $\alpha$ . VHL rozpoznaje hydroksylowane reszty, rekrutuje HIF-1 $\alpha$  do kompleksu ligazy ubikwityny E3, a następnie przeprowadza poliubikwitynację, której celem jest degradacja tego czynnika w proteasomie [42, 43]. W warunkach hipoksji nie dochodzi do hydroksylacji – HIF-1 $\alpha$  ulega stabilizacji [10]. W nowotworach często obserwuje się mutacje VHL, które inaktywują funkcjonalność tego białka. W konsekwencji rozwija się stan zwany pseudohipoksją- nagromadzenie HIF1 niezależnie od poziomu pO<sub>2</sub> w otoczeniu komórki [44].

Wszystkie komponenty mikrośrodowiska guza tworzą skomplikowaną sieć, w której wszystkie elementy komunikują się ze sobą przez różne czynniki, co prowadzi do ekspansji choroby nowotworowej. Rozrastający się nowotwór oraz wzrastające niedotlenienie prowadzi do powstania środowiska sprzyjającego selekcji bardziej agresywnych komórek nowotworowych, indukcji procesów prowadzących do progresji nowotworu oraz zjawiska przerzutowania.

## **1.2. Progresja nowotworu i rozwój lekooporności**

### **1.2.1. Inicjacja, promocja i progresja choroby nowotworowej**

Rozwój choroby nowotworowej możemy podzielić na trzy etapy: inicjację, promocję oraz progresję. Podczas inicjacji następuje zmiana informacji genetycznej komórek, czyli mutacja; zdrowa komórka staje się komórką nowotworową. Do tego stanu może dojść spontanicznie lub pod wpływem czynnika zewnętrznego (kancerogenu) [45]. Następnym etapem jest promocja, w wyniku której dochodzi do niekontrolowanego wzrostu komórek nowotworowych, które zaczynają naciekać zdrową tkankę tworząc guz pierwotny. Komórki nowotworowe komunikują się z otaczającym je środowiskiem indukując liczne zmiany promujące ich wzrost. Ostatnim etapem rozwoju choroby nowotworowej jest progresja, która następuje, gdy dochodzi do ekspansji komórek nowotworowych do innych tkanek – przerzutowania [46]. W wyniku kolejnych mutacji powstaje nowy klon komórek nowotworowych, który wyewoluował dzięki zwiększonemu tempu wzrostu lub innych czynników (takich jak przeżycie, komunikacja z innymi komórkami); proces ten nazywa się selekcją klonalną. Selekcja klonalna trwa przez cały rozwój nowotworu, a w konsekwencji nowotwory stale rosną szybciej i stają się coraz bardziej złośliwe [45-48].

Progresja nowotworowa obejmuje: indukcję immunosupresji, modulowanie mikrośrodowiska tkankowego, indukcję mechanizmów promujących lekooporność oraz

---

inwazję komórek poprzez podścielisko [49]. Powstawanie przerzutów jest silnie zależne od interakcji komórek rakowych, z otaczającymi je fibroblastami, komórkami śródbłonka oraz komórkami immunologicznymi. Silny wpływ na przerzutowanie przede wszystkim wywiera nasilające się niedotlenienie oraz niedożywienie komórek nowotworowych, czyli stan hipoksji.

Komórki agresywne, o zdolności tworzenia przerzutów posiadają zdolność do ominięcia szeregu przeszkód molekularnych i biofizycznych, co nie jest możliwe przez ich nieinwazyjnych odpowiedników [49]. Proces przerzutowania możemy podzielić na różne stadia, takie jak: transformacja komórek w bardziej inwazyjne, przedostanie się komórek do układu krwionośnego (intrawazacja), transport komórek naczyniami krwionośnymi oraz przejście tych komórek do innych tkanek (ekstrawazacja), kolonizacja nowych tkanek – powstanie nowotworu wtórnego [50].

W procesie przerzutowania kluczową rolę odgrywa przejście epitelialno-mezenchymalne (ang.: EMT – Epithelial to Mesenchymal Transition), wyniku którego komórki tracą fenotyp nabłonkowy i przekształcają się w komórki o fenotypie mezenchymalnym [51]. W trakcie tych przemian tracą zdolność adhezji do sąsiednich komórek, polaryzację wierzchołkowo-podstawną oraz stają się bardziej wydłużone i ruchliwe [52]. Do tych zmian dochodzi stopniowo, komórki zaczynają wykazywać pośrednie cechy morfologiczne, transkrypcyjne i epigenetyczne, zarówno o charakterze nabłonkowym jak i mezenchymalnym, w różnych stanach inwazyjnych [51]. Co więcej, w zależności od etapu EMT pozostają w kontakcie z różnymi elementami budującymi TME, wpływając na nie w niejednolity sposób. Na przykład, komórki o najbardziej wyraźnym fenotypie mezenchymalnym, rozrastają się w pobliżu komórek śródbłonka oraz komórek zapalnych [53]. W trakcie wzrostu zaczynają one uwalniać znaczne ilości chemokin i białek, które „przyciągają” komórki immunologiczne oraz stymulują proces angiogenezy. To z kolei indukuje rozwój charakterystycznej wysoce unaczynionej, prozapalnej niszy komórkowej, która promuje inwazję komórek nowotworowych [49, 53]. W kolejnym etapie dochodzi do przebudowy ECM, za którą odpowiadają między innymi MMP. Wydzielanie MMP jest indukowane przez obniżające się pH, w wyniku zwiększonej produkcji kwasu mlekowego w procesie glikolizy - wywoływanej niedotlenieniem (hipoksją) [54]. MMP odpowiadają za degradację składników ECM, co ułatwia komórkom nowotworowym przedostanie się do krwiobiegu z wnętrza guza pierwotnego. Ten proces z kolei inicjuje uwalnianie cytokin, takich jak interleukiny (IL), czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$  (ang.: TNF- $\alpha$  - tumor necrosis

---

factor  $\alpha$ ), VEGF-A oraz naskórkowy czynnik wzrostu (ang.: *EGF – Epidermal Growth Factor*), które dodatkowo promują wzrost i przeżycie komórek nowotworowych [55].

Wyróżniamy wiele czynników transkrypcyjnych wpływających na przejście epitelialno-mezenchymalne, a ich lista ciągle się powiększa [56]. Do kluczowych należą czynniki z rodziny SNAI takie jak SNAI1 oraz SNAI2, których produkcja jest modulowana przez wzrost aktywności czynnika HIF-1 $\alpha$  [54]. Odpowiadają one za zahamowanie produkcji E-kadheryny oraz transkrypcji kilku elementów odpowiedzialnych za połączenia międzykomórkowe, w tym kładyn i desmosomów [51, 52]. Jednocześnie w trakcie spadku ekspresji E-kadheryny dochodzi do wzrostu ekspresji, N-cadheryny i wimentyny. Analiza ewolucji ekspresji tych białek jest stosowana do oceny przebiegu EMT [56].

Z procesem przerzutowania oraz z samą inicjacją choroby nowotworowej często wiąże się obecność nowotworowych komórek macierzystych (ang.: CSC – Cancer Stem Cells) [57]. CSC to nie zróżnicowane komórki o powolnym cyklu komórkowym (zwykle uśpione w fazie G0), które są zdolne do odtworzenia tkanki nowotworowej nawet z pojedynczej komórki. Nowotwory charakteryzuje heterogeniczna i hierarchiczna organizacja komórek, której powstawanie ma tłumaczyć obecność nie zróżnicowanych CSC [58]. Według tej teorii komórki CSCs stoją na szczycie tej hierarchii i różnicują odpowiednio dostosowując się do zmieniającego się środowiska nowotworowego promując ich przeżycie, a co za tym idzie zwiększając inwazyjność [59]. CSC zazwyczaj występują jako niewielka subpopulacja komórek w całej masie guza (ok. 0,001–0,1%). Populacja takich komórek została pierwszy raz zidentyfikowana w 1994 roku w grupie komórek białaczki [60]. W późniejszych latach CSC zostały zidentyfikowane w pozostałych nowotworach, np.: raku piersi, prostaty, nerki czy czerniaku [58]. Nowotworowe komórki macierzyste charakteryzuje wiele cech normalnych komórek macierzystych takich jak: zdolność do samoodnowy, różnicowanie czy aktywacja poszczególnych szlaków sygnałowych, takich jak Wnt, Hedgehog lub Notch. CSC wykazują ekspresję markerów powierzchniowych, takich jak, np.: CD44, CD133, CD105, oraz cechuje wzrost aktywności dehydrogenazy aldehydowej (ang.: ALDH – Aldehyde dehydrogenase). Wiele badań sugeruje, że podobnie jak pozostałe komórki nowotworowe, CSC również przechodzą liczne zmiany metaboliczne takie jak: zmiana sposobu oddychania komórkowego, wzrost aktywności glikolitycznej oraz zmiana sposobu metabolizowania lipidów [58]. Pochodzenie komórek macierzystych ciągle jest niejasne, jednak dosyć często ich obecność wiąże się z narastającą hipoksją oraz zmieniającym się pH. Wykazano, że obniżające się ciśnienie tlenu przyczynia się do utrzymania nie zróżnicowanego stanu komórek oraz wpływa na ich proliferację [20, 58]. Obecność



---

nowotworowych komórek macierzystych często jest przyczyną złego rokowania klinicznego oraz nawrotów choroby nowotworowej.

Częstym skutkiem progresji nowotworowej jest rozwój oporności wielolekowej. Narastające niesprzyjające warunki, które indukują procesy związane z wzrostem inwazyjności, rozbudowujące się mikrośrodowisko guza oraz zachodzące w nim zmiany, znacząco wpływają na odpowiedź terapeutyczną i rokowanie pacjenta.

### **1.2.2. Lekooporność – przyczyna niepowodzeń w terapiach antynowotworowych**

Odporność wielolekowa (ang.: MDR – Multi Drug Resistance) jest definiowana jako odporność nowotworów na określony lek chemioterapeutyczny, któremu równocześnie towarzyszy oporność na inne leki, które mogą mieć inne lub podobne właściwości. Zdarza się też tak, że komórki nabywają odporność na leki, które znacznie różnią się pod względem strukturalnym i funkcjonalnym z wcześniej stosowanymi lekami, lub posiadają odporność już od początku (bez stosowanego leczenia) [61]. W związku z tym zjawisko lekooporności możemy podzielić na dwie kategorie: odporność wewnętrzna (pierwotna), zewnętrzna (nabyta po leczeniu) [62]. Rozwój MDR zależy od niestabilności genetycznej, częstych mutacji komórek nowotworowych, w tym wzrastającej heterogeniczności guza [62]. Istnieje wiele opisanych mechanizmów odpowiadających za rozwój MDR, należą do nich między innymi: wzrost aktywności pomp odpowiedzialnych za wyrzut substancji z komórki oraz procesów indukujących inaktywację leków, modyfikacje procesów związanych z apoptozą, autofagią czy naprawą DNA, wzrastające zjawisko hipoksji a co za tym idzie, selekcja komórek o większej inwazyjności (CSC, EMT) [61, 63-65].

Najczęściej z MDR wiąże się wzrost aktywności transporterów powodujących wyrzut leków z komórki. W tym procesie ważną rolę odgrywają pompy glikoproteinowe (ang.: P-gp – p-glycoprotein pumps), należące do rodziny transporterów ABC. Transportery te to strukturalnie spokrewnione białka błonowe, posiadające wspólne motywy wewnątrzkomórkowe znane jako domeny wiążące nukleotydy (ang. *ATP binding cassetes*). Główną ich funkcją jest przeniesienie/wyrzut cząsteczek z komórki wbrew gradientowi stężeń, dzięki transportowi aktywnemu – poprzez wiązanie i hydrolizę cząsteczki ATP [62]. Do tej pory zidentyfikowano około 48 typów transporterów ABC u ludzi, a 12 z nich odpowiada za transport leków. Najlepiej opisanym transporterem ABC jest białko ABCB1 inaczej zwane MDR1 [61]. Nadekspresję P-gp zaobserwowano u ok. 50% wszystkich ludzkich nowotworów. W niektórych, takich jak rak płuca, wątroby, nerki, odbytnicy i okrężnicy, nadekspresja pojawiała się przed zastosowaniem leczenia. Natomiast w innych

---

typach, np.: w nowotworach hematologicznych, jak ostra białaczka limfoblastyczna i ostra białaczka szpikowa, nadekspresję wykazywano już po ekspozycji na chemioterapeutyki [66]. Wykazano, że nowotworowe komórki macierzyste charakteryzuje obecność tych transporterów. W szczególności u tych komórek zaobserwowano wzrost ekspresji: ABCB1, ABCC1 i ABCG2 [65]. Dane te sugerują, że w terapii antynowotworowej kluczową rolę może odgrywać opracowywanie strategii ukierunkowanych właśnie na transportery ABC. Do tej pory opracowano trzy podejścia: regulowanie funkcji transporterów ABC za pomocą inhibitorów kompetycyjnych lub allosterycznych lub przeciwciał nakierowanych na transportery ABC [67].

Innym ważnym mechanizmem przyczyniającym się do powstania MDR jest wzrost aktywności enzymów indukujących inaktywację leków. Do najbardziej znanych należy cytochrom p450 (ang.: CYP P450 – Cytochrome P450), a także transferazy glutationu-S (ang.: GST - Glutathione-S transferase), czyli enzymy detoksykacyjne odpowiednio I i II fazy. Enzymy te są zdolne do katalizowania biotransformacji oksydacyjnej większości leków, w szczególności lipofilowych ksenobiotyków [68]. Enzymy CYP najliczniej zlokalizowane są w komórkach wątroby, jednak ich nadekspresję często obserwuje się w komórkach nowotworowych [69]. Szlaki cytochromu P450 są klasyfikowane pod względem podobnych sekwencji genów; przypisuje się im numer określający rodzinę (np. CYP1, CYP2) i literę, klasyfikującą do konkretnej podrodziny (np. CYP1A, CYP2D). Cytochromy występują również w kilku izoformach (np. CYP1A1, CYP2D6) [70]. Badania wykazały, że szczególną rolę w aktywacji i degradacji leków odgrywają enzymy z rodzin CYP2 i CYP3. Przykładem jest docetaksel, który posiada szerokie spektrum działania przeciwnowotworowego – sprzyja stabilizacji tubuliny, umożliwiając hamowanie podziałów szybko rosnących komórek. Za pośrednictwem CYP3A4 i CYP3A5 ulega on utlenianiu do nieaktywnego metabolitu t-butylohydroksydocetakselu [71]. Co ciekawe istnieją istotne korelacje między aktywacją transporterów ABC a enzymów CYP. Wiele leków, jak na przykład imatynib, paklitaksel, docetaksel, doksorubicyna, winkrystyna, etopozyd, tenipozyd i winblastyna, wykazują powinowactwo zarówno cytochromów jak i pomp P-gp [71]. Ekspresja enzymów II fazy – GST, zależy od typu cząsteczki, np.: GSTA1 ulega ekspresji w wątrobie, nerkach i jądrach, GSTP1 w płucach i mózgu, a GSTM2 w mózgu. Jednak wykazano ich ekspresję również w komórkach nowotworowych [72]. Główną funkcją tych cząsteczek jako enzymów jest kataliza reakcji, w której glutation (GSH) jest sprzężany z szeroką gamą egzogennych i endogennych ksenobiotyków. Ten proces jest pierwszym etapem szlaku kwasu merkapturowego, który pomaga w eliminacji toksycznych

---

związków z komórki. Wyróżniamy dwie nadrodziny enzymów GST: cytozolowe i mikrosomalne związane z błoną. Cytozolowe z kolei są podzielone na 6 klas pod względem poliformizmów w materiale genetycznym, ponad to wszystkie wykazują odmienne powinowactwo substratowe [73]. GST przyczyniają się do rozwoju lekooporności poprzez dwa mechanizmy: bezpośrednią detoksykację i/lub hamowanie szlaku kinazy białkowej aktywowanej mitogenami (ang.: MAPK – Mitogen-activated protein kinase). Jednym z najlepiej poznanych enzymów II fazy jest GSTP1. Obserwowano wzrost jego ekspresji w szczególności w raku jajnika. Co więcej wykazano, że jego obecność wpływa na wrażliwość na leki, takie jak: cisplatyna i karboplatyna. Podobnie, nadekspresję GSTP odnotowano również w chłoniakach wywołując rozwój oporności na chlorambucyl i inne leki alkilujące [74].

Inną możliwością, aby komórki nowotworowe stały się odporne na różne leki przeciwnowotworowe jest modyfikacja procesów związanych z apoptozą, autofagią czy naprawą DNA. „Normalne” komórki podlegają ścisłej kontroli podczas podziału komórkowego w punktach kontrolnych faz G1/S, intra S i G2/m. W momencie pojawienia się uszkodzeń DNA, „normalne” komórki dążą do ich naprawy, bądź apoptozy. W komórkach nowotworowych system kontroli jest zaburzony; naprawa DNA, i wchodzenie w proces apoptozy nie zachodzą prawidłowo. Wiele leków przeciwnowotworowych, np.: irinotekan, docetaksel itd. uszkadzają DNA komórek rakowych, ale często dzięki dobrze rozwiniętemu systemowi odpowiedzi na uszkodzenia, dochodzi do jego naprawy. Wykazano, że stopień wrażliwości na chemioterapię zależy od tego, jak bardzo jest rozwinięty ten mechanizm. [62]

Kluczową rolę w odpowiedzi nowotworu na leczenie odgrywa również sama organizacja składowych TME, macierzy zewnątrzkomórkowej, interakcji międzykomórkowych oraz architektura guza. Elementy te stanowią fizyczną barierę dla dostarczania leków. Wykazano, że guzy charakteryzujące się zorganizowaną, wzajemnie połączoną siecią kolagenową i zmniejszoną objętością macierzy zewnątrzkomórkowej, charakteryzuje mniejsza penetracja leku. Z drugiej strony wiązanie leków ze składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej hamuje przenikanie leku do głębszych obszarów guza [29]. Równocześnie wydzielanie wielu czynników wzrostu przez składowe TME przyczynia się do rozwoju MDR, np.: wzrost sekrecji VEGF często koreluje z wzrastającą opornością na leki antyangiogenne. Także obniżające się pH wpływa na skuteczność chemioterapii, wykazano, że kwaśne pH obniża aktywność doksorubicyny [62].

---

### 1.3. Modele badań nad nowotworami stosowane w biologii

#### 1.3.1. Standardowe modele badań nowotworów

Do opracowywania terapii antynowotworowych, czy też badania mechanizmów związanych z promocją, progresją oraz lekoopornością nowotworów często wykorzystuje się różne modele *in vivo* oraz *in vitro*. Zwierzęce syngeniczne modele *in vivo* są bardzo cenne z punktu widzenia odtworzenia pełnego spektrum mikrośrodowiska guza [75], między innymi trójwymiarowego kształtu nowotworu, gradientu stężenia tlenu czy też interakcji międzykomórkowych [20, 76]. Najczęściej wykorzystuje się modele mysie oraz szczurze. Okazały się one przydatne w walidacji różnych funkcji, identyfikowaniu nowych markerów nowotworowych, pozwoliły zrozumieć wiele mechanizmów molekularnych i komórkowych leżących u podstaw inicjacji i progresji nowotworu [76]. Modele te nie są jednak idealne; wiele leków, które okazały się bardzo obiecujące w testach na zwierzętach, nie przeszło oceny bezpieczeństwa w badaniach klinicznych, m.in. emicizumab, zydelig [77]. Modele zwierzęce, często nie mogą być wykorzystywane na każdym etapie badań przedklinicznych, także ze względu na ich wysokie koszty [20]. Dodatkowo wykorzystywanie zwierząt do celów naukowych może nie być brane pod uwagę ze względów etycznych. Dlatego większość wstępnych badań opiera się na eksperymentach z wykorzystaniem ludzkich komórek w hodowlach dwuwymiarowych – metody *in vitro*, które pomimo faktu, że eliminują różnice specyficzne dla gatunku, posiadają wiele wad.

Najczęściej komórki w monowarstwie, hodowane są na sztywnych materiałach, takich jak polistyren, czy szkło. Taki sposób hodowli w uproszczonych i nierealistycznych warunkach, nie odzwierciedla w pełni podstawowej fizjologii prawdziwych tkanek [75, 78]. Komórki hodowane w ten sposób wykazują zmodyfikowaną architekturę w stosunku do tkanki, z której pochodzą. Obserwuje się wymuszoną polaryzację, spłaszczony kształt komórki, modyfikacje komórkowych sygnałów mechanicznych/biochemicznych oraz komunikacji komórka-komórka. Kolejnym ważnym aspektem jest również nie zachowanie ciśnienia/gradientu tlenu właściwego dla naśladowanej tkanki. Hodowle są przeprowadzane w warunkach normoksji, czyli w mieszance powietrza lub gazu (w inkubatorach do hodowli komórkowych), gdzie  $pO_2$  wynosi ok. 18,75% [79]. Komórki te ulegają hiperoksji w porównaniu do komórek w środowisku *in vivo*. Co więcej wzrost komórek w monowarstwach, pozwala na równy dostęp komórek do składników odżywczych, czynników wzrostu obecnych w pożywce. To skutkuje jednorodnym wzrostem i proliferacją komórek, co nie jest obserwowane w naturalnych warunkach. Również podczas testów leków przeciwnowotworowych

---

dochodzi do równomiernego rozkładu leków, co później przekłada się na nieprawidłową interpretację ich aktywności. W wielu przypadkach obserwowane wyniki z zastosowaniem tych modeli nie przekładały się w późniejszych badaniach klinicznych [80]. Pomimo tych wad, hodowle 2D nadal pozostają bardzo atrakcyjne dla celów laboratoryjnych ze względu na ich prostotę, dzięki stosunkowo krótkim okresom testowania oraz możliwość badania mechanizmów toksyczności, kinetyki enzymów i zależności odpowiedzi od stężenia. Zachęcający jest również ich niski koszt, np. ze względu na stosowanie tylko niewielkich ilości substancji [75, 78].

Alternatywą tego typu modeli są coraz częściej stosowane hodowle w środowisku tlenowym zbliżonym do naturalnego lub hodowle trójwymiarowe, które w porównaniu do wcześniej wymienionych, częściowo naśladują naturalne środowisko nowotworu oraz niwelują niepotrzebne cierpienie zwierząt.

### **1.3.2. Alternatywne modele badań nowotworów**

Różnica ciśnienia tlenu w naturalnym środowisku nowotworu, może zostać zniwelowana dzięki zastosowaniu komór utrzymujących określony poziom tlenu. Pozwalają one na hodowle w ciśnieniu  $O_2$  zbliżonym do fizjologicznego lub patologicznego – hipoksji [80, 81]. Istnieje wiele badań nad nowotworami wykorzystujących tego typu komory, np. do oceny wrażliwości na leki komórek w stanie hipoksji [39]. Jednak modele te nadal nie niwelują pozostałych wad standardowych hodowli komórkowych jakimi są nieograniczony wzrost komórek czy równomierny rozkład substancji i składników odżywczych. Problem ten może zostać rozwiązany przez zastosowanie hodowli trójwymiarowych [20]. Dzięki utrzymaniu komórek w tym kształcie umożliwiamy zachowanie gradientu tlenu oraz penetrację leku obserwowaną w guzie *in vivo* [82]. Ponadto komórki hodowane w formacie 3D utrzymują wysoce dynamiczną strukturę, w której produkowane składniki są osadzone, degradowane lub modyfikowane. Przez co stanowią platformę sprzyjającą wykonywaniu specyficznych funkcji komórkowych, takich jak adhezja, proliferacja, apoptoza, a przede wszystkim dostarczają informacje o interakcjach komórka-komórka i komórka-macierz [83]. Dzięki tym wszystkim zaletom, tego typu hodowle mogą lepiej sprawdzić się w badaniach nad nowotworami w szczególności nad analizą mechanizmów związanych z lekoopornością.

### **Założenia i cel pracy**

Istnieje wiele propozycji modeli trójwymiarowych z wykorzystaniem różnych metod takich jak: hodowle z wykorzystaniem podłoży/"rusztowań" (agarozą, kolagenem,

---

fibronektyna, żelatyna, Matrigel i wiele innych), czy specjalnych urządzeń (mikroczipów, drukarek trójwymiarowych itd.) [82, 83]. Jednak ze względu na różne czynniki, np. wysoki koszt, czy trudność w powtórzeniu wysoce skomplikowanych metod, szerokie zastosowanie 3D w badaniach komórkowych jest ograniczone [79]. Istnieją na rynku produkty do hodowli komórek 3D (np. płytki do wiszącej kropli lub płytki ze specjalnym podłożem), jednak nie zawsze są one dobrze zoptymalizowane i nie posiadają zwalidowanych protokołów. To uniemożliwia poprawną interpretację danych lub porównywanie wyników z różnych grup [79, 83].

Celem niniejszej pracy jest opracowanie uniwersalnego i prostego modelu 3D, który będzie naśladował zjawiska zachodzące w mikrośrodkowisku guza, z naciskiem na: trójwymiarowy kształt, gradient ciśnienia tlenu oraz indukcję mechanizmów zwiększających agresywność nowotworu (takie jak: CSC, EMT). Opracowany model ma być uniwersalny dla różnego typu nowotworów, umożliwiając w prosty sposób otrzymywać sferoidy o regularnym kształcie. W tym celu zastosowano różniące się od siebie modele komórkowe dwóch typów nowotworów – czerniaka (B16F10) oraz raka nerki (RenCa). O ile nie opracowano sferoidów z użyciem komórek RenCa, istnieją hodowle 3D z zastosowaniem komórek B16F10, co umożliwi porównanie i zweryfikowanie proponowanego modelu. Kolejnym celem niniejszej pracy jest sprawdzenie przydatności opracowanego modelu, do badań nad podatnością komórek nowotworowych na terapię z zastosowaniem leków oraz zbadanie mechanizmów powodujących indukcję lekooporności.

Hipoteza pracy:

Modele 3D odpowiednio naśladowują zjawiska zachodzące w guzie *in vivo* i mogą stanowić lepsze narzędzie do identyfikacji mechanizmów indukujących lekooporność, niż hodowle 2D.

---

## **Kopie opublikowanych prac**

Poniżej przedstawiono dwa powiązane ze sobą artykuły, które przedstawiają weryfikację głównych założeń niniejszej pracy doktorskiej:

1. **Spheroid culture models adequately imitate distinctive features of the renal cancer or melanoma microenvironment;** Filipiak-Duliban A, Brodaczewska K, Majewska A, Kieda C., *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2022 May 10. doi: 10.1007/s11626-022-00685-8. PMID: 35536385. – artykuł ten przedstawia porównanie opracowanych modeli z guzami otrzymanymi w hodowlach in vivo – weryfikacja pierwszego założenia pracy.



# Spheroid culture models adequately imitate distinctive features of the renal cancer or melanoma microenvironment

Aleksandra Filipiak-Duliban<sup>1,2</sup> · Klaudia Brodaczewska<sup>1</sup> · Aleksandra Majewska<sup>1,2</sup> · Claudine Kieda<sup>1,3</sup>

Received: 16 February 2022 / Accepted: 24 April 2022 / Editor: Tetsuji Okamoto  
© The Society for In Vitro Biology 2022

## Abstract

Tumor development studies should adapt to cancer cells' specific mechanisms in connection with their microenvironment. Standard two-dimensional cultures and gas composition are not relevant to the real cancer environment. Existing three-dimensional models are often requiring sophisticated conditions. Here, we propose and characterize, in two cancer models, melanoma (B16F10) and kidney cancer (RenCa), a three-dimensional culture method, reporting the presence of hypoxia-related genes/proteins and aggressiveness mechanisms (epithelial mesenchymal transition and cancer stem cells). We validate the designed three-dimensional method by comparing it with *in vivo* growing tumors. The developed method brings simplicity and data reproducibility. Melanoma spheroid-growing cells reached a cell cycle arrest at the G0/G1 phase and showed induction of hypoxia. Spheroid-recovered RenCa cells were enriched in proliferating cells and displayed delayed hypoxia. Moreover, the responses to hypoxia observed in spheroids were validated by *in vivo* tumor studies for both lines. Three-dimensional shapes induced cancer stem cells in renal cancer, whereas epithelial to mesenchymal transition occurred in the melanoma model. Such distinction in the use of different aggressiveness-leading pathways was observed in *in vivo* melanoma vs kidney tumors. Thus, this 3D culture model approach is adequate to uncover crucial molecular pathways using distinct mechanisms to reach aggressiveness; i.e., B16F10 cells perform epithelial to mesenchymal transition while RenCa cells dedifferentiate into cancer stem cells. Such three-dimensional models help mimic the *in vivo* tumor features, i.e., hypoxia and aggressiveness mechanisms as validated here by next-generation sequencing analysis, and are proposed for further alternative methods to *in vivo* studies.

**Keywords** 3D · CSC · EMT · Melanoma · RCC

## Introduction

Despite progress in cancer treatments, this disease is still the leading cause of death worldwide (Elder *et al.* 2020). Treatment and studies on all cancers are challenging due to the complexity of the tumor site (Butturini *et al.* 2019). This complex system, called the cancer microenvironment, is composed of cancer and many other non-cancer cells, which all have specific roles in

the functioning of the tumor (Ribeiro Franco *et al.* 2020). In tumor microenvironment, hypoxia has an enormous impact, which occurs during growing of tumor mass (Carreau *et al.* 2011). Hypoxia is defined as an oxygen tension lower than observed in non-pathologic conditions (pO<sub>2</sub> 1%) (Sakashita *et al.* 2019). Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) is the master transcriptional regulator (Rathmell and Chen 2008; Schödel *et al.* 2016; J. Zhang and Zhang 2018) itself controlled by the suppressor von Hippel-Lindau (VHL) molecule (Rathmell and Chen 2008; Cowey and Rathmell 2009). When hypoxia occurs, the upregulated HIF-1, in turn, induces angiogenic factors such as the vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) (Casanovas *et al.* 2005; Collet *et al.* 2012; Abou Khouzam *et al.* 2020). Hypoxia represents a poor prognosis factor in many cancers; it is linked with cancer aggressiveness, invasion, and metastasis (Carreau *et al.* 2011; Joseph *et al.* 2018; Abou Khouzam *et al.* 2020).

✉ Aleksandra Filipiak-Duliban  
afilipiak1@wim.mil.pl

<sup>1</sup> Laboratory of Molecular Oncology and Innovative Therapies, Military Institute of Medicine, Warsaw, Poland

<sup>2</sup> Postgraduate School of Molecular Medicine, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

<sup>3</sup> Center for Molecular Biophysics UPR 4301 CNRS, 45071 Orleans, France



High aggressiveness of cancer cells is often linked with epithelial to mesenchymal transition (EMT) (Tanabe *et al.* 2020) and cancer stem cells (CSC) (Melissaridou *et al.* 2019). The EMT process and CSC selection occur with hypoxia, low pH, and niches deprived by nutrients (Najafi *et al.* 2019); this leads to cancer progression and escape of cancer cells to other tissues, and results in cancer treatment failure (Pastushenko and Blanpain 2019). EMT is defined by the loss of epithelial markers (e.g., E-cadherin) in favor of mesenchymal ones (e.g., N-cadherin,  $\beta$ -catenin, Vimentin) (Quail and Joyce 2013). During this process, endothelial cells lose their junctions and polarity; they become aggressive, migratory, and mesenchymal-type cells (Joseph *et al.* 2018), whereas CSCs are defined as cells with stem-like features such as self-renewal, multipotency, and the reversibility from their quiescence (Pan *et al.* 2018) (Najafi *et al.* 2019). CSC could be found among cells expressing surface markers, such as CD105 (Dolinsek *et al.* 2015; Shi *et al.* 2019), CD133 (Simbulan-Rosenthal *et al.* 2019; Bradley *et al.* 2020), and aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) (Abourbih *et al.* 2013; Taylor *et al.* 2017; ).

Mimicking real cancer microenvironment is crucial in cancer research (Hinshaw and Shevde 2019). This is why syngeneic *in vivo* murine models are highly valuable tools in terms of recreating the full spectrum of a tumor (Cheon and Orsulic 2011). However, animal models cannot always be used in each phase of pre-clinical studies. Therefore, most initial research is performed with the use of monolayer cell culture (Duval *et al.* 2017). Standard two-dimensional (2D) cell culture methods are unfortunately limited; they are lacking the three-dimensional shape of the tumor which largely modulates the intercellular interactions and limits oxygen availability thus lowering intra-tumor oxygen tension (Duval *et al.* 2017). Along with the spheroid development, its 3D structure allows such natural establishment of hypoxia (Klimkiewicz *et al.* 2017). There are, already developed, various types of 3D culture methods involving the use of both scaffold and non-scaffold methods (Ravi *et al.* 2015). However, by various factors, e.g., cost, special equipment, and reproducibility of highly complicated methods, widespread implementation of 3D's into cell-based studies has been limited (Ravi *et al.* 2015; Hoarau-Véchet *et al.* 2018; Verjans *et al.* 2018; Singh *et al.* 2020). Commercially available products for the 3D cell culture (e.g., hanging drop or scaffold plates) are also not always well optimized, and due to the lack of standardized protocols, interpretation of the data can be challenging (Verjans *et al.* 2018).

The aim of the present studies was to optimize and validate simple *in vitro* models of cancer which will correspond to the characteristics observed in the *in vivo* tumor, such as three-dimensional shape, proper oxygen tension, and cellular responses with a special emphasis on aggressiveness

mechanisms (Quail and Joyce 2013; Hoarau-Véchet *et al.* 2018). To check for the universality vs versatility of the proposed protocol for 3D cultures, we used two known and distinct cancer cell models: renal cancer (RenCa cells) and the melanoma (B16F10). While there are no well-established models with RenCa cells, the melanoma 3D models for B16F10 cells exist and could be easily compared with our model (Klimkiewicz *et al.* 2017; Bhatt *et al.* 2020; Baciu *et al.* 2022). Assuming that spheroids produce better conditions for the cell cultures with respect to the natural ones, we here developed 3D culture methods that are not only valid enough to uncover distinct molecular mechanisms used by tumor cells to reach aggressiveness, but also show that such separate mechanisms occur, despite the similar establishment of hypoxia and, importantly, identically to the *in vivo* observed mechanisms. Such well-characterized models may permit the easy obtention of more reliable data, which will bring the translation closer to the clinical practice.

## Material and methods

***In vivo* tumor implantation and development** The experiments were carried out with 12 female mice: two biological repetitions, 6 (2 × 3) of the C57/B16 strain, syngeneic model of melanoma, and two biological repetitions, 6 (2 × 3) of BALB/c, syngeneic model of kidney tumor. The mice had an acclimatization time before starting the experiments. During the experiment, the mice were housed in Military Institute of Hygiene and Epidemiology animal facility (listed as an experimental unit authorized to carry out animal experiments by the Polish Ministry of Science and Higher Education, user number 0074), in IVC rack system in single-use, ventilated, plastic cages (Allentown Inc, Allentown, NY). Animals were maintained in a 12-h/12-h light–dark cycle (dawn: 6:30–7:00) at  $21 \pm 2$  °C temperature and a relative humidity of  $60 \pm 20\%$ . Food and water were provided *ad libitum*. As enrichment, the wooden tool and nesting material were supplied. Cancer cell suspensions (RenCa, 100,000 cells; B16F10, 200,000 cells in 100  $\mu$ L of PBS mixed with Matrigel™ (50%, vol/vol) (Corning, Glendale, AZ) and maintained at 4 °C) were subcutaneously administered to the animals' thigh after anesthesia with isoflurane. Experimental groups consisted of 3 mice kept in one cage for each experimental group. The renal cancer model experiment was terminated after 22 d, while the melanoma cancer model experiment was completed 18 d after the injection of the tumor cells, when the tumors exceeded 1-cm diameter. All experiments were conducted after obtaining approval for procedures from Second Warsaw Local Ethics Committee for Animal Experimentation (no. WAW/2/76/2017) and following Directive 2010/63/EU regulations.

**Cell culture** The tests were carried out with murine renal carcinoma RenCa (CRL-2947™, ATCC, Manassas, VA) and melanoma B16-F10 (given by Prof. J. Dulak, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University, Cracow, Poland; authenticated in 2021, ATCC) cell lines. Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> in appropriate media: RPMI-1640 GlutaMax™ medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), with 10% FBS (vol/vol) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). After the confluence reached 70–80%, all the cell lines were passaged by detaching with Accutase solution (Biolegend, San Diego, CA). Melanoma cell line was authenticated by ATCC Cell Authentication Service. The cells were analyzed by checking eighteen mouse short tandem repeat (STR) loci and two additional markers (human D8 and D4) to screen for the presence of human or African green monkey species. The profile of submitted cell samples matched to the 97% to the reference profile ATCC MUSA0830. The RenCa cell line was obtained from ATCC (CRL-2947™), and the cells were cultured and frozen. The early stock solutions of cells were used in the experiments of these studies. Cells used in the experiments were Mycoplasma free as assayed with PCR Mycoplasma Test (Biomedica, Piaseczno, Poland) and did not exceed the 15th passage.

**Two-dimensional cell culture** Two-dimensional cultures were carried out under two oxygen partial pressures “normoxia” (18.75% O<sub>2</sub>, 2DN) and hypoxia (1% O<sub>2</sub>, 2DH). Cells were seeded at distinct densities: RenCa, 6600 cells/cm<sup>2</sup>, B16F10 3300 cells/cm<sup>2</sup>. Twenty-four hours after plating, hypoxia-intended cell cultures were transferred to hypoxia chambers (BioSpherix, Xvivo System Model X3, Parish, NY), while changing the cell medium to a fresh hypoxia-balanced medium. Normoxic cell cultures were kept under standard aerobic conditions, after switching to a fresh, normoxic medium. The cultures were pursued for 72 h.

**Three-dimensional cell cultures by spheroid formation** The 3D cultures were conducted as previously described (Filipiak-Duliban *et al.* 2022). Five hundred cells resuspended in 20- $\mu$ L medium supplemented with 0.25% methylcellulose (vol/vol in medium, R&D Systems, Minneapolis, MN) were seeded as a single hanging drop, on the cover of a culture plate in standard culture conditions (5% CO<sub>2</sub>, 21% pO<sub>2</sub>). After 72 h, drops were individually transferred to a 96-well plate previously covered with 1% agarose dissolved in double-distilled water (w/vol, VWR, Warsaw, Poland), and 50  $\mu$ L of fresh medium (supplemented with 0.25% methylcellulose, vol/vol) was added concomitantly. Cells were allowed to expand for another 4-d period.

**Western blot** The two-dimensional cell cultures were washed twice with ice-cold PBS and collected by scraping. Harvested and PBS-washed spheroids were dispersed, and cell suspensions were centrifuged before lysing by RIPA lysis buffer (containing NP-40 50 mM, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1%, DOC 0.5%, SDS 0.1%, Tris (pH 7.4); from Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) complemented with protease and phosphatase inhibitors (both from Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Fragments of neoplastic tissues were homogenized using TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Germany) in RIPA lysis buffer with protease/phosphatase inhibitors. Insoluble material was removed by lysate centrifugation (14,000  $\times$  g for 10 min at 4 °C). An equal amount of total protein was separated on 12% SDS polyacrylamide gels for 40 min at a constant 200 V using a Bio-Rad Minigel System, followed by transfer to nitrocellulose membranes (GE Healthcare Life Science, Munich, Germany). Membranes, after blocking with 5% non-fat dry milk resuspended in 1% Tris-Buffered Saline (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) supplemented with 0.1% Tween (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), were probed with primary antibodies to detect ALDH1A1 (1:250 Polyclonal; LSBio, Seattle, WA), VHL (1:200 anti-mo; Clone: FL-181; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), HIF1 $\alpha$  (1:100; Clone: 28b; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), Vimentin (1:1000 anti-rb, clone: D21H3; Cell Signaling Technology, Poland), and Vinculin (1:1000 anti-mo, clone: V284; Santa Cruz Biotechnology), which served as loading control. Membranes were further treated with secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase-HRP (goat anti-mouse/anti-rabbit, 1:10,000; Vector Laboratories, Burlingame, CA). Bands were detected using Luminol as HRP substrate (Santa-Cruz, Dallas, TX) with X-ray films. Bands were analyzed using ImageJ Fiji. All data were normalized to 2DN condition.

**Flow cytometry detection of intracellular enzyme activity and cell surface antigens** Cell suspensions from 2D cultured cells were obtained using Accutase solution (Biolegend, San Diego, CA). Individually cultured spheroids were treated with 0.1 mg/mL collagenase type II (Gibco by Thermo Fisher Scientific) and incubated at 37 °C with simultaneous stirring until the spheres disintegrated into single cells.

**Cell cycle analyses** One milliliter of 70% cold ethanol (113964200; Chempur, Piekary Śląskie Poland) was slowly added to the cells; then, they were incubated at –20 °C for 24 h. The cells were washed with PBS and then 100  $\mu$ L of Muse® Cell Cycle Reagent (The Muse® Cell Cycle Kit; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was added for 30 min. For acquisition, an additional 150  $\mu$ L of PBS was added. All samples were analyzed by assessing the percentage of cells

in G0/G1, S, and G2 phases, based on DNA content, using a Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA).

**Aldehyde dehydrogenase-1 activity assessment** The ALDH1 enzyme activity was measured intracellularly with the help of Aldefluor fluorescent reagent. It is a BODIPY-amino acetaldehyde fluorescent ALDH substrate able to diffuse into intact and viable cells. Converted into BODIPY-amino-acetate by ALDH in cells, the negatively charged product is retained inside the cells increasing fluorescence for flow cytometry analysis ( $\lambda_{\text{ex max}} = 493 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em max}} = 588 \text{ nm}$ ). Protocol was followed according to the manufacturer's recommendations (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada). Briefly,  $0.5 \times 10^6$  cells were suspended in 500  $\mu\text{L}$  of Aldefluor assay buffer. Assay samples received 2.5  $\mu\text{L}$  of the Aldefluor reagent and mixed, and immediately 250  $\mu\text{L}$  of the suspension was taken out and put in the control tube with the DEAB (N, N'-dimethylaminobenzaldehyde) inhibitor 2.5  $\mu\text{L}$ . Cells were further incubated for 45 min at 37 °C in the dark. After washing cells, viability was determined by staining with 7-amino-actinomycin D (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), a membrane-permeant dye which is excluded from viable cells; it binds to double-stranded DNA of dead cells ( $\lambda_{\text{ex max}} = 546 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em max}} = 647 \text{ nm}$ ). All samples were analyzed using a Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA). Cells treated with inhibitor were used to set the gate for ALDHneg population and positive cells were analyzed.

**Surface antigens detection by fluorescent antibodies** The evaluation of the expression of CD105 and CD133 was determined using commercially available antibodies: PerCP-eFluor710 conjugate rat-anti-mo (IgG1) CD133 (Clone: 13A4; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and PE conjugate rat-anti-mo (IgG2a) CD105 (Clone: MJ7/18; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). In total, 500,000 cells were resuspended in PBS (200  $\mu\text{L}$ ) and first stained for viability determination by LIVE/DEAD™ Fixable Dead Cell Stain Sampler Kit, 488-nm excitation (Thermo Fisher Scientific) for fluorescence spectrum compatibility (for 15 min). The dye reacts with free amines both inside and on the surface of dead cells, yielding to an intense fluorescent staining. The cells were washed and resuspended in Stain Buffer – BSA (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ), then the labelling for antigens was performed by incubation of the cells in the presence of fluorescent antibodies for 2 h at 4 °C in the dark. Cell analysis was performed using Calibur flow cytometer (Becton and Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

**Reverse transcriptase-polymerase chain reaction** RNA samples from in vitro and in vivo cultures were isolated using the commercially available RNeasy Mini Kit (Qiagen,

Hilden, Germany), according to the manufacturer's protocol. The obtained cell lysates were either stored at  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  or RNA isolation was started. The isolated RNA was then purified using the TURBOTM DNA-free Kit (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania) according to the manufacturer's protocol. The concentration and purity of RNA were determined by measuring the absorbance in the wavelength range: 230, 260, and 280 nm. RNA integrity was assessed using a fluorometer based on the RIN (RNA integrity number) coefficient (acceptable values 7–9). After obtaining high-purity mRNA, a reverse transcription process, using a commercially available High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), was performed according to the manufacturer's instructions. The resulting single-stranded cDNA was used as real-time polymerase chain reaction templates.

RT-PCR were performed using TaqMan Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) together with commercially available probes all from Thermo Fisher Scientific: *Vhl*: Mm00494137, *Vegf-a*: Mm00437306, *Hif-1 $\alpha$*  Mm00468869, *Actin $\beta$*  Mm02619580. The samples run on Bio-Rad CFX384 qPCR System or CFX Connect qPCR System (Bio-Rad, Warsaw, Poland). Amplification conditions were as follows: 50 °C (2 min), 95 °C (10 min), and 40 cycles of 95 °C (15 s) and 60 °C (1 min). The quantity of mRNA was calculated using the 2(-Delta C(T)) method and normalized to  *$\beta$ -actin*. All reactions were performed as triplicates.

**Next-generation sequencing (NGS)** NGS was performed outsourced service by Lexogen GmbH (Vienna, Austria) with NextSeq 500 system (Illumina, Ipswich, MA). Briefly, RNA was extracted and purified using methods described in the "Reverse transcriptase-polymerase chain reaction" section. RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Singapore) was used to measure total RNA concentration and Qubit RNA IQ Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Singapore) to measure RNA integrity and quality. To obtain cDNA libraries, 1  $\mu\text{g}$  of total RNA with IQ > 8.5 was used. Preparation of libraries was performed according to manufacturer's instructions: The NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module—mRNA isolation and fragmentation (New England Biolabs, Ipswich, MA) Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina—cDNA Library synthesis, New England Biolabs, Ipswich, MA); NEBNext Multiplex Oligos for Illumina—adding Adaptors (New England Biolabs, Ipswich, MA). All the steps were performed along with the purification of the reaction products using NEBNext Sample purification Beads (New England Biolabs, Ipswich, MA). Libraries were qualified on Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA), with High Sensitivity DNA Kit (Agilent, Santa Clara, CA). Differentially expressed genes (DEGs) were classified according to  $-1.5 < \log\text{FC} > 1.5$  and

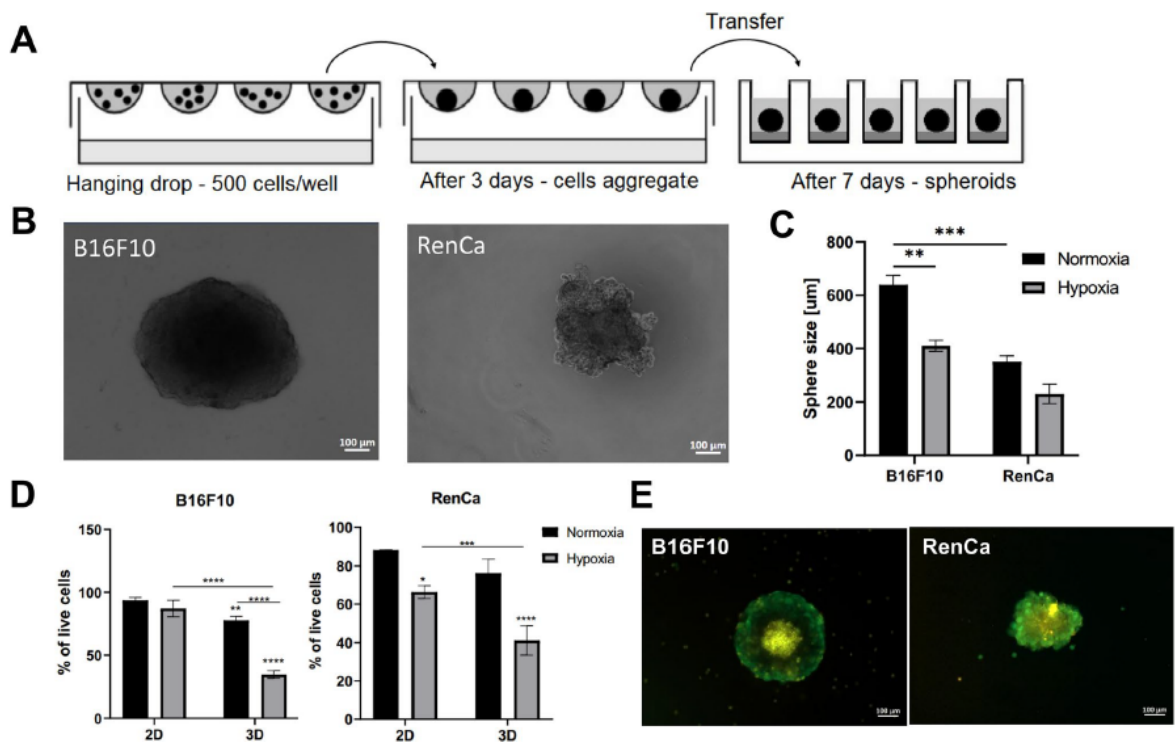
$p$ -value  $< 0.5$ . Gene symbols were translated into UniProt accession numbers using the UniProt Knowledgebase (UniProtKB). Protein networks were retrieved from the STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes) database using the list of protein accession numbers as a query and then analyzed using the Cytoscape software.

**Microscopy imaging** 3D cultures were performed according to the abovementioned procedure. Imaging to assess live and dead cells in the spheres was performed after labelling by calcein acetoxymethyl ester (Calcein AM, Biolegend, San Diego, CA) which is hydrolyzed by cellular esterases to give fluorescent calcein in the cytoplasm of live cells and propidium iodide (Exbio, Vestec, Czech Republic) DNA intercalating agent which is highly fluorescent after intercalation. Briefly, after adding the dyes, spheroids and cells grown in two dimensions were incubated for 15 min in the dark at room temperature. Images were acquired using a Zeiss AxioObserver.7, fluorescence, and inverted microscope ( $\times 5$  magnification), and analysis performed with the Zen 2.6 blue edition software (Zeiss, Jena, Germany).

**Statistical analysis** The results are shown as mean  $\pm$  SEM. All data were normalized to 2DN condition. All experiments were performed at least in 3 biological replicates. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9.0 software (RRID:SCR\_002798). Depending on the Gaussian distribution, we performed one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey post hoc test or Kruskal–Wallis with post hoc Dunn's test.

## Results

**Optimization, characterization, and comparison of 3D model with 2D culture models; Establishment of 3D cultures** Irregular cell aggregates were observed especially for RCC model after using standard culture methods, e.g., hanging drop in regular culture medium (Supplementary Fig. 1A). Consistent spheroids were obtained from renal and melanoma murine cancer cells, in normoxic conditions, by combining the hanging drop method with culture in a semi-solid matrix (Fig. 1B). Five hundred cells in a 20- $\mu$ L drop were seeded



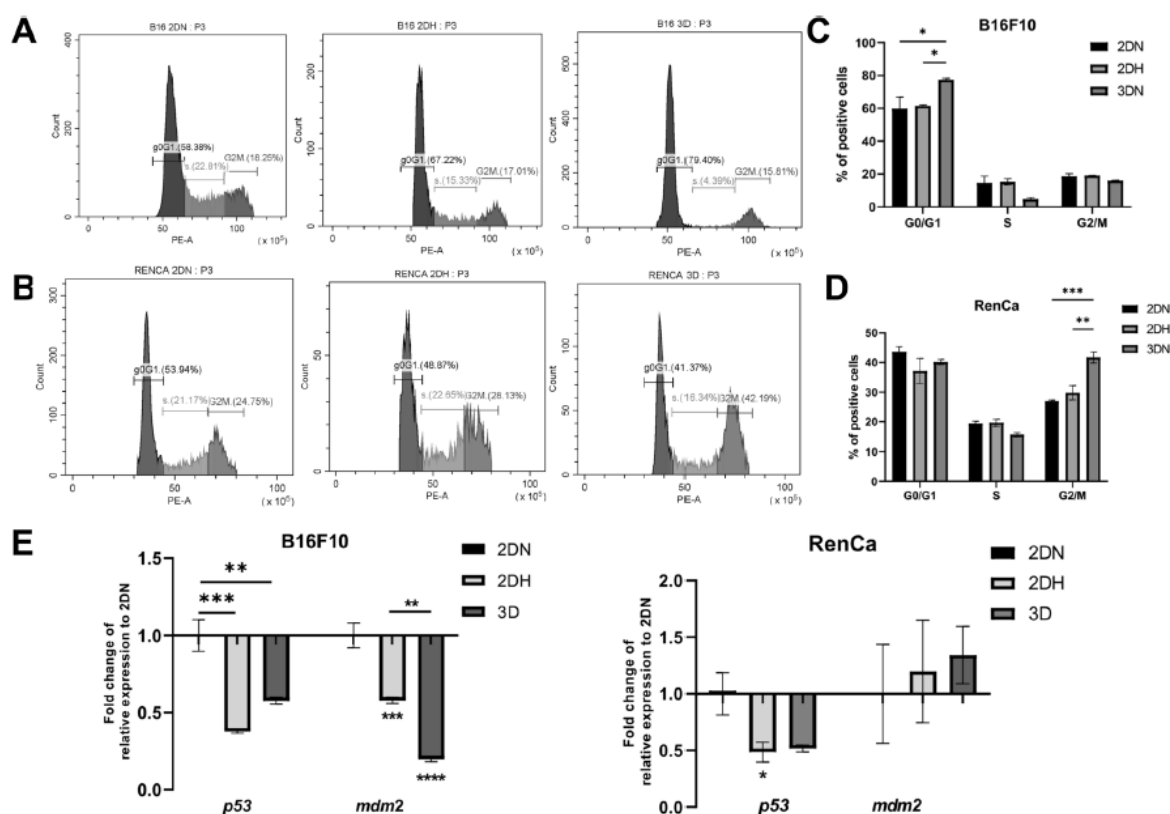
**Figure 1** Schematic model of spheroid formation (A). (B) Spheroids after 7 d of culture. (C) Comparison of spheroid diameter,  $N=3$ . Effect of culture conditions on cell viability in different culture conditions measured by flow cytometry (D) and fluorescence staining of

spheroids (E) by propidium iodide (orange, dead cells) and calcein (green, live cells), which shows the positions of live and dead cells in the spheres. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA/Tukey test,  $*p < 0.05$ ,  $N=3$ .

for both cell lines to compare the proliferative capacity of the cells during the sphere formation. As previously described (Filipiak-Duliban *et al.* 2022), spheroids were cultured for 7 d in total: 3 d in hanging drops and then 4 d in agarose-coated bottom plate in standard culture medium supplemented with methylcellulose (Fig. 1A). After 3 d of culture in hanging drops, irregular cell aggregates were observed for both cell lines: RenCa and B16F10 (Supplementary Fig. 1B). Round and regular spheroids were obtained after 7 d of culture were completed (Fig. 1B). As measured in diameters, the RCC cells at the end of culture formed smaller spheroids (~400  $\mu\text{m}$ ) as compared to spheres (~600  $\mu\text{m}$ ) (Fig. 1C) from B16F10 despite the initial number of seeded cells being the same. Using flow cytometry, we determined the cell viability in 2D and 3D cultures conducted in normoxic and hypoxic conditions. A higher proportion of viable cells for both cell lines was recovered from two-dimensional cultures, than from spheroids in both oxygen tension conditions (Fig. 1D). Microscopic observation of spheres stained by calcein and propidium iodide showed a necrotic core in the 3D structures

in normoxia (Fig. 1E). The cells from spheroids cultured in hypoxia showed a very low viability (Fig. 1D; Supplementary Fig. 1C) and were smaller than spheres cultured in normoxia. It suggests that hypoxia, which often occurs during tumor growth and lack of nutrients, might develop in the center of the sphere. This phenomenon might explain the reduced viability of cells recovered from 3D structures (Klimkiewicz *et al.* 2017). Consequently, spheroid culture in additional/external hypoxic conditions may cause intense cellular stress, drastically reducing cell survival. As very few cells were recovered from hypoxia-cultured spheres which impaired the conduct of any further experiments, we decided to perform research on 3D cultures maintained in normoxia which seems to more appropriately reconstitute the natural development of a tumor.

**3D culture condition induces melanoma cancer cell cycle arrest at the G0/G1 phase** Spheroid culture affected the cell cycle distribution in both cell lines with no direct effect of hypoxia only (Fig. 2A–D). In the case of B16F10 cells, 3D



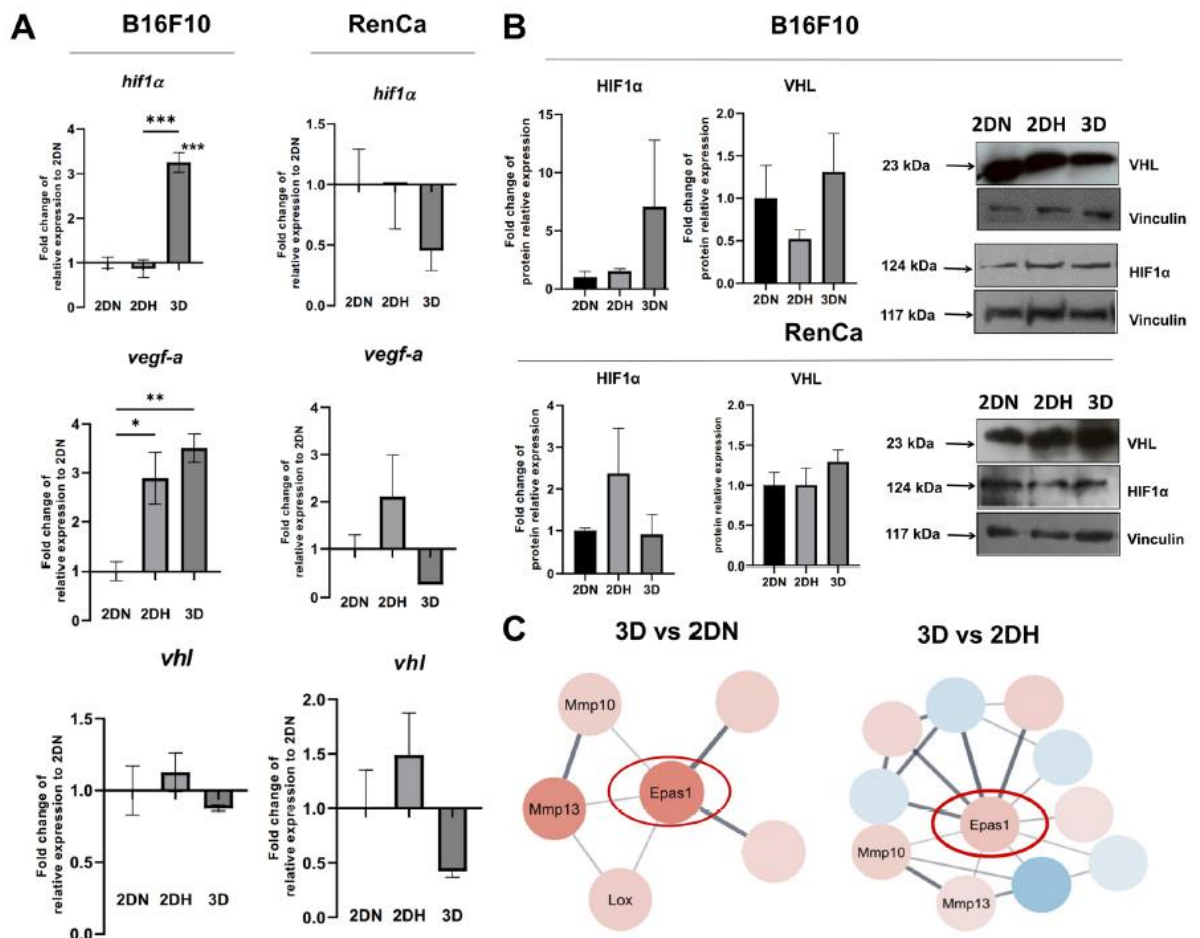
**Figure 2** Cell cycle analyses by quantitative flow cytometry, in various culture conditions: (A, C) DNA content frequency histograms of B16F10 and RenCa cells. (B, D) Quantitative measurements of cell cycle stages. (E) Effect of culture conditions on the expression of proliferation capacity regulation genes. The expression of *mdm2* and

*p53* for B16F10 and RenCa cell lines was determined by quantitative RT-PCR (qRT-PCR).  $\beta$ -actin served as a quantitative internal control. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA/Tukey test, \* $p < 0.05$ ,  $N = 3$  (2DN-control).

culture caused accumulation of cells in G0/1 phase with concurrent reduction of S phase mostly (Fig. 2A, C). On the contrary, spheroid-recovered RenCa cells were enriched in proliferating, G2/M cells with a non-significant drop of cells in both G0/1 and S phases (Fig. 2B, D). As activation of p53 tumor suppressor can lead to cell cycle arrest (Schafer 1998), we checked the expression of *p53* and its inhibitor *mdm2*. For both cancer models, we observed a similar downregulation of *p53* expression by both hypoxia and 3D formation, as compared with 2D normoxic culture (Fig. 2E). Expression of *mdm2* in melanoma cancer for 2D hypoxia and 3D was downregulated as compared with 2D normoxia, with a significantly stronger effect due to the spheroid type of culture (Fig. 2E). For RCC cultures, no statistically significant change of *mdm2* expression was observed (Fig. 2E). B16F10 cells maintain

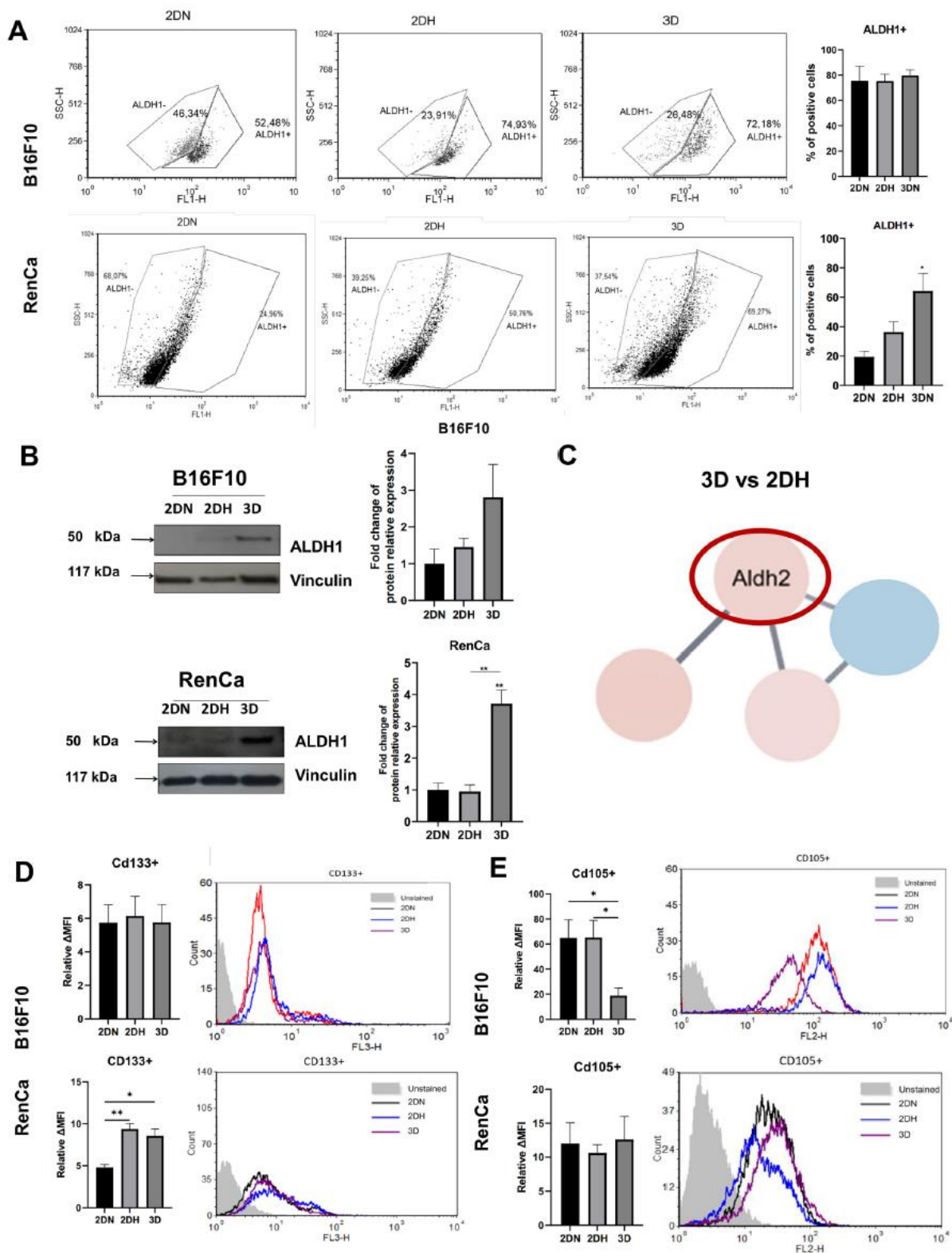
functional wild-type p53 (Besztercei *et al.* 2019). RenCa cells were shown to have partly mutated whose impact on p53 expression has not been proven (Kiweler *et al.* 2020).

**3D melanoma cancer model induces hypoxia** The presence of necrotic core in 3D structures of RCC and melanoma models after staining with calcein and propidium iodide suggested the induction of hypoxia in the middle of the spheres (Klimkiewicz *et al.* 2017). We checked several hypoxia-related genes/proteins such as HIF-1 $\alpha$ , *vegf-a*, and VHL (Fig. 3A, B). In a 3D melanoma model, we observed the upregulation of *hif-1 $\alpha$*  expression and a tendency for higher protein level as compared to both 2D normoxia and hypoxia (Fig. 3A, B). *Vhl* expression was not affected by any of the tested culture conditions.



**Figure 3** Effect of the culture conditions on the expression of hypoxia-regulating genes (A, B) and proteins (C). The gene expression of *hif-1 $\alpha$* , *vhl*, and *vegf-a* was determined by quantitative RT-PCR (qRT-PCR);  $\beta$ -actin served as a quantitative internal control (A). The protein expression of HIF-1 $\alpha$ , VHL, and VEGF assessed by western blot; Vinculin served as a quantitative loading control (B). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA/Tukey test

or Kruskal–Wallis/Dunn’s test,  $*p < 0.05$ ,  $N \geq 3$  (2DN, control). Protein–protein interaction scaffold networks of EPAS1 determined by next-generation sequencing ( $q$ -value  $< 0.05$  and  $\log_2$  FCI  $> 1.5$ ) identified in RenCa cells. Blue nodes represent proteins encoded by down-regulated genes and red nodes represent proteins encoded by up-regulated genes (C).

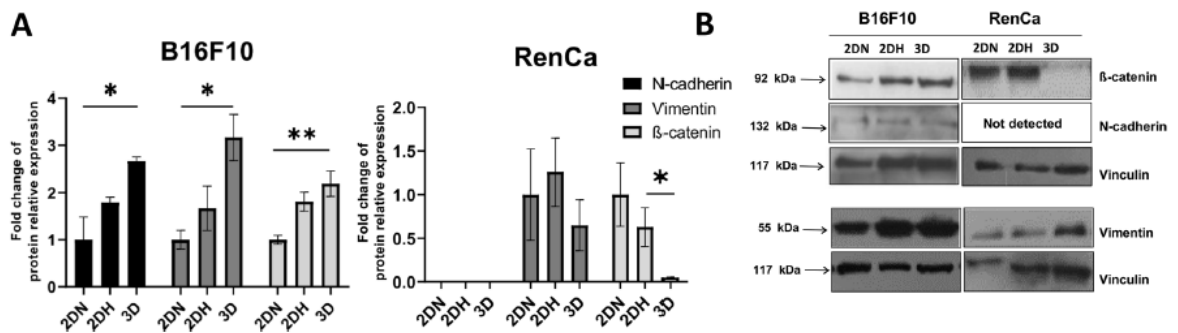


**Figure 4** Effect of the culture conditions on regulation of CSC. ALDH1 activity determined using flow cytometry method (A); protein expression of ALDH1 assessed by western blot method (B); protein–protein interaction scaffold networks of ALDH2 determined by next-generation sequencing ( $q$ -value  $< 0.05$  and  $\log_2$  FCI  $> 1.5$ ) identified in RenCa cells. *Blue nodes* represent proteins encoded by down-regulated genes and *red nodes* represent proteins encoded by up-regulated genes (C). Evaluation of CD133-positive cells using flow cytometry method (D). Evaluation of CD105-positive cells using flow cytometry method (E). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA/Tukey test or Kruskal–Wallis test/Dunn’s test,  $*p < 0.05$ ,  $N \geq 3$ .

*Vegf* expression increased both in 3D and 2D cultures in hypoxia, although in the latter condition, no HIF-1 $\alpha$  upregulation occurred (Fig. 3A, B). In the RCC model, we observed an opposite tendency; 3D culture down-regulated *hif1a*, *vhl*, and *vegfa* genes; however, hypoxia alone tended to increase HIF-1 $\alpha$  protein and *vhl* and *vegfa* gene expression (Fig. 3A, B). Global gene expression analysis with NGS was performed for RCC model to identify hypoxia gene signatures in 3D as compared with 2D cultures (Fig. 3C). String protein networks indicated upregulation of Endothelial PAS Domain Protein 1 (Epas1) for 3D culture as compared with both 2D

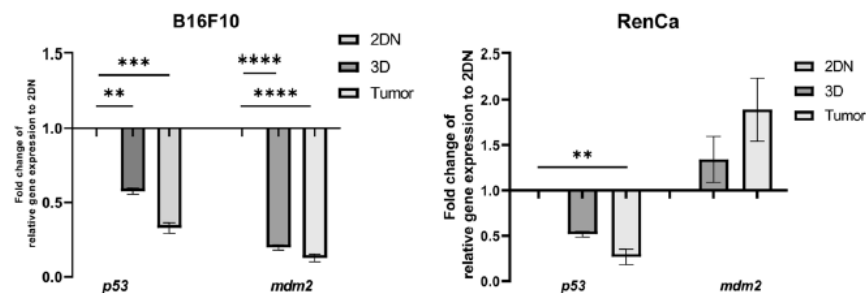
normoxia and hypoxia culture conditions. Also, upregulation of matrix metalloproteinase-10 (Mmp10), matrix metalloproteinase 13 (Mmp13), and Lysyl oxidase (Lox) was observed as compared to 2DN culture (Fig. 3C).

**Renal cancer spheroids induce the upregulation of a stem-like cancer cell—CSC—population** Upregulation of cells arrested in G0/G1 phase may suggest the presence of CSC (Caglar and Biray Avci 2020), and hypoxia was shown to induce selection of CSC in cancer foci (Klimkiewicz *et al.* 2017). Therefore, the levels of several potential CSC markers such as ALDH1, CD133, and CD105 were evaluated (Fig. 4). In the case of B16F10 cells with G0/G1 arrest, we could not observe CSC induction; CD105 positive cells dropped in 3D culture while CD133-positive cells remained unchanged (Fig. 4D, E). Similarly, ALDH1 was not significantly altered in those cells (Fig. 4A, B). Surprisingly, in spheroid-growing RCC cells that were characterized by increased G2/M accumulation, strong increases of ALDH1 protein level and activity were observed (Fig. 4A, B). Analysis of String protein networks also indicated the upregulation of aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) expression in 3D (Fig. 4C). Additionally, in RenCa cell line, an increased number of CD133-positive cells in



**Figure 5** Relative expression of EMT markers (A, B). Relative protein expression of B-catenin, N-cadherin, and Vimentin assessed by western blot; Vinculin served as a quantitative loading control (A).

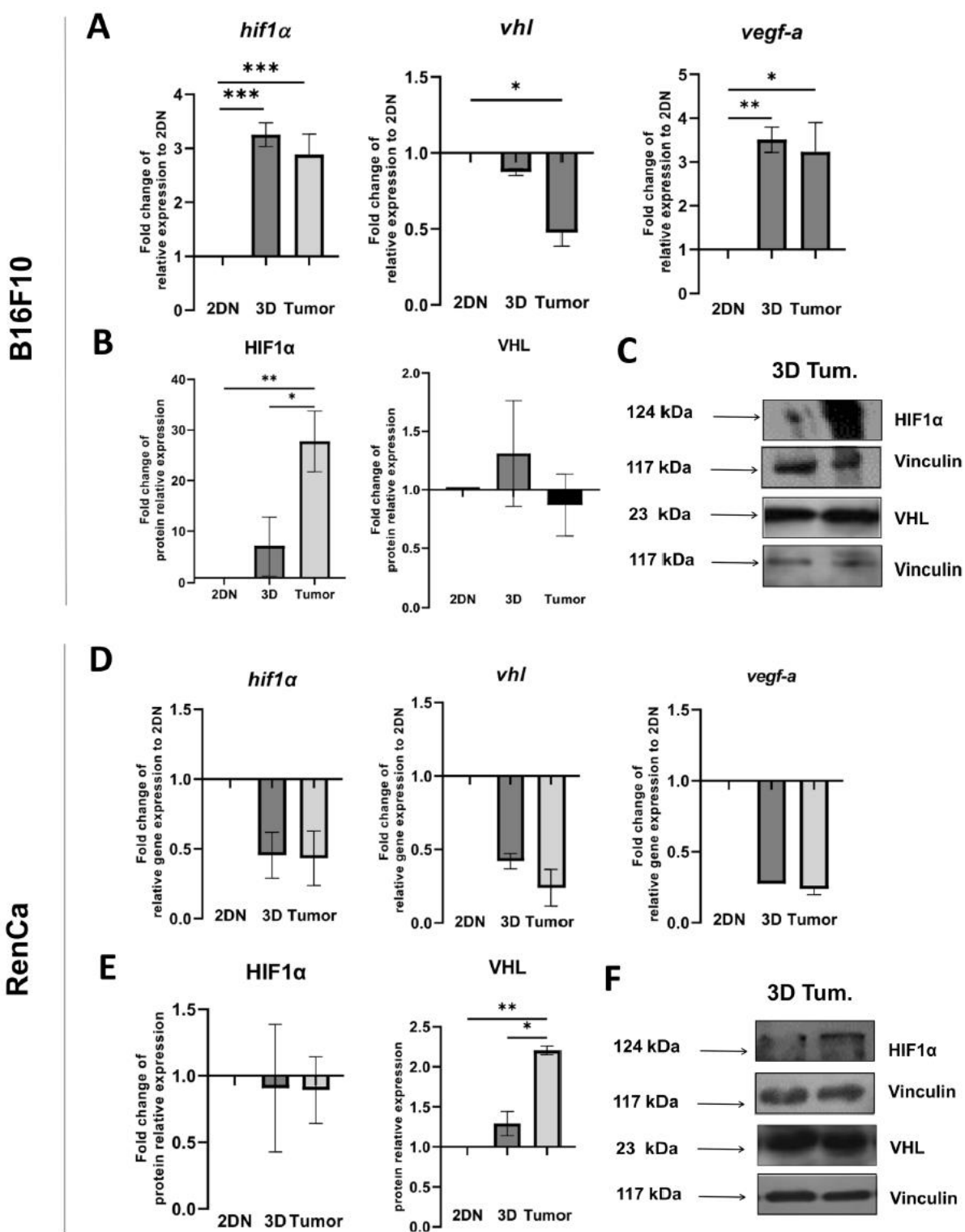
B-catenin, N-cadherin, and Vimentin detection by western blots (B). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA/Tukey test,  $*p < 0.05$ ,  $N \geq 3$ .



**Figure 6** Comparison of proliferation capacity regulation genes. Relative expression of *mdm2* and *p53* for B16F10 and RenCa cells. All data normalized to 2DN expression.  $\beta$ -Actin served as a quantitative

internal control. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA/Tukey test or Kruskal–Wallis test/Dunn’s test,  $*p < 0.05$ ,  $N \geq 3$ ; 3D,  $N \geq 3$  (2 biol.), tumors (2DN control).





**Figure 7** Comparison of the expression of hypoxia-regulating genes (A, D) and proteins (B, C, E, F). The gene expression of *hif1α*, *vhl*, and *vegfa* was determined by quantitative RT-PCR (qRT-PCR); *β-actin* served as a quantitative internal control (A, D). The protein expression of HIF1α, VHL, and VEGF assessed by western blot; Vinculin served as a quantitative loading control (B, E). HIF1α and VHL detection by Western blots (C, F). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA/Tukey test or Kruskal–Wallis/Dunn’s test, \* $p < 0.05$ ,  $N \geq 3$ ; 3D,  $N \geq 3$  (2 biol.), tumors (2DN, control).

2D cell cultures in hypoxia and in 3D cultures was shown, whereas no statistically significant changes for CD105 levels were observed (Fig. 4D, E). Remarkably, an opposite tendency was displayed by B16F10 cells.

**EMT is induced in melanoma 3D model** Another mechanism of cancer aggressiveness is EMT (Pastushenko and Blanpain 2019). We tested whether this process is induced by spheroid culture by assessing the main EMT markers: Vimentin, N-cadherin, and B-catenin (Fig. 5). In the B16 F10 melanoma model, the upregulation of N-cadherin, Vimentin, and B-catenin was observed in spheroids. In the RenCa model, B-catenin in spheroids was downregulated and N-cadherin could not be detected in any tested culture conditions (Fig. 5). Changes for vimentin expression in RCC models were not significant; however, tendencies were opposite to those observed in melanoma model (Fig. 5), confirming the distinct reactions uncovered by the 3D mode of culturing the two cancer cell types.

**3D spheroid formation as an alternative model to in vivo murine tumors** To assess for the significance of spheroid formation to mimic some tumor characteristics, we compared the levels of above tested markers in 3D models to in vivo tumors (transplantation of the same cells in syngeneic models), comparatively to standard monolayers type of culture in normoxia (2DN).

**3D cell culture models induce similar pattern of expression of cancer suppressor genes as in vivo growing tumors** Melanoma and RCC spheroids and their corresponding tumors showed similar levels of downregulation of *p53* expression as compared to monolayer cultured cells (Fig. 6). While, in the melanoma model, a similar downregulation pattern was observed for *mdm2* expression, this was not the case in the RCC model as *mdm2* expression was not significantly altered (although it tended to increase) (Fig. 6).

**3D cultures and in vivo tumors show a similar expression pattern of proteins/genes associated with hypoxia** Melanoma spheroids and tumors displayed a similar upregulation of *hif1α* and *vegfa* gene expression but the HIF-1α

protein increase in spheroids was not as strong as in tumors (Fig. 7A–C). A statistically significant downregulation of *vhl* was observed only for its transcripts in the tumor (Fig. 7A). On the other hand, there was no effect on the corresponding protein level in both the spheroid and tumor (Fig. 7B, C). For RCC, we observed that 3D and tumors show similar changes in expression as opposed to monolayers, but tendencies were opposite in the melanoma model: in both tumor and 3D, a downregulation of *hif1α*, *vhl*, and *vegfa* was observed (Fig. 7D–F). On the protein level, VHL increased in tumors only; in spheroid cultures, this upregulation did not reach statistical significance (Fig. 7E, F).

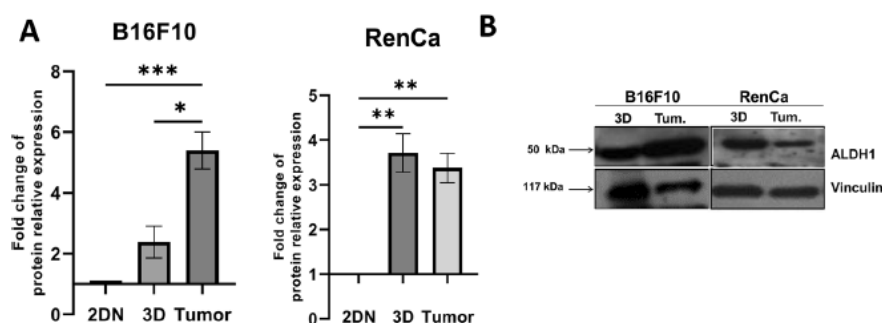
**RCC spheroids and tumors show a similar expression pattern of ALDH1- marker associated with stemness** Previously observed ALDH1 induction in renal cancer spheroids was also seen in tumors; ALDH1 protein level was increased similarly in 3D culture as compared to monolayer (Fig. 8). Also, melanoma tumors were characterized by a very high expression of this protein, although in this model, spheroid culture could not upregulate ALDH1 significantly (Fig. 8).

**Melanoma and RCC spheroids and tumors show a similar expression pattern of markers associated with EMT** Previously observed β-catenin induction in melanoma and downregulation in renal cancer spheroids were also observed in tumors (Fig. 9). The same tendencies for vimentin expression in 3D and the tumor were also observed for both models, where we observed upregulation of this protein in melanoma and its downregulation in the RCC model (Fig. 9).

## Discussion

To increase data validity and success rate of cancer research, it is necessary to handle parameters that mimic the most important features of the disease. Monolayer cell cultures provide useful and homogenous models; however, many studies showed that 3D culture models display features that are closer to in vivo tumor characteristics (Ravi *et al.* 2015; Klimkiewicz *et al.* 2017; Jensen and Teng 2020). The present work performed 3D cultures allowing comparative models to syngeneic in vivo tumors for renal cancer and melanoma cancer. This may result in reducing using animal models in future studies. We performed characterization of the proposed model in terms of response to hypoxia, CSC selection, and EMT induction. Importantly, we demonstrated the validity of the spheroid type of culture to reflect the mechanisms observed in tumors in vivo. By using melanoma and renal cancer models which are characterized with different mechanisms of carcinogenesis, we are confirming

**Figure 8** Comparison of ALDH1 expression in 3D and tumor (A, B). Expression of ALDH1 protein relatively to 2DN cultures; Vinculin served as a quantitative loading control (A). Western blots of ALDH1 detection (B). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA/Tukey test  $p < 0.05$ ,  $N \geq 3$ ; 3D,  $N \geq 3$  (2 biol.), tumors (2DN, control).

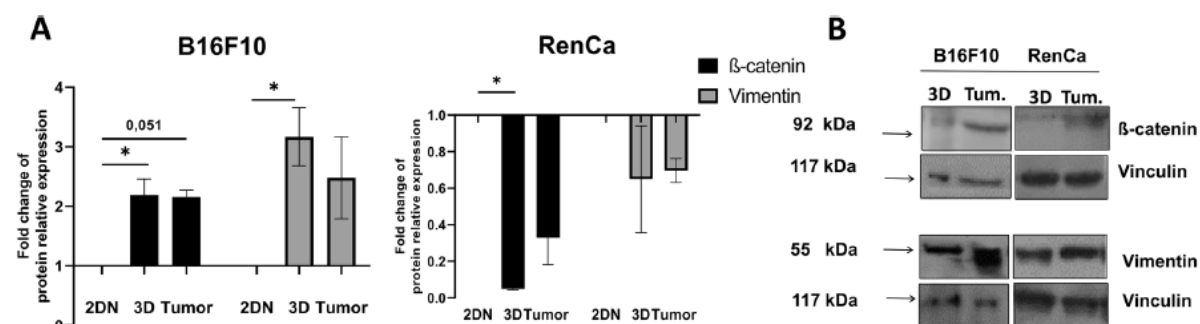


that proposed 3D culture might be universal for other cancer types. The designed method does not require any special equipment nor expensive laboratory consumables and pipetting was reduced to minimum. For spheroid formation of RCC (Matak *et al.* 2017) and pancreatic [48] models, methylcellulose and hanging drop methods were previously used; however, in both models, there was no evidence that their models provide sufficient material for further studies or drug screening. Moreover, RCC spheroids in the proposed model by Matak *et al.* (2017) were irregular. We exploited a 96-well format that can be easily used for cost- and time-effective drug screening which we previously reported (Filiipiak-Duliban *et al.* 2022). Our model also provides sufficient cellular material for molecular experiments (western blot, qPCR, or flow cytometry can be performed using 96 spheroids for each technique).

It was shown that the size of the sphere influences the cellular processes induced within. The dimensions of spheroids are usually correlated with seeding density (Singh *et al.* 2020); however, in our study, we point out also intrinsic features of used cells for the outcome of 3D culture. The study, although restricted to two murine cancer cell types to reduce the variability of spheroid formation, confirms the universality of the method. Indeed, the present modification of hanging drop method was efficiently inducing 3D

formation by both cell lines, despite the poor RenCa ability for sphere formation (Supplementary Fig. 1A, B) (Fig. 1C). RCC spheroids were significantly smaller than melanomas, although the initial cell number was the same for both cell lines. Such differences may result from different proliferation capacity or by intrinsic features of the cell lines, ECM production, or cell–cell adhesion molecule expression which can also impact sphere formation. Ability to form spheroids correlates with cancer stem-like cells characteristics of cell lines (Debeb *et al.* 2010; Y. Zhang *et al.* 2013). We showed that the melanoma cell line is initially characterized by higher levels of ALDH1 (protein/ALDH1 activity) and proportions of CD133-positive cells than RenCa cells (Fig. 3) which relate with the higher capacity of B16F10 cells to form spheroids.

Cells recovered from spheroids were less viable which is probably due to a necrotic core which is formed by size incrementation and nutrient deficiency, as observed by microscopy (Fig. 1E). This suggests that hypoxia develops in the center of the sphere (Riffle and Hegde 2017). Indeed, in the melanoma spheres, we observed upregulation of HIF-1 $\alpha$  (Semenza 2001), inducer of the main proangiogenic factor VEGF-A (Fig. 3A). For both cell lines, we observed differences between protein and gene expression patterns, especially for VHL. These differences may result from



**Figure 9** Comparisons of EMT marker expression in 3D and tumor (A, B). Expression of  $\beta$ -catenin and Vimentin proteins relative to 2DN cultures; Vinculin served as a quantitative loading control (A).

Vimentin and  $\beta$ -catenin detection by western blots (B). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA/Tukey test or Kruskal–Wallis/Dunn's test  $p < 0.05$ ,  $N \geq 3$  (2DN, control).

translational regulation or some differences between protein and mRNA half-lives (Nie *et al.* 2006). Despite that, these observations do not affect the main conclusion of these parts because difference values did not reach significance in both experiments. In the RCC 3D model, we observed downregulation of *hif1 $\alpha$* , *vhl*, and *vegfa* expression (not statistically significant), which suggests that hypoxic processes were not effectively induced probably because spheres were smaller (Fig. 3A, B). However, the same pattern of gene expression was observed in the subcutaneous tumor obtained in vivo (Fig. 7). This shows that 3D culture induces cell-specific mechanism, in addition to the physical parameters, which are occurring during the formation of spheroid architecture. This supports the conclusion that, in many aspects, spheroids are sufficient to model tumor physiology and present a valuable alternative model to in vivo syngeneic experiments.

Further characterization of RenCa spheroid model by NGS showed that among all DEGs (598 for 3D vs 2DN and 1899 for 3D vs 2DH) (Supplementary Fig. 2), *Epas1* (*Hif2 $\alpha$* ) transcript was upregulated (Fig. 3C). Studies using in vivo and in vitro models indicated that HIF-1 $\alpha$  acts as a tumor suppressor, whereas HIF-2 $\alpha$  has oncogenic potential (Schödel *et al.* 2016). Together with increased expression of HIF-2 $\alpha$ , the increase of *Mmp10*, *Mmp13*, and *Lox* expression was observed (Fig. 3C). These proteins are associated with cancer progression and metastasis in various types of tumors (Yamada *et al.* 2010; G. Zhang *et al.* 2014; Leo *et al.* 2018). Taken together, it may suggest that RCC spheroids contain aggressive, highly proliferative cell population(s). Indeed, RenCa spheroids were enriched in proliferating, G2/M cells (Fig. 2) and cancer stem-like cells (Fig. 4). However induction of EMT processes which are also linked with the metastasis process (Pastushenko and Blanpain 2019) was not observed in the RCC model. What is more, it has been shown that upregulation of *Hif2 $\alpha$*  downregulates the expression of *p53* oncogene (Bertout *et al.* 2009; Cho *et al.* 2016) which we also observed in both models.

In contrast, melanoma spheroids were characterized by a reduced percentage of proliferating cells (G2/M) with a simultaneous G0/G1 phase shift in the cell cycle, despite *p53* downregulation together with its regulator *mdm2* (Fig. 2). G0/G1 phase arrest also suggests the presence of quiescent cancer stem cells (Das *et al.* 2020); however, markers of the CSC phenotype, such as ALDH1 and CD133, were not induced in B16F10 spheroids (Fig. 4A, B, D) or were downregulated as CD105 (Saednejad Zanjani *et al.* 2018) (Fig. 4E). CD105 downregulation in these cells was shown to cause reduction of their proliferative capacity, and to promote spheroid compaction (Dolinsek *et al.* 2015). This may explain the cell cycle arrest in G0/G1 phase of cells in melanoma

spheres (Fig. 2A–D), and also sphere shape differences between both cell models (Fig. 1B, E). Although we do not observe any change in CSC marker expression in melanoma spheres, EMT markers were upregulated (Fig. 5). Consequently, the use of the 3D type of culture uncovered distinct molecular mechanisms set by the melanoma and the RCC cells to reach a higher aggressiveness. EMT process is induced by hypoxia in several types of cancer (Joseph *et al.* 2018); this may explain such differences—RenCa spheres in contrast to B16F10 were not hypoxic. Although RenCa spheroids are smaller and less hypoxic, their structure allowed a positive CSC selection and cell proliferation. Presence of CSCs is confirmed by upregulation of ALDH1 protein and ALDH2 in the NGS interaction network. Both these proteins belong to the nicotinamide adenine dinucleotide–phosphate (NAD(P))–dependent enzymes (Shortall *et al.* 2021). They are responsible for oxidation of aldehydes and differ from each other by the tissue distribution, cellular location, structure, and preferred substrates (Morgan and Hurley 2015). ALDH1 oxidizes retinaldehyde to retinoic acid, whereas ALDH2 is involved in the oxidation of acetaldehyde during ethanol metabolism (Morgan and Hurley 2015). Both enzymes were shown to be overexpressed in highly aggressive CSCs (Rao *et al.* 2020; H. Zhang and Fu 2021). B16F10, which already had higher levels of CSC (Fig. 4A), forms bigger and hypoxic spheres which possess EMT features. Our results correspond to what was shown previously, i.e., melanoma intratumor heterogeneity, do not rely on the CSC hypothesis, but rather on EMT features (Goding and Arnheiter 2019).

To validate the developed models for mimicking the most important features of cancer, we compared the levels of the above tested markers in 3D models with in vivo tumors. Melanoma and RCC spheroids showed a similar pattern of regulation of *p53* oncogene and its regulator—*mdm2* (Fig. 6), which may indicate similar proliferative capacities of tumors and spheres-derived cells (Tazawa *et al.* 2016). Hypoxia markers found in the melanoma spheroids were expressed at similar levels but for the HIF1 protein, for which the increase in spheroids was lower than that in the tumor (Fig. 7). This indicates that melanoma 3D culture is indeed able to mimic the features of tumor hypoxia. RCC spheres also show similar changes to those observed in the corresponding tumor, although these two cancer types were often oppositely modulating molecular pathways (Fig. 7). The 3D type of cultures clearly brings conditions that are much closer to syngeneic in vivo ones. Indeed, the induction of CSC in the RCC model was as efficient as in the tumor confirming the similarities between 3D and the tumor, in contrast to the melanoma where the CSC induction was lower than that in the tumor but in both cases the EMT processes were largely mimicked.

## Conclusion

We observed that 3D models can mimic features of the tumor such as hypoxia and CSC induction, adequately to the characteristics of corresponding in vivo tumor mass. Spheroid models of renal and melanoma cancers induce different mechanisms, related to the progression of cancer. The RCC model displayed induction of CSC characteristics, whereas melanoma spheres contributed to EMT-related mechanisms. Changes in cellular processes in these two cell lines in spheroids compared to those in the standard monolayer were not universal; however, they were reproduced in the in vivo subcutaneous model, proving the validity of spheroid cultures to model cancer physiology as an alternative to animal experiments, at least in the initial steps of research.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s11626-022-00685-8>.

**Funding** The research was funded by National Scientific Center grant no 2016/23/B/NZ1/03211. 3D culture optimization was performed within Military Institute of Medicine intramural grant no. 5/8958 (467). AF was supported by European Social Fund: POWER "Next generation sequencing technologies in biomedicine and personalized medicine." AF, KB, AM performed experiments and analyzed the data. CK developed conception of the research and work hypothesis. All the authors contributed to the writing of this manuscript.

All the experiments were conducted after obtaining approval for procedures from Second Warsaw Local Ethics Committee for Animal Experimentation (no. WAW2/76/2017) and following Directive 2010/63/EU regulations.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors declare no competing interests.

## References

- Abou Khouzam R, Brodaczevska K, Filipiak A, Zeinelabdin NA, Buart S, Szczylik C *et al* (2020) Tumor hypoxia regulates immune escape/invasion: influence on angiogenesis and potential impact of hypoxic biomarkers on cancer therapies. *Front Immunol* 11:613114. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.613114>
- Abourbih S, Sircar K, Tanguay S, Kassouf W, Aprikian A, Mansure J *et al* (2013) Aldehyde dehydrogenase 1 expression in primary and metastatic renal cell carcinoma: an immunohistochemistry study. *World J Surg Oncol* 11:298. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-11-298>
- Baciu DD, Dumitraşcu AM, Vasile V, Palade B, Sălăgeanu A (2022) Generation of a 3D melanoma model and visualization of doxorubicin uptake by fluorescence imaging. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. <https://doi.org/10.1007/s11626-021-00636-9>
- Bertout JA, Majmundar AJ, Gordan JD, Lam JC, Ditsworth D, Keith B *et al* (2009) HIF2 $\alpha$  inhibition promotes p53 pathway activity, tumor cell death, and radiation responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(34):14391–14396. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907357106>
- Besztercei B, Vancsik T, Benedek A, Major E, Thomas MJ, Schvarcz CA *et al* (2019) Stress-induced, p53-mediated tumor growth inhibition of melanoma by modulated electrohyperthermia in mouse models without major immunogenic effects. *Int J Mol Sci* 20(16). <https://doi.org/10.3390/ijms20164019>
- Bhatt H, Ghosh B, Biswas S (2020) Cell-penetrating peptide and  $\alpha$ -tocopherol-conjugated poly(amidoamine) dendrimers for improved delivery and anticancer activity of loaded paclitaxel. *ACS Appl Bio Mater* 3(5):3157–3169. <https://doi.org/10.1021/acsbm.0c00179>
- Bradley JR, Wang J, Pacey S, Warren AY, Pober JS, Al-Lamki RS (2020) Tumor necrosis factor receptor-2 signaling pathways promote survival of cancer stem-like CD133. *FASEB Bioadv* 2(2):126–144. <https://doi.org/10.1096/fba.2019-00071>
- Butturini E, Carcereri de Prati A, Boriero D, Mariotto S (2019) Tumor dormancy and interplay with hypoxic tumor microenvironment. *Int J Mol Sci* 20(17). <https://doi.org/10.3390/ijms20174305>
- Caglar HO, Biray Avcı C (2020) Alterations of cell cycle genes in cancer: unmasking the role of cancer stem cells. *Mol Biol Rep* 47(4):3065–3076. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05341-6>
- Carreau A, El Hafny-Rahbi B, Matejuk A, Grillon C, Kieda C (2011) Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med* 15(6):1239–1253. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x>
- Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, Hanahan D (2005) Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 8(4):299–309. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.09.005>
- Cheon DJ, Orsulic S (2011) Mouse models of cancer. *Annu Rev Pathol* 6:95–119. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.3.121806.154244>
- Cho H, Du X, Rizzi JP, Liberzon E, Chakraborty AA, Gao W *et al* (2016) On-target efficacy of a HIF-2 $\alpha$  antagonist in preclinical kidney cancer models. *Nature* 539(7627):107–111. <https://doi.org/10.1038/nature19795>
- Collet G, Skrzypek K, Grillon C, Matejuk A, El Hafny-Rahbi B, Lamerant-Fayel N *et al* (2012) Hypoxia control to normalize pathologic angiogenesis: potential role for endothelial precursor cells and miRNAs regulation. *Vasc Pharmacol* 56(5–6):252–261. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2012.03.001>
- Cowey CL, Rathmell WK (2009) VHL gene mutations in renal cell carcinoma: role as a biomarker of disease outcome and drug efficacy. *Curr Oncol Rep* 11(2):94–101. <https://doi.org/10.1007/s11912-009-0015-5>
- Das PK, Islam F, Lam AK (2020) The roles of cancer stem cells and therapy resistance in colorectal carcinoma. *Cells* 9(6). <https://doi.org/10.3390/cells9061392>
- Debeb BG, Zhang X, Krishnamurthy S, Gao H, Cohen E, Li L *et al* (2010) Characterizing cancer cells with cancer stem cell-like features in 293T human embryonic kidney cells. *Mol Cancer* 9:180. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-180>
- Dolinsek T, Sersa G, Prosen L, Bosnjak M, Stimac M, Razborssek U *et al* (2015) Electrotransfer of plasmid DNA encoding an anti-mouse endoglin (CD105) shRNA to B16 melanoma tumors with low and high metastatic potential results in pronounced anti-tumor effects. *Cancers (Basel)* 8(1). <https://doi.org/10.3390/cancers8010003>
- Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J *et al* (2017) Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology (Bethesda)* 32(4):266–277. <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>
- Elder DE, Bastian BC, Cree IA, Massi D, Scolyer RA (2020) The 2018 World Health Organization classification of cutaneous, mucosal, and uveal melanoma: detailed analysis of 9 distinct subtypes defined by their evolutionary pathway. *Arch Pathol Lab Med* 144(4):500–522. <https://doi.org/10.5858/arpa.2019-0561-RA>

- Filipiak-Duliban A, Brodaczevska K, Kajdasz A, Kieda C (2022) Spheroid culture differentially affects cancer cell sensitivity to drugs in melanoma and RCC models. *Int J Mol Sci* 23(3):1166
- Goding CR, Arnheiter H (2019) MITF—the first 25 years. *Genes Dev* 33(15–16):983–1007. <https://doi.org/10.1101/gad.324657.119>
- Hinshaw DC, Shevde LA (2019) The tumor microenvironment innately modulates cancer progression. *Cancer Res* 79(18):4557–4566. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3962>
- Hoarau-Véhot J, Rafii A, Touboul C, Pasquier J (2018) Halfway between 2D and animal models: are 3D cultures the ideal tool to study cancer-microenvironment interactions? *Int J Mol Sci* 19(1). <https://doi.org/10.3390/ijms19010181>
- Jensen C, Teng Y (2020) Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture? *Front Mol Biosci* 7:33. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00033>
- Joseph JP, Harishankar MK, Pillai AA, Devi A (2018) Hypoxia induced EMT: a review on the mechanism of tumor progression and metastasis in OSCC. *Oral Oncol* 80:23–32. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.03.004>
- Kiweler N, Wünsch D, Wirth M, Mahendrarajah N, Schneider G, Stauber RH *et al* (2020) Histone deacetylase inhibitors dysregulate DNA repair proteins and antagonize metastasis-associated processes. *J Cancer Res Clin Oncol* 146(2):343–356. <https://doi.org/10.1007/s00432-019-03118-4>
- Klimkiewicz K, Węglarczyk K, Collet G, Paprocka M, Guichard A, Sarna M *et al* (2017) A 3D model of tumour angiogenic micro-environment to monitor hypoxia effects on cell interactions and cancer stem cell selection. *Cancer Lett* 396:10–20. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.03.006>
- Leo C, Cotic C, Pomp V, Fink D, Varga Z (2018) Overexpression of Lox in triple-negative breast cancer. *Ann Diagn Pathol* 34:98–102. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2018.03.009>
- Matak D, Brodaczevska KK, Lipiec M, Szymanski Ł, Szczylik C, Czarnecka AM (2017) Colony, hanging drop, and methylcellulose three dimensional hypoxic growth optimization of renal cell carcinoma cell lines. *Cytotechnology* 69(4):565–578. <https://doi.org/10.1007/s10616-016-0063-2>
- Melissaridou S, Wiehce E, Magan M, Jain MV, Chung MK, Farnebo L *et al* (2019) The effect of 2D and 3D cell cultures on treatment response, EMT profile and stem cell features in head and neck cancer. *Cancer Cell Int* 19:16. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0733-1>
- Morgan CA, Hurley TD (2015) Characterization of two distinct structural classes of selective aldehyde dehydrogenase 1A1 inhibitors. *J Med Chem* 58(4):1964–1975. <https://doi.org/10.1021/jm501900s>
- Najafi M, Mortezaee K, Majidpoor J (2019) Cancer stem cell (CSC) resistance drivers. *Life Sci* 234:116781. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116781>
- Nie L, Wu G, Zhang W (2006) Correlation of mRNA expression and protein abundance affected by multiple sequence features related to translational efficiency in *Desulfovibrio vulgaris*: a quantitative analysis. *Genetics* 174(4):2229–2243. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.065862>
- Pan Y, Ma S, Cao K, Zhou S, Zhao A, Li M *et al* (2018) Therapeutic approaches targeting cancer stem cells. *J Cancer Res Ther* 14(7):1469–1475. [https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT\\_976\\_17](https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_976_17)
- Pastushenko I, Blanpain C (2019) EMT transition states during tumor progression and metastasis. *Trends Cell Biol* 29(3):212–226. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.12.001>
- Quail DF, Joyce JA (2013) Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 19(11):1423–1437. <https://doi.org/10.1038/nm.3394>
- Rao RS, Raju K, L., Augustine, D., & Patil, S. (2020) Prognostic significance of ALDH1, Bmi1, and OCT4 expression in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Cancer Control* 27(1):1073274820904959. <https://doi.org/10.1177/1073274820904959>
- Rathmell WK, Chen S (2008) VHL inactivation in renal cell carcinoma: implications for diagnosis, prognosis and treatment. *Expert Rev Anticancer Ther* 8(1):63–73. <https://doi.org/10.1586/14737140.8.1.63>
- Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FD (2015) 3D cell culture systems: advantages and applications. *J Cell Physiol* 230(1):16–26. <https://doi.org/10.1002/jcp.24683>
- Ribeiro Franco PI, Rodrigues AP, de Menezes LB, Pacheco Miguel M (2020) Tumor microenvironment components: allies of cancer progression. *Pathol Res Pract* 216(1):152729. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152729>
- Riffle S, Hegde RS (2017) Modeling tumor cell adaptations to hypoxia in multicellular tumor spheroids. *J Exp Clin Cancer Res* 36(1):102. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0570-9>
- Saeednejad Zanjani L, Madjd Z, Abolhasani M, Shariftabrizi A, Rasti A, Asgari M (2018) Expression of CD105 cancer stem cell marker in three subtypes of renal cell carcinoma. *Cancer Biomark* 21(4):821–837. <https://doi.org/10.3233/CBM-170755>
- Sakashita M, Tanaka T, Nangaku M (2019) Hypoxia-inducible factor-prolyl hydroxylase domain inhibitors to treat anemia in chronic kidney disease. *Contrib Nephrol* 198:112–123. <https://doi.org/10.1159/000496531>
- Schafer KA (1998) The cell cycle: a review. *Vet Pathol* 35(6):461–478. <https://doi.org/10.1177/030098589803500601>
- Schödel J, Gramp S, Maher ER, Moch H, Ratcliffe PJ, Russo P *et al* (2016) Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factors, and renal cancer. *Eur Urol* 69(4):646–657. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.08.007>
- Semenza GL (2001) HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol* 13(2):167–171
- Shi D, Che J, Yan Y, Peng B, Yao X, Guo C (2019) Expression and clinical value of CD105 in renal cell carcinoma based on data mining in The Cancer Genome Atlas. *Exp Ther Med* 17(6):4499–4505. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7493>
- Shortall K, Djeghader A, Magner E, Soulimane T (2021) Insights into aldehyde dehydrogenase enzymes: a structural perspective. *Front Mol Biosci* 8:659550. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.659550>
- Simbulan-Rosenthal CM, Dougherty R, Vakili S, Ferraro AM, Kuo LW, Alobaidi R *et al* (2019) CRISPR-Cas9 knockdown and induced expression of CD133 reveal essential roles in melanoma invasion and metastasis. *Cancers (Basel)* 11(10). <https://doi.org/10.3390/cancers11101490>
- Singh SK, Abbas S, Saxena AK, Tiwari S, Sharma LK, Tiwari M (2020) Critical role of three-dimensional tumorsphere size on experimental outcome. *Biotechniques* 69(5):333–338. <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0081>
- Tanabe S, Quader S, Cabral H, Ono R (2020) Interplay of EMT and CSC in cancer and the potential therapeutic strategies. *Front Pharmacol* 11:904. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00904>
- Taylor LA, Abraham RM, Tahirovic E, van Belle P, Li B, Huang L *et al* (2017) High ALDH1 expression correlates with better prognosis in tumorigenic malignant melanoma. *Mod Pathol* 30(5):634–639. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.226>
- Tazawa H, Kagawa S, Fujiwara T (2016) p53 replacement therapy for cancer. *Recent Results Cancer Res* 209:1–15. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-42934-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-42934-2_1)
- Verjans ET, Doijen J, Luyten W, Landuyt B, Schoofs L (2018) Three-dimensional cell culture models for anticancer drug screening: worth the effort? *J Cell Physiol* 233(4):2993–3003. <https://doi.org/10.1002/jcp.26052>

- Yamada T, Oshima T, Yoshihara K, Tamura S, Kanazawa A, Inagaki D *et al* (2010) Overexpression of MMP-13 gene in colorectal cancer with liver metastasis. *Anticancer Res* 30(7):2693–2699
- Zhang G, Miyake M, Lawton A, Goodison S, Rosser CJ (2014) Matrix metalloproteinase-10 promotes tumor progression through regulation of angiogenic and apoptotic pathways in cervical tumors. *BMC Cancer* 14:310. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-310>
- Zhang H, Fu L (2021) The role of ALDH2 in tumorigenesis and tumor progression: targeting ALDH2 as a potential cancer treatment. *Acta Pharm Sin B* 11(6):1400–1411. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.02.008>
- Zhang J, Zhang Q (2018) VHL and hypoxia signaling: beyond HIF in cancer. *Biomedicines* 6(1). <https://doi.org/10.3390/biomedicines6010035>
- Zhang Y, Sun B, Zhao X, Liu Z, Wang X, Yao X *et al* (2013) Clinical significances and prognostic value of cancer stem-like cells markers and vasculogenic mimicry in renal cell carcinoma. *J Surg Oncol* 108(6):414–419. <https://doi.org/10.1002/jso.23402>

## Supplementary materials

### Spheroid culture models adequately imitate distinctive features of the renal cancer or melanoma microenvironment

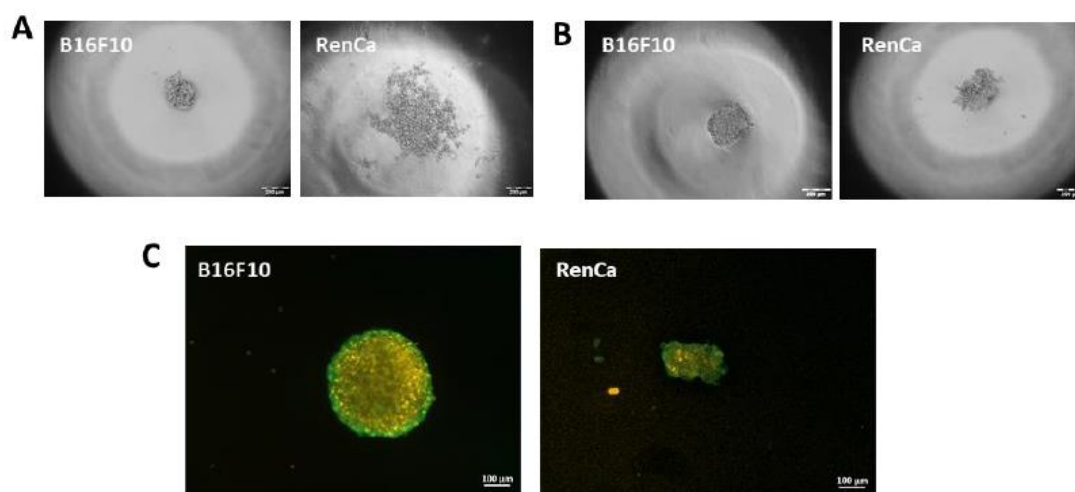
Filipiak-Duliban Aleksandra<sup>1,2</sup>, Brodaczewska Klaudia<sup>1</sup>, Majewska Aleksandra<sup>1,2</sup>,  
Kieda Claudine<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Military Institute of Medicine, Laboratory of Molecular Oncology and Innovative Therapies, Warsaw, Poland

<sup>2</sup> Postgraduate School of Molecular Medicine (Medical University of Warsaw), Warsaw, Poland

<sup>3</sup> Center for Molecular Biophysics UPR 4301 CNRS, 45071 Orleans, France

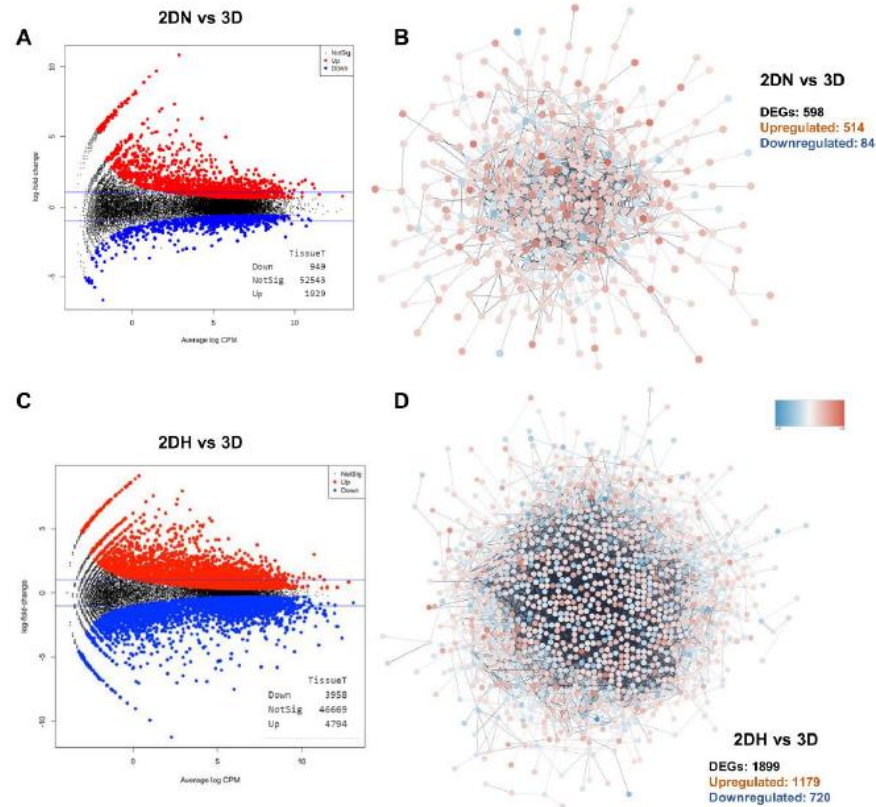
Correspondence: Aleksandra Filipiak: [afilipiak1@wim.mil.pl](mailto:afilipiak1@wim.mil.pl)



**Supplementary Figure 1** Optimization of spheroid culture model. **A-** cell aggregates after 3 days of culture using standard hanging drop method without methylcellulose. **B-** cell aggregates after 3 days culture using standard hanging drop method with methylcellulose **C-** spheroids cultured in hypoxic condition stained by propidium iodide (orange - dead cells) and calcein (green - live cells), which show the positions of live and dead cells in the spheres.



*The Transcriptome Analysis of RCC spheroid cultures compared with monolayer cultures.*



**Supplementary Figure 2.** Differences in the transcriptome profiles of RCC 3D culture compared with two-dimensional cultures in normoxia and hypoxia. **A, C**- Volcano plot of differentially expressed genes of 3D cultures compared with monolayers cultures determined by Next Generation Sequencing. **B, D** – Protein-protein interaction scaffold networks determined by Next Generation Sequencing ( $q$ -value < 0.05 and  $|\log_2 FC| > 1,5$ )

To evidence differences between spheroid and monolayer cultures and point to the importance of the environmental conditions during the cell culture (such as hypoxia, CSCs selection and EMT), transcriptome analyzes of RCC in 3D and 2D cultures was performed. Indeed, analyzes revealed significantly up-regulated and down-regulated genes as shown in the Fig. 2 A, C. In comparison of 3D vs 2DN, 1929 genes were up-regulated and 924 were down-regulated (Fig. 2 A). In comparison of 3D vs 2DH, 4794 genes were upregulated and 3958 were down-regulated (Fig. 2 C). Among all of them we chose 598 deregulated genes (DEGs) for 3D vs 2DN comparison and 1899 DEGs were chosen for 3D vs 2DH comparison with  $\log_2 FC > \pm 1.5$  and  $q FDR < 0.001$ . NGS results were previously validated (Filipiak-Duliban et al., 2022)

- 
2. **Spheroid Culture Differentially Affects Cancer Cell Sensitivity to Drugs in Melanoma and RCC Models**; Filipiak-Duliban A, Brodaczewska K, Kajdasz A, Kieda C.; Int J Mol Sci. 2022 Jan 21;23(3):1166. doi: 10.3390/ijms23031166. PMID: 35163092; PMCID: PMC8835769. – artykuł ten przedstawia walidację opracowanego modelu pod względem testowania chemioterapeutyków oraz analizę przypuszczalnych mechanizmów odpowiadających za lekooporność nowotworów – drugie założenie pracy.



Article

# Spheroid Culture Differentially Affects Cancer Cell Sensitivity to Drugs in Melanoma and RCC Models

Aleksandra Filipiak-Duliban <sup>1,2,\*</sup> , Klaudia Brodaczevska <sup>1</sup> , Arkadiusz Kajdasz <sup>3,4</sup> and Claudine Kieda <sup>5</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Molecular Oncology and Innovative Therapies, Military Institute of Medicine, 04-141 Warsaw, Poland; kbrodaczewska@wim.mil.pl

<sup>2</sup> Postgraduate School of Molecular Medicine, Medical University of Warsaw, 02-091 Warsaw, Poland

<sup>3</sup> Department of RNA Metabolism, Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznan, Poland; akajdasz@ibch.poznan.pl

<sup>4</sup> Laboratory of Human Molecular Genetics, Faculty of Biology, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Adam Mickiewicz University Poznan, 61-614 Poznan, Poland

<sup>5</sup> Center for Molecular Biophysics UPR 4301 CNRS, CEDEX 2, 45071 Orleans, France; ckieda@wim.mil.pl

\* Correspondence: afilepiak1@wim.mil.pl

**Abstract:** 2D culture as a model for drug testing often turns to be clinically futile. Therefore, 3D cultures (3Ds) show potential to better model responses to drugs observed in vivo. In preliminary studies, using melanoma (B16F10) and renal (RenCa) cancer, we confirmed that 3Ds better mimics the tumor microenvironment. Here, we evaluated how the proposed 3D mode of culture affects tumor cell susceptibility to anti-cancer drugs, which have distinct mechanisms of action (everolimus, doxorubicin, cisplatin). Melanoma spheroids showed higher resistance to all used drugs, as compared to 2D. In an RCC model, such modulation was only observed for doxorubicin treatment. As drug distribution was not affected by the 3D shape, we assessed the expression of MDR1 and mTor. Upregulation of MDR1 in RCC spheroids was observed, in contrast to melanoma. In both models, mTor expression was not affected by the 3D cultures. By NGS, 10 genes related with metabolism of xenobiotics by cytochrome p450 were deregulated in renal cancer spheroids; 9 of them were later confirmed in the melanoma model. The differences between 3D models and classical 2D cultures point to the potential to uncover new non-canonical mechanisms to explain drug resistance set by the tumor in its microenvironment.

**Keywords:** RCC; glutathione-s-transferases; 3D; spheroids; melanoma; drug-resistance; doxorubicin; cisplatin; everolimus; cytochrome



**Citation:** Filipiak-Duliban, A.; Brodaczevska, K.; Kajdasz, A.; Kieda, C. Spheroid Culture Differentially Affects Cancer Cell Sensitivity to Drugs in Melanoma and RCC Models. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1166. <https://doi.org/10.3390/ijms23031166>

Academic Editor: Isotta Chimenti

Received: 8 December 2021

Accepted: 18 January 2022

Published: 21 January 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

One of the limiting factors to achieve cures for cancer and other diseases is drug resistance. This phenomenon is well known, universal, and its development is almost inevitable [1,2]. Some of the tumors are characterized by primary drug resistance, while others become unresponsive to treatment during chemotherapy [3]. There are multiple mechanisms underlying cancer unresponsiveness and/or resistance to treatment, reviewed elsewhere [4]. Briefly, they include changes in the drug target (receptor or pathway expression or mutation) [5], induction of metabolism or efflux of drugs [6], interruption of cell death and activation of survival mechanisms [7], and reprogramming the tumor microenvironment to promote tumor growth [8]. One of the most frequent causes of cancer cell resistance is mediated by multi drug resistance (MDR). It occurs when cancer cells gain resistance to drugs that are functionally and structurally unassociated to those to which they were previously exposed [3]. A key role played by MDR is the increased activity of drug efflux pumps. This is typically the effect of the ATP-binding cassette (ABC B1/MDR1) [3,9]. This plasma membrane glycoprotein is often overexpressed in cancers which do not respond to chemotherapy [3,10]. Other important mechanisms involve the modulation of

apoptosis/autophagy, miRNA regulation, and DNA damage and repair among epigenetic regulations [3]. In the development of MDR are the non-cellular components of tumor microenvironment (TME), among which are the extracellular matrix, pH, oxygenation, soluble factors (cytokines), and vascular-endothelial growth factor (VEGF) [6]. The estimation of MDRs activity during the course of treatment as well as for the prevision of the treatment efficacy are often based on the potential a drug has to avoid the induction of resistance. A classic example is provided by daunorubicin which is often excluded of the highly aggressive cancer stem cells (CSC) [3,9–11]. Induction of those and other mechanisms reduces the efficacy of both chemotherapeutics and targeted therapy and inevitably leads to cancer resistance and progression.

In this line, the activity of a chemotherapeutic molecule is traditionally evaluated using the common two-dimensional cell cultures, which are far from reproducing the conditions of the original tumor microenvironment. For this reason, many drugs evaluated using such models proved to be clinically ineffective [12]. In our preliminary studies, we proposed 3D model conditions for the culture of renal (RenCa) and melanoma (B16F10) cancer cells. By comparing the 3D cultures with *in vivo* obtained tumors, we showed that spheroids better mimic the *in vivo* tumor characteristics than 2D cultures (“Spheroid culture models imitating the tumor microenvironment of renal and melanoma cancer”, submitted).

Application of 3D culture model, as a way to reconstitute *in vitro* some aspects of TME, is now widely discussed as a proper model for preliminary research in tumor biology [13]. As an increasing number of therapeutic strategies focus on non-cancer components of TME (such as immune cells, stromal cells, hypoxia), which shape the progression of the disease, new tools are being developed to enable modeling more accurately the responses of tumor and the host [14,15]. They include the incorporation into spheroid culture non-cellular components, such as ECM proteins [16], but also the creation of much more complicated models containing stromal cells, such as fibroblasts [17], endothelial cells [18], or even immune cells [19,20]. All these elements highly influence spheroid, hence potentially a tumor, response to treatment [21]. 3D/spheroid culture is a well developing area of oncology and various techniques are being developed [22]. Yet, this abundance of 3D culture methods and protocols causes a lot of confusion as to which to choose in a particular study, taking into consideration not only the modeled tumor, but also technical resources of a particular research group. Nonetheless, the superiority of organoid cultures over standard monolayers [23], encourages to test numerous variants of 3D cultures as tools to study molecular and cellular mechanisms that determine the progression of cancer. This might account for a higher accuracy of selection of drugs that pass into clinical trials and the more rapid development of personalized medicine [24].

The aim of the current study was to evaluate how the proposed, simple, 3D culture conditions affect the tumor cell susceptibility to anti-cancer drugs. We used several commonly applied chemotherapeutics which are differing in their mechanism of action, such as everolimus which binds to intracellular, FKBP-12 forming an inhibitory complex with mTOR complex 1 (mTORC1), thus inhibiting mTOR kinase activity and consequently works ultimately as an inhibitor of the PI3K/AKT/mTOR pathway [25]; cisplatin—platinum-based drug which affects proliferation and apoptosis by cross-linking the DNA bases [26]; doxorubicin—which increases death of cells by intercalation into the DNA and inhibition of topoisomerase II modifying the chromatin structure, as well as by generation of free radicals and oxidative damage to biomolecules [27]. We observed that despite the induction of a similar set of drug resistance-related genes in two distinct cancer models upon culture conditioning, the susceptibility to cytotoxic agents was not directly correlated, showing the engagement of new pathways that could be uncovered using the proposed 3D models.

## 2. Results

### 2.1. Spheroid Formation

As in B16F10, seeding density does not have a high influence on spheroid shape (data not shown), in the RenCa model, low or to high number of cells affected cell viability

or shape, respectively (Supplementary Figure S1). In order to obtain regular spheroids with a diameter higher or equal to 400  $\mu\text{M}$ , the seeding density was optimized to 500 of cells/drop and a cultivation time of up to 7 days for both cell lines. After three days of culture, irregular aggregates were observed, and regular spheroids were observed after seven days of cultures in both cell lines (Figure 1).

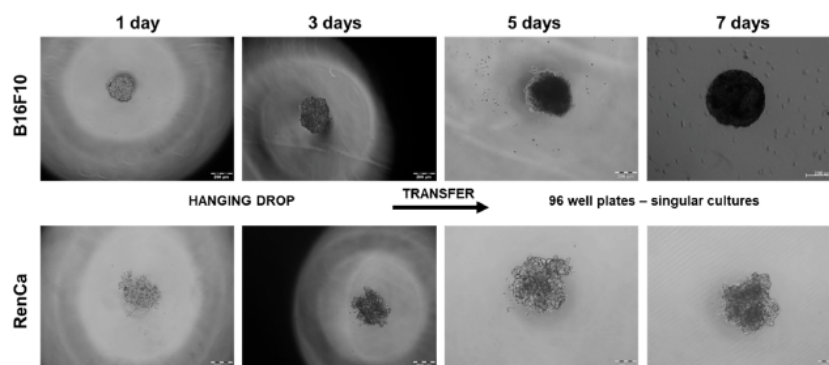


Figure 1. Spheroid formation for 7 days. B16F10 and RenCa cell lines were seeded 500 of cells per drop in RPMI medium supplemented with methylcellulose; 3 days after cultivation in hanging drops, cell aggregates were transferred in agarose coated 96-well plates, and cultivated for another 4 days.

### 2.2. 3D Cultures Show Different Sensitivity to Chemotherapy

To assess if 3D cultures will affect drug sensitivity, we evaluated cell viability (using alamarBlue assay) after exposure to commonly used drugs, such as everolimus, doxorubicin, and cisplatin. In the melanoma cancer model, spheroids showed higher resistance to everolimus; in 2D cultures, the  $\text{IC}_{50}$  value was 9.39  $\mu\text{M}$  and in 3D cultures, it reached 22.96  $\mu\text{M}$  (Figure 2A). In the renal cancer model, no significant differences between monolayer ( $\text{IC}_{50}$  21.62) and 3D culture ( $\text{IC}_{50}$  19.57) were observed for these drugs (Figure 2B). These results were confirmed by staining drug treated cells with propidium iodide showing that incorporation into the DNA concerned a higher proportion of B16F10 cells when cultured in 2D than in spheroids (Supplementary Figure S2). B16F10 spheroid cultures were also less sensitive to cisplatin and doxorubicin as  $\text{IC}_{50}$  levels were higher than in 2D cultures for Cisplatin: 3D, 20.82  $\mu\text{M}$ ; 2D 3.316  $\mu\text{M}$ , and to lesser extent for Doxorubicin: 3D, 1.778  $\mu\text{M}$ ; 2D, 0.0011  $\mu\text{M}$  (Figure 2A). In the renal cancer model, an altered sensitivity was observed to doxorubicin only;  $\text{IC}_{50}$  levels for that model were higher for spheroids: 3D, 0.206  $\mu\text{M}$ ; 2D, 0.015  $\mu\text{M}$  (Figure 2B).

### 2.3. Distribution of the Drug Is Not Affected by Sphere Shape

As a higher resistance to all tested drugs was observed in 3D melanoma cultures than in 2D, we assessed whether these differences result from the conditions applied by its spheroidic architecture altering the drug distribution. Doxorubicin is a fluorescent molecule (0.001  $\mu\text{M}$ ), its distribution was thus estimated (Figure 3A,B), by assessing fluorescence intensity at different points in the spheres after incubation of the spheres with drug for 48 h. In the renal model, no significant change was observed as the fluorescent signal was homogenous throughout the sphere. In the melanoma model, several peaks were distinguishable along the fluorescence signal histogram, indicating drug accumulation. The drug penetrated the whole mass of the 3D structure, including its core (Figure 3A,B).

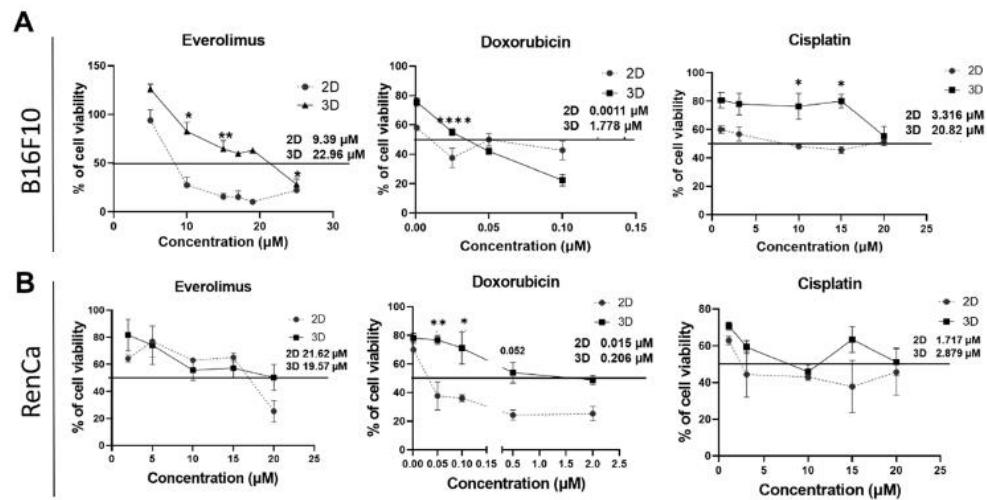


Figure 2. Sensitivity of cells in 2D and 3D culture. (A)—sensitivity to everolimus, doxorubicin, and cisplatin of B16F10 cell line in 2D and 3D culture conditions as assessed by the use of the alamarBlue method. (B)—sensitivity to everolimus, doxorubicin, and cisplatin of RenCa cell lines in 2D and 3D cultures assessed using alamarBlue method. Statistical analysis was performed by One-Way ANOVA/Tukey test or Kruskal–Wallis/Dunn’s test—\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.0021$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ,  $N \geq 3$  (2D—control).

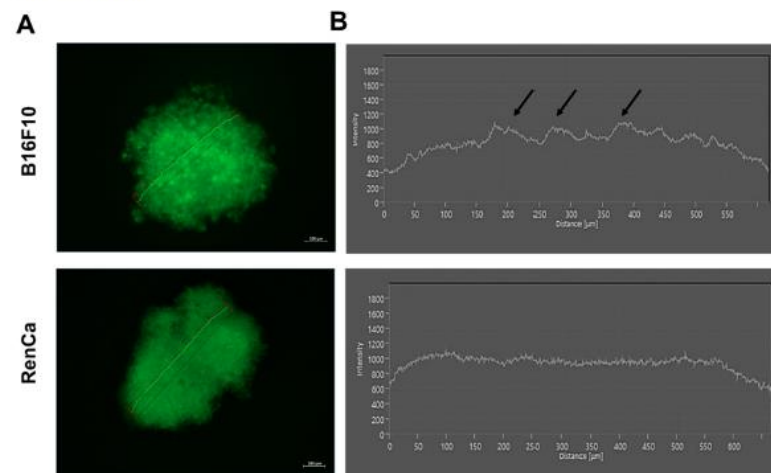


Figure 3. Drug distribution in the spheres. Immunofluorescent picture of doxorubicin (0.001 µM) treated melanoma and renal cancer spheres after 48 h treatment—(A). Histograms representing drug distribution in the cross-section of the sphere of melanoma and renal cancer model—(B).

#### 2.4. 3D Culture Conditions Can Affect MDR1 Expression Differently in RCC and Melanoma, but Have No Effect on mTor Expression

Drug resistance is often due to MDR1, a glycoprotein which is widely expressed in cancer cells, ensuring exportation of the drugs out of the cells [28]. We assessed if differences in the sensitivity to drugs might be related to MDR1 expression. In the B16F10 model, the MDR1 protein bands were visible only for 2D cultures, while no expression of MDR1 was detected in 3D culture lysates. Oppositely, in the RenCa model, no MDR1 protein was detected in 2D, but it was induced by spheroid culture (Figure 4A,C). To assess for the role of MDR1 for cell viability, we assessed the cell sensitivity to Tariquidar which

is an MDR1 inhibitor [29]. Viability of B16F10 cells in both culture conditions was not affected; both in MDR1-expressing 2D and MDR1-negative 3D cells (Figure 4E). In the case of the renal cancer cells model, the 3D cultures were more sensitive to Tariquidar than 2D cultures (Figure 4E)—the  $IC_{50}$  levels for 3D was 25  $\mu$ M, while for 2D, the  $IC_{50}$  was 150  $\mu$ M. These results were confirmed by staining drug treated cells with propidium iodide. More dead RenCa cells were observed after exposure to Tariquidar in 3D culture models (Supplementary Figure S2). The mammalian target of rapamycin (mTor) is an important regulator of proliferation, differentiation, apoptosis, and tumorigenesis [30]. mTor is very strongly associated with tumor malignancy in melanoma and renal cancer [31,32]. Consequently, we assessed if the modulation of mTor protein and its gene expression in 2D and 3D cultures for both cancer models might explain the differences in the response to everolimus. In the melanoma model, no significant change for both protein and gene expression was observed between the culture conditions (Figure 4B–D). In the renal cancer model, a downregulation of gene expression was observed in 3D cultures, but this effect was not maintained at the level of protein (Figure 4B–D).

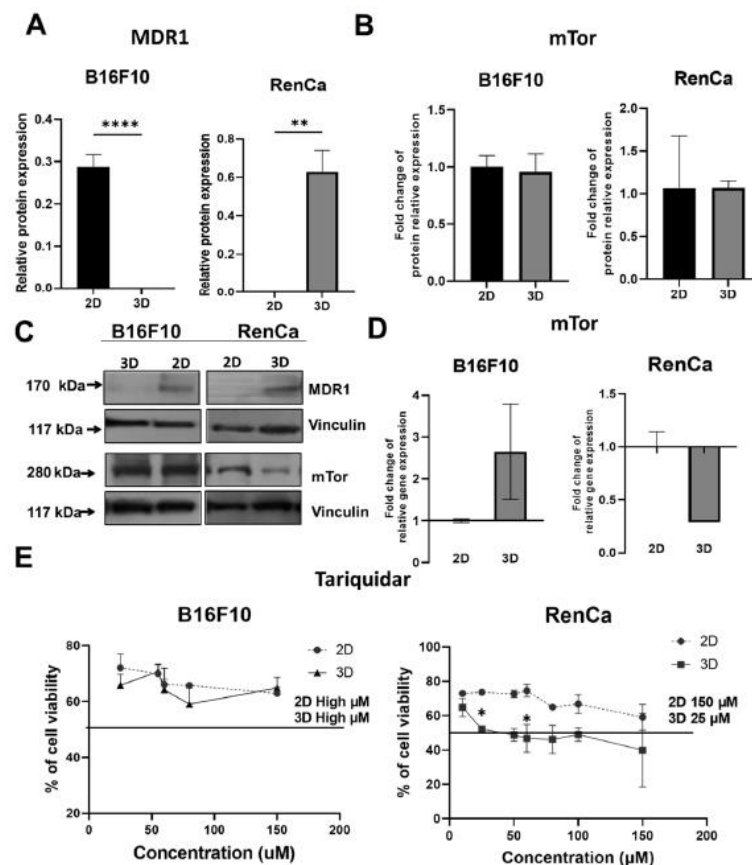


Figure 4. Regulation of MDR1 and mTor expression. (A)—Relative to 2D protein expression of MDR1 of melanoma and renal cancer cells, Vinculin served as loading control. (B)—Relative to 2D protein expression of mTor of melanoma and renal cancer cells, Vinculin served as loading control. (C)—Detection of MDR1 and mTor by western blot. (D)—The gene expression of *mtor* was determined by quantitative RT-PCR (qRT-PCR);  $\beta$ -actin served as an internal control. (E)—Sensitivity to tariquidar in various concentrations estimated by Alamar blue assay—(D). Statistical analyses were performed by One-Way NOVA/Tukey test or Kruskal–Wallis/ Dunn’s test—\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.0021$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ,  $N \geq 3$  (2D—control).

### 2.5. 3D Cultures Modulate Drug Resistance Genes

Next-generation sequencing (NGS) of 2D and 3D cultures from renal cancer model was performed to screen for other potential drug resistance modulators (Figure 5). Among all 263 (data not shown) deregulated genes in the 3D model, 10 genes related with metabolism of xenobiotics by cytochrome p450 were changed: downregulated—*Cyp2s1* and upregulated—*Cyp2f2*, *Gstm6*, *Gsto2*, *Gsta4*, *Hpgds*, *Gsta1*, *Gsta2*, *Gstm7*, *Aldh31a*. 10 related with drug metabolism were also found (Figure 5): upregulated—*Aox3*, *Fmo5*, the remaining genes modulated in this pathway were included in the above “metabolism of xenobiotics by cytochrome p450 pathway” (Figure 5B–E). We validated those results and assessed if similar responses will be observed in melanoma model using qRT-PCR method (Figure 5). In both models, similar tendencies as observed in NGS data, were for: *Cyp2f2*, *Gstm6*, *Gsto2*, *Gsta4*, *Hpgds*, *Gsta1*, *Gsta2*, *Gstm7*, *Aldh31a* genes (Figure 5). In contrast to renal cancer model, no expression of *Cyp2s1* could be detected in the melanoma cells, in both culture conditions (Figure 5).

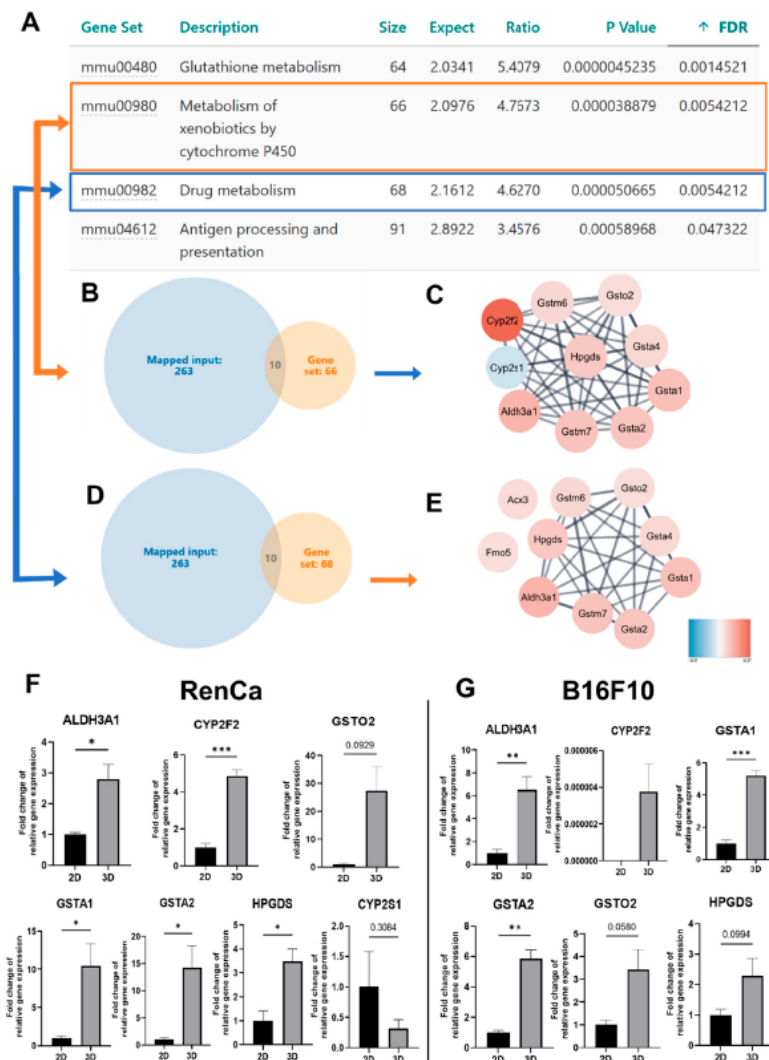


Figure 5. Modulation of drug related genes by 3D cultures. (A)—Enrichment analysis based on Gene Ontology pathway shows the top 4 activated processes in both cell types (web-based gene set analysis



toolkit enrichment method: ORA; organism: *mus musculus*). (B)—screening of genes related with metabolism of xenobiotics. (D)—screening of genes related with metabolism of drugs. (C,E)—Functional enrichment protein network performed in Cytoscape software (v.3.8.0). (F)—The gene expression of *Cyp2s1*, *Cyp2f2*, *Gstm6*, *Gsto2*, *Gsta4*, *Hpgds*, *Gsta1*, *Gsta2*, *Gstm7*, *Aldh31a* for RenCa cells was determined by quantitative RT-PCR (qRT-PCR);  $\beta$ -actin served as a quantitative internal control. (G)—The gene expression of *Cyp2s1*, *Cyp2f2*, *Gstm6*, *Gsto2*, *Gsta4*, *Hpgds*, *Gsta1*, *Gsta2*, *Gstm7*, *Aldh31a* for B16F10 cells was determined by quantitative RT-PCR (qRT-PCR);  $\beta$ -actin served as a quantitative internal control. Statistical analysis was performed by One-Way ANOVA/Tukey test or Kruskal–Wallis/ Dunn’s test—\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.0021$ , \*\*\*  $p < 0.0002$ ,  $N \geq 3$  (2D—control).

### 3. Discussion

In separate studies, we showed that our proposed 3D cultures better mimic the in vivo tumor characteristic (“Spheroid culture models imitating the tumor microenvironment of renal and melanoma cancer”, submitted). This suggested that the model could be used as a tool in pre-clinical studies instead of mouse models for drug screening. Here, we assessed how 3D cultures will respond to chemotherapy treatment compared to standard monolayer cultures, as higher drug resistance to drugs were already observed for spheroid cultures in other cancer models [11].

Using drugs commonly used in cancer treatment such as everolimus, cisplatin, and doxorubicin [32–34], we assessed various cell responses by calculating  $IC_{50}$  values for 3D and 2D cultures.  $IC_{50}$  values obtained in vitro are different depending on a cell line (e.g., Cisplatin  $IC_{50}$  for human cell lines can range from 3.3 to 58  $\mu M$  [35] and similar values were calculated in our study) and are often clinically relevant (eg. Cisplatin blood concentrations vary from 0.6–12  $\mu M$ ) [36,37]. Comparison of  $IC_{50}$  values showed that 3D cultures from melanoma model show higher resistance to some of used drugs (Figure 2A). 3D increased the  $IC_{50}$  value for everolimus 2.5 times, while for cisplatin, the change was over 6 fold, reaching 20  $\mu M$ , which is similar to induced resistance by long term in vitro exposure to cisplatin in other models [38]. For doxorubicin, we did not observed such a strong effect (Figure 2A). However, in the renal cancer 3D model, tendencies were opposite; higher resistance only for doxorubicin was observed (Figure 2B). In monolayers, the cells seemed to be very sensitive to this drug with low  $IC_{50}$  compared to other cell lines [39]. Nonetheless, we used doxorubicin only as molecule to model drug responses, as it is not an established treatment in RCC [40]; therefore, we do not conclude about its therapeutic potential. However, we could evidence that 3D culture evidently modulated cell response to doxorubicin. For everolimus and cisplatin, no significant differences were shown in the RCC model. Studies have shown that spheroid three-dimensional shape may affect drug penetration and these phenomena may explain the higher resistance to chemotherapy treatment [41]. However, after staining the cells using doxorubicin at low, poorly toxic concentration, we measured the drug distribution and in both models, it was quite even. In the 3D melanoma model, several peaks were observed which may actually suggest accumulation of the drug, although it did not affect cell susceptibility to this drug. These results suggest that higher resistance to doxorubicin in the RCC model results from activation of particular cellular mechanisms rather than limited drug distribution and cell exposure. This might be the case also for altered sensitivity to cisplatin and everolimus in melanoma, although, due to differences in chemical structure, doxorubicin cannot equally model penetration of those drugs with certainty. Therefore, we screened for typical drug resistance mechanisms that could be variably induced in the two models.

ABC transporters such as P-glycoprotein (P-gp/MDR1/ABCB1) have an important role in the drugs’ extrusion from the cells [29]. Over expression is often observed in cancer cells, and this phenomenon can be a cause of failure of anticancer drug therapy [42]. Expression of MDR1 is often upregulated in 3D cultures in cancer cells [42–44]. We observed such a phenomenon in renal cancer model in contrast to melanoma, where MDR1 was expressed only in 2D cultures and was not detected in cells from 3Ds (Figure 4A,C). Upregulation of MDR1 in renal cancer spheroids suggests that they should be more resistant

to chemotherapy; however, we observed higher resistance to doxorubicin only (Figure 2B). Absence of MDR1 in melanoma 3Ds might partly explain the drug accumulation observed microscopically after doxorubicin treatment (Figure 3A,B). We assessed using tariquidar if the inhibition of MDR1 affects cell viability (Figure 4E). Spheroids from renal cancer, in which upregulation of MDR1 was observed, were more sensitive to tariquidar, while 2D cultures seemed not to be affected (Figure 4E). These results suggest that, in the 3D structures, MDR1 protein is important for cell survival, although it does not universally predict resistance to chemotherapeutics, as cisplatin sensitivity was not altered and it can be reduced by MDR activation in other models [45,46]. In our preliminary studies, we showed that 3D cultures of RenCa cells show a larger population of Cancer stem cells CSC ("Spheroid culture models imitating the tumor microenvironment of renal and melanoma cancer", in review). As CSCs are an important mediators of cancer resistance [47], a tool allowing to model their activity in vitro is of big importance CSCs were characterized by upregulation of ABCB transporters such as MDR1 [11,48] and the presence of cancer stem cells correlates with ability of forming spheroids [49,50]. Despite the presence of MDR1 protein in 2D cultures in melanoma, cancer cells in both culture conditions were not affected by tariquidar treatment (Figure 4C).

To verify if everolimus sensitivity is modulated by the alteration the drug target expression in 3D culture, we examined mTOR levels in monolayer and spheroid cultured cells. The mammalian target of rapamycin (mTOR) plays important roles in controlling cell behavior, as it takes part in cell proliferation, survival, invasion, and angiogenesis [32,51]. mTor is often mutated in cancer cells, among which melanoma and renal cancer [32,51]. Everolimus is commonly used drug which targets mTor [32]. As increased resistance of B16F10 3D to everolimus could not be explained by induction of MDR1 nor potentially altered drug distribution, we assessed the level of drug target, mTor, in both culture conditions. In both models, the protein expression of mTor was not affected by 3D culture. In renal cancer, we observed the down regulation of *mTor* gene expression. Therefore, the level of mTor could not predict the susceptibility to everolimus. However, it was not proved that mTOR level correlates with cell sensitivity to its inhibitors; therefore, experimental confirmation of cancer cell response to drugs might be needed to predict patient outcome in case of mTor inhibitors.

As none of the standard drug resistance mechanisms could explain distinct susceptibility of 3D models, NGS was performed to screen for other potential drug resistance modulators (Figure 5). In renal cancer spheroids, 10 genes related with metabolism of xenobiotics by cytochrome p450 were identified, and similar regulation of 9 of those genes were later confirmed in melanoma model (Figure 5). Cytochromes P450 (CYPs) and the glutathione-S transferases (GST) are important regulators of drug resistance. CYPs as well as GST known as phase I and phase II detoxification enzymes, respectively, and are capable of catalyzing the oxidative biotransformation of most drugs and other lipophilic xenobiotics [52–54]. Glutathione-S transferases can cooperate with ABCB transporters such as MDR1 to confer resistance to the cyto- and genotoxicities of some anticancer drugs and carcinogens [55]. In the renal cancer model, we observed an upregulation of MDR1 in 3D cultures, but they were equally sensitive to the doxorubicin treatment in monolayer. The mechanisms of xenobiotic detoxification are crucial elements for cell exclusion processes of several drugs, carcinogens, and other toxins [52,56]. It was shown that antioxidants such as Piper betel leaves inhibit GST isoforms, which in turn enhances the sensitivity of cancer cells to cisplatin [57]. These findings suggest that targeting cytochrome p450 component's during cancer therapy may increase drug efficacy. However, as cytochrome p450 pathway was equally induced in both models, we could not explain which mechanism mediates the differential resistance of 3D models to doxorubicin or cisplatin and everolimus.

Other authors [58] reported that seemingly similar 3D spheroids show differential susceptibility to drugs that cannot be explained by molecular or metabolically variables. Rather, particular features of cells (or later, patients) determine treatment outcome. This points to the fact that when no molecular predictive factors for chemotherapeutics choice

are available, experimental drug screening on patient-derived cells should be used as a personalized medicine approach [59]. Our model constitutes an accessible, economical tool that could be used for such purpose. It does not require sophisticated techniques nor equipment, making it feasible in many, non-specialized healthcare institutions.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Cell Lines

The tests were carried out with murine melanoma B16-F10 (given by Prof. J. Dulak, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University, Cracow, Poland; authenticated in 2021, ATCC) and renal carcinoma RenCa (CRL-2947™, ATCC, Manassas, VA, USA) cell lines. Cells were maintained in standard culture conditions: humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C, using RPMI medium—RPMI-1640 GlutaMax™ (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), with 10% FBS (*v/v*) (ThermoFisher Scientific). Cells were passaged using Accutase solution (Biolegend, San Diego, CA, USA) after confluence reached 70–80%. Cells used were Mycoplasma free as assayed with PCR Mycoplasma Test (Biomedica, Piaseczno, Mazowieckie, Poland) and did not exceed 15th passage.

### 4.2. Two-Dimensional Cell Culture and Spheroid Formation

Two-dimensional cultures were maintained under standard culture conditions (5% CO<sub>2</sub>, 21% pO<sub>2</sub>). RenCa 6600 cells/cm<sup>2</sup>, B16F10 3300 cells/cm<sup>2</sup>, were seeded and cultivated for 5 days. For obtaining spheroids 500 cells were resuspended in 20 µL medium supplemented with 0.25% methylcellulose (*v/v* in medium), (Minneapolis, MA, USA) and seeded as a single hanging drop, on the cover of culture plate. Drops were kept in standard culture conditions (5% CO<sub>2</sub>, 21% pO<sub>2</sub>) for 72 h. After that time, the drops were individually transferred to a 96-well plate. The plates were previously covered with 1% agarose dissolved in double distilled water (*w/v*, VWR, Warsaw, Belgium). Cells aggregates expanded for another four-day period.

### 4.3. Western Blot

After harvesting the two-dimensional cell cultures and spheroids, the cells were PBS-washed. The cell suspensions were lysed by RIPA lysis buffer including proteases and phosphatases inhibitors (both from ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, USA). Lysates were centrifugated to remove insoluble material (14,000 × *g* for 10 min at 4 °C). Separation of equal amount of total proteins was performed using SDS polyacrylamide gels for 45 min at a constant 200 V using a Bio-Rad Minigel System. Separated proteins were transferred to nitrocellulose membranes (GF Healthcare life science, Munich, Germany). Membranes, after blocking, were incubated with primary antibodies: mTor (1:1000, Polyclonal; Cell Signaling, Warsaw, Poland), MDR1 (1:1000 anti-mo; Clone: D3H1Q, Cell Signaling, Warsaw, Poland), Vinculin (1:1000 anti-mo, clone: V284; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)—loading control. Bands were detected using Luminol as HRP substrate (Santa-Cruz, CA, USA) with X-ray films after treating with secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase-HRP (goat anti—mouse/anti-rabbit, 1:10,000; Vector Laboratories, Janki, Poland). Bands were analyzed using ImageJ/Fiji. All data were normalized to 2DN condition.

### 4.4. Next Generation Sequencing (NGS)

For Next Generation Sequencing, total RNA was isolated using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions with subsequent DNA cleanup with TURBO DNA-free Kit (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania). Concentration of obtained RNA was measured with RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Singapore), while its quality and integrity— with Qubit RNA IQ Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Singapore). Samples with IQ > 8.5 only were used for sequencing. cDNA libraries were obtained from mRNA, by purifying 1 µg of total RNA with NEBNext®

Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (New England Biolabs), using Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (Biolabs, Ipswich, MA, USA) and NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (Biolabs, Ipswich, MA, USA), per producers protocols. Libraries were purified with NEBNext Sample purification Beads (Biolabs, Ipswich, MA, USA) and their quality was confirmed by High Sensitivity DNA Kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA) and Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, USA). The sequencing was performed as outsourced service—by Lexogen GmbH (Vienna, Austria), using NextSeq 500 system (Illumina, San Diego, CA, USA). Single-end reads were aligned to Ensembl GRCm38 mouse genome with STAR (v2.7). Counts were obtained using featureCounts (v1.6.3). Differentially expressed genes were identified with edgeR package (v3.3) in R (v4). Differentially expressed genes (DEGs) were identified by  $-1.5 < \log_2 FC > 1.5$  and  $p$ -value  $< 0.5$ . Gene symbols were translated into UniProt accession numbers using the UniProt Knowledgebase (UniProtKB). Protein networks were constructed in the STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes) database using the list of protein accession numbers as a query and then analyzed using the Cytoscape software.

#### 4.5. Real Time -Polymerase Chain Reaction

RNA isolation, measuring, and purification were performed as described above. To obtain cDNA which was used in RT-PCR reaction, reverse transcription process was performed, using a commercially available High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania ) according to the manufacturer's instructions. RT-PCR reactions were performed using TaqMan Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania ) together with commercially available probes all from Thermo Fisher Scientific: *mTor*: Mm00444968\_m1., *Actinβ*: Mm02619580. The samples run on Bio-Rad CFX384 qPCR System or CFX Connect qPCR System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Amplification conditions were as follows: 50 °C (2 min), 95 °C (10 min) and 40 cycles of 95 °C (15 s) and 60 °C (1 min). The quantity of mRNA was calculated using the 2<sup>-Delta C(T)</sup> method and normalized to *β-actin*. All reactions were performed as triplicates. All data were normalized to 2DN condition.

#### 4.6. Drug Sensitivity Assay

Anticancer drug sensitivity of B16F10 and RenCa cells dependence of microenvironment was analyzed using distinct culture conditions. Four types of drugs were tested: the mTOR inhibitor Everolimus (Lclaboratories, Woburn, MA, USA), the p-Glycoprotein inhibitor of MDR Tariquidar (APEXBio, Houston, USA), the DNA intercalator Doxorubicin (Sigmaaldrich, Darmstadt, Germany), and the Cisplatin as DNA Guanine binder and replication blocker (Sigmaaldrich, Darmstadt, Germany). The cells were grown in 96-well plates according to the procedure mentioned above. At last day of cell growth, the drugs mixed with culture medium were added at final testing concentrations: Everolimus (2, 5, 10, 15, 17, 19, 25 μM), Tariquidar (10, 25, 50, 60, 80, 100, 150 μM), Doxorubicin (0.001, 0.025, 0.05, 0.1, 2 μM), and Cisplatin (1, 3, 10, 15, 20). Cell viability was monitored after 48 h of culture with the drugs using alamarBlue reduction activity of living cells (DAL1025, Invitrogen Co., Paisley, UK). A volume of 12.2 μL of alamarBlue was added. The cells cultured in 2D were incubated with the reagent for 4 h, while incubation was maintained during 12 h for cells cultured in three dimensions at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Reaction was measured spectrophotometrically using a Microspectrophotometer-Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (570 nm and 600 nm).

#### 4.7. Statistical Analysis

The results are shown as a mean  $\pm$  SEM. All data were normalized to 2DN condition. All experiments were performed at least in 3 biological replicates. All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 9.0 software (RRID:SCR\_002798). Depending on the Gaussian distribution, we performed One-Way Analysis of variance (ANOVA) with Tukey post-hoc test or Kruskal–Wallis with post-hoc Dunn's test.

## 5. Conclusions

We here observed a distinct susceptibility to doxorubicin or everolimus and cisplatin in spheroid models of two cancer types. They differed in the expression of MDR1 and Cyp2s1, but other drug resistance mechanisms were similarly induced in both models. We excluded the limited drug penetration related to 3D architecture as a cause of lower cell responsiveness to drugs. Other features linked to cancer type/cell line intrinsic characteristics might be responsible for the outcome of the MDR phenotype. Although we would not identify the molecular changes that could predict drug resistance, our model serves as an interesting tool for experimental testing of anti-cancer candidates. Such 3D culture can be potentially used for in vitro testing using patient-derived cells, as a clinically relevant and easily accessible instrument for personalized medicine, in the face of lack of molecular prediction markers.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23031166/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization: C.K.; methodology: A.F.-D.; formal analysis: A.F.-D., K.B. and A.K.; investigation: A.F.-D. and K.B., writing—original draft preparation: A.F.-D. and K.B., writing—review and editing: C.K., supervision C.K., funding acquisition: C.K. and A.F.-D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The research was funded by the National Science Centre, Poland Grant no. 2016/23/B/NZ1/03211 and Military Institute of Medicine intramural grant no. 1/9014 (505). A.F.-D was supported by European Social Fund: POWER “Next generation sequencing technologies in biomedicine and personalized medicine”.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** All data generated or analyzed during this study are included either in this article or in the Supplementary Figures. The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request. NGS data have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus [60] and are accessible through GEO Series accession number GSE190296 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE190296>) (accessed on: 6 December 2021).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

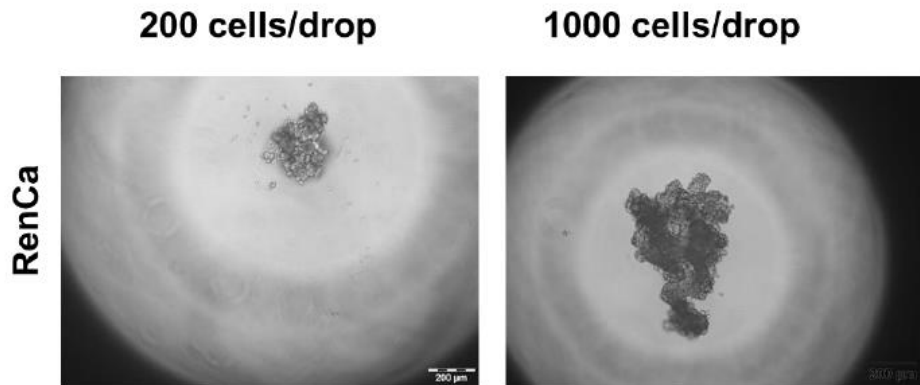
## References

1. Vasan, N.; Baselga, J.; Hyman, D.M. A view on drug resistance in cancer. *Nature* **2019**, *575*, 299–309. [CrossRef]
2. Szenajch, J.; Szabelska-Bereżewicz, A.; Świercz, A.; Zypych-Walczak, J.; Siatkowski, I.; Góralski, M.; Synowiec, A.; Handschuh, L. Transcriptome Remodeling in Gradual Development of Inverse Resistance between Paclitaxel and Cisplatin in Ovarian Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9218. [CrossRef]
3. Wu, Q.; Yang, Z.; Nie, Y.; Shi, Y.; Fan, D. Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: Mechanisms and lab approaches. *Cancer Lett.* **2014**, *347*, 159–166. [CrossRef] [PubMed]
4. Holohan, C.; Van Schaeybroeck, S.; Longley, D.B.; Johnston, P.G. Cancer drug resistance: An evolving paradigm. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 714–726. [CrossRef] [PubMed]
5. Westover, D.; Zugazagoitia, J.; Cho, B.C.; Lovly, C.M.; Paz-Ares, L. Mechanisms of acquired resistance to first- and second-generation EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Ann. Oncol.* **2018**, *29*, i10–i19. [CrossRef]
6. Alexa-Stratulat, T.; Pešić, M.; Gašparović, A.; Trougakos, I.P.; Riganti, C. What sustains the multidrug resistance phenotype beyond ABC efflux transporters? Looking beyond the tip of the iceberg. *Drug Resist. Updat.* **2019**, *46*, 100643. [CrossRef] [PubMed]
7. Simões-Wüst, A.P.; Schürpf, T.; Hall, J.; Stahel, R.A.; Zangemeister-Wittke, U. Bcl-2/bcl-xL bispecific antisense treatment sensitizes breast carcinoma cells to doxorubicin, paclitaxel and cyclophosphamide. *Breast Cancer Res. Treat.* **2002**, *76*, 157–166. [CrossRef] [PubMed]
8. Jones, V.S.; Huang, R.Y.; Chen, L.P.; Chen, Z.S.; Fu, L.; Huang, R.P. Cytokines in cancer drug resistance: Cues to new therapeutic strategies. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1865*, 255–265. [CrossRef]

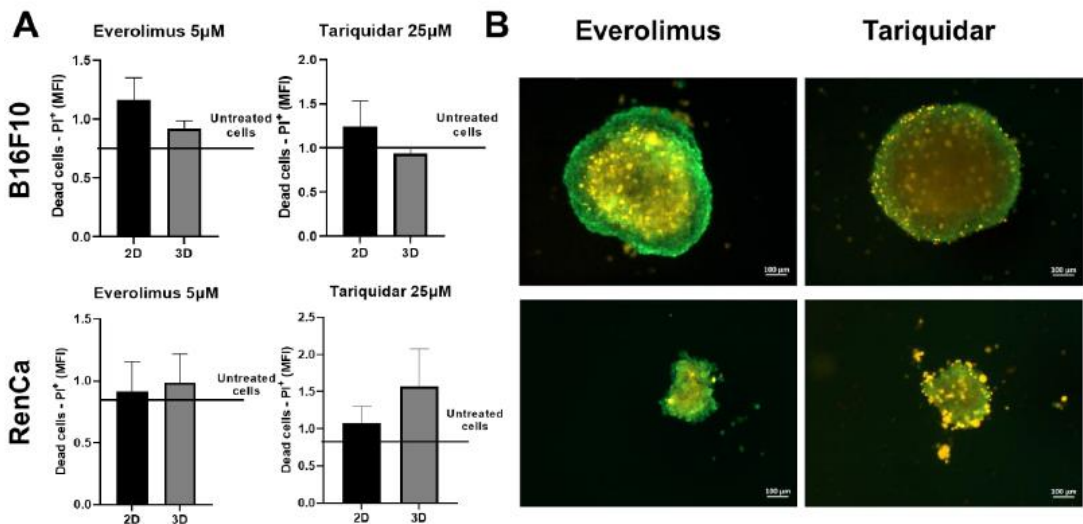
9. Lin, Z.; Fan, Z.; Zhang, X.; Wan, J.; Liu, T. Cellular plasticity and drug resistance in sarcoma. *Life Sci.* **2020**, *263*, 118589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Juranka, P.F.; Zastawny, R.L.; Ling, V. P-glycoprotein: Multidrug-resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins. *FASEB J.* **1989**, *3*, 2583–2592. [[CrossRef](#)]
11. Marques, D.S.; Sandrini, J.Z.; Boyle, R.T.; Marins, L.F.; Trindade, G.S. Relationships between multidrug resistance (MDR) and stem cell markers in human chronic myeloid leukemia cell lines. *Leuk. Res.* **2010**, *34*, 757–762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Imamura, Y.; Mukohara, T.; Shimono, Y.; Funakoshi, Y.; Chayahara, N.; Toyoda, M.; Kiyota, N.; Takao, S.; Kono, S.; Nakatsura, T.; et al. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncol. Rep.* **2015**, *33*, 1837–1843. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Weiswald, L.B.; Bellet, D.; Dangles-Marie, V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia* **2015**, *17*, 1–15. [[CrossRef](#)]
14. Senthebane, D.A.; Rowe, A.; Thomford, N.E.; Shipanga, H.; Munro, D.; Mazeedi, M.A.M.A.; Almazayadi, H.A.M.; Kallmeyer, K.; Dandara, C.; Pepper, M.S.; et al. The Role of Tumor Microenvironment in Chemoresistance: To Survive, Keep Your Enemies Closer. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1586. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Boucherit, N.; Gorvel, L.; Olive, D. 3D Tumor Models and Their Use for the Testing of Immunotherapies. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 603640. [[CrossRef](#)]
16. Senthebane, D.A.; Jonker, T.; Rowe, A.; Thomford, N.E.; Munro, D.; Dandara, C.; Wonkam, A.; Govender, D.; Calder, B.; Soares, N.C.; et al. The Role of Tumor Microenvironment in Chemoresistance: 3D Extracellular Matrices as Accomplices. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2861. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Zraikat, M.; Alshelleh, T. Comparison Between Different 3D Spheroid Tumor Invasion Models. *Assay Drug Dev. Technol.* **2020**, *18*, 239–242. [[CrossRef](#)]
18. Shoal, H.; Karsch-Bluman, A.; Brill-Karniely, Y.; Stern, T.; Zamir, G.; Hubert, A.; Benny, O. Tumor cells and their crosstalk with endothelial cells in 3D spheroids. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 10428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Courau, T.; Bonnereau, J.; Chicoteau, J.; Bottois, H.; Remark, R.; Assante Miranda, L.; Toubert, A.; Blery, M.; Aparicio, T.; Allez, M.; et al. Cocultures of human colorectal tumor spheroids with immune cells reveal the therapeutic potential of MICA/B and NKG2A targeting for cancer treatment. *J. Immunother. Cancer* **2019**, *7*, 74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Klimkiewicz, K.; Weglarczyk, K.; Collet, G.; Paprocka, M.; Guichard, A.; Sarna, M.; Jozkowicz, A.; Dulak, J.; Sarna, T.; Grillon, C.; et al. A 3D model of tumour angiogenic microenvironment to monitor hypoxia effects on cell interactions and cancer stem cell selection. *Cancer Lett.* **2017**, *396*, 10–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Hamilton, G.; Rath, B. Applicability of tumor spheroids for. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2019**, *15*, 15–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Nath, S.; Devi, G.R. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol. Ther.* **2016**, *163*, 94–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Dzobo, K. Taking a Full Snapshot of Cancer Biology: Deciphering the Tumor Microenvironment for Effective Cancer Therapy in the Oncology Clinic. *OMICS* **2020**, *24*, 175–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Hagemann, J.; Jacobi, C.; Hahn, M.; Schmid, V.; Welz, C.; Schwenk-Zieger, S.; Stauber, R.; Baumeister, P.; Becker, S. Spheroid-based 3D Cell Cultures Enable Personalized Therapy Testing and Drug Discovery in Head and Neck Cancer. *Anticancer Res.* **2017**, *37*, 2201–2210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Miricescu, D.; Totan, A.; Stanescu-Spinu, I.I.; Badoiu, S.C.; Stefani, C.; Greabu, M. PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer: From Molecular Landscape to Clinical Aspects. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *22*, 173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Smith, J.A.; Brown, J.; Martin, M.C.; Ramondetta, L.M.; Wolf, J.K. An in vitro study of the inhibitory activity of gemcitabine and platinum agents in human endometrial carcinoma cell lines. *Gynecol. Oncol.* **2004**, *92*, 314–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Efferth, T.; Konkimalla, V.B.; Wang, Y.F.; Sauerbrey, A.; Meinhardt, S.; Zintl, F.; Mattern, J.; Volm, M. Prediction of broad spectrum resistance of tumors towards anticancer drugs. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 2405–2412. [[CrossRef](#)]
28. Liang, X.; Xu, X.; Wang, F.; Li, N.; He, J. E-cadherin increasing multidrug resistance protein 1 via hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  contributes to multicellular resistance in colorectal cancer. *Tumour Biol.* **2016**, *37*, 425–435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Mistry, P.; Stewart, A.J.; Dangerfield, W.; Okiji, S.; Liddle, C.; Bootle, D.; Plumb, J.A.; Templeton, D.; Charlton, P. In vitro and in vivo reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a novel potent modulator, XR9576. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 749–758. [[PubMed](#)]
30. Zhou, L.; Huang, Y.; Li, J.; Wang, Z. The mTOR pathway is associated with the poor prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Med. Oncol.* **2010**, *27*, 255–261. [[CrossRef](#)]
31. Karbowniczek, M.; Spittle, C.S.; Morrison, T.; Wu, H.; Henske, E.P. mTOR is activated in the majority of malignant melanomas. *J. Investig. Derm.* **2008**, *128*, 980–987. [[CrossRef](#)]
32. Pinto Marín, A.; Redondo Sánchez, A.; Espinosa Arranz, E.; Zamora Auñón, P.; Castelo Fernández, B.; González Barón, M. mTOR pathway inhibition in renal cell carcinoma. *Urol. Oncol.* **2012**, *30*, 356–361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Brown, A.; Kumar, S.; Tchounwou, P.B. Cisplatin-Based Chemotherapy of Human Cancers. *J. Cancer Sci.* **2019**, *11*, 97.
34. Mitrus, I.; Sochanik, A.; Cichoń, T.; Szala, S. Combination of combretastatin A4 phosphate and doxorubicin-containing liposomes affects growth of B16-F10 tumors. *Acta Biochim. Pol.* **2009**, *56*, 161–165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Altaf, M.; Casagrande, N.; Mariotto, E.; Baig, N.; Kawde, A.N.; Corona, G.; Larcher, R.; Borghese, C.; Pavan, C.; Seliman, A.A.; et al. Potent In Vitro and In Vivo Anticancer Activity of New Bipyridine and Bipyrimidine Gold (III) Dithiocarbamate Derivatives. *Cancers* **2019**, *11*, 474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

36. Urien, S.; Lokiec, F. Population pharmacokinetics of total and unbound plasma cisplatin in adult patients. *Br. J. Clin. Pharm.* **2004**, *57*, 756–763. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Ribrag, V.; Droz, J.P.; Morizet, J.; Leclercq, B.; Gouyette, A.; Chabot, G.G. Test dose-guided administration of cisplatin in an anephric patient: A case report. *Ann. Oncol.* **1993**, *4*, 679–682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Yang, Z.; Liao, J.; Carter-Cooper, B.A.; Lapidus, R.G.; Cullen, K.J.; Dan, H. Regulation of cisplatin-resistant head and neck squamous cell carcinoma by the SRC/ETS-1 signaling pathway. *BMC Cancer* **2019**, *19*, 485. [[CrossRef](#)]
39. Baek, N.; Seo, O.W.; Kim, M.; Hulme, J.; An, S.S. Monitoring the effects of doxorubicin on 3D-spheroid tumor cells in real-time. *Oncotargets Ther.* **2016**, *9*, 7207–7218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Haas, N.B.; Lin, X.; Manola, J.; Pins, M.; Liu, G.; McDermott, D.; Nanus, D.; Heath, E.; Wilding, G.; Dutcher, J. A phase II trial of doxorubicin and gemcitabine in renal cell carcinoma with sarcomatoid features: ECOG 8802. *Med. Oncol.* **2012**, *29*, 761–767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Fitzgerald, K.A.; Malhotra, M.; Curtin, C.M.; O’ Brien, F.J.; O’ Driscoll, C.M. Life in 3D is never flat: 3D models to optimise drug delivery. *J. Control. Release* **2015**, *215*, 39–54. [[CrossRef](#)]
42. He, S.M.; Li, R.; Kanwar, J.R.; Zhou, S.F. Structural and functional properties of human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 439–481. [[CrossRef](#)]
43. Belisario, D.C.; Akman, M.; Godel, M.; Campani, V.; Patrizio, M.P.; Scotti, L.; Hattinger, C.M.; De Rosa, G.; Donadelli, M.; Serra, M.; et al. ABCA1/ABCB1 Ratio Determines Chemo- and Immune-Sensitivity in Human Osteosarcoma. *Cells* **2020**, *9*, 647. [[CrossRef](#)]
44. Kolchinsky, A.; Roninson, I.B. Drug resistance conferred by MDR1 expression in spheroids formed by glioblastoma cell lines. *Anticancer Res.* **1997**, *17*, 3321–3327. [[PubMed](#)]
45. Sun, Y.; Guan, Z.; Liang, L.; Cheng, Y.; Zhou, J.; Li, J.; Xu, Y. HIF-1 $\alpha$ /MDR1 pathway confers chemoresistance to cisplatin in bladder cancer. *Oncol. Rep.* **2016**, *35*, 1549–1556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Oh, S.S.; Lee, K.W.; Madhi, H.; Jeong, J.W.; Park, S.; Kim, M.; Lee, Y.; Han, H.T.; Hwangbo, C.; Yoo, J.; et al. Cordycepin Resensitizes T24R2 Cisplatin-Resistant Human Bladder Cancer Cells to Cisplatin by Inactivating Ets-1 Dependent MDR1 Transcription. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1710. [[CrossRef](#)]
47. Dzobo, K.; Sentebane, D.A.; Ganz, C.; Thomford, N.E.; Wonkam, A.; Dandara, C. Advances in Therapeutic Targeting of Cancer Stem Cells within the Tumor Microenvironment: An Updated Review. *Cells* **2020**, *9*, 1896. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Rentala, S.; Mangamoori, L.N. Isolation, characterization and mobilization of prostate cancer tissue derived CD133+ MDR1+ cells. *J. Stem Cells* **2010**, *5*, 75–81.
49. Zhang, Y.; Sun, B.; Zhao, X.; Liu, Z.; Wang, X.; Yao, X.; Dong, X.; Chi, J. Clinical significances and prognostic value of cancer stem-like cells markers and vasculogenic mimicry in renal cell carcinoma. *J. Surg. Oncol.* **2013**, *108*, 414–419. [[CrossRef](#)]
50. Debeb, B.G.; Zhang, X.; Krishnamurthy, S.; Gao, H.; Cohen, E.; Li, L.; Rodriguez, A.A.; Landis, M.D.; Lucci, A.; Ueno, N.T.; et al. Characterizing cancer cells with cancer stem cell-like features in 293T human embryonic kidney cells. *Mol. Cancer* **2010**, *9*, 180. [[CrossRef](#)]
51. Pópulo, H.; Lopes, J.M.; Soares, P. The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 1886–1918. [[CrossRef](#)]
52. Ishikawa, T. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 463–468. [[CrossRef](#)]
53. Chatterjee, A.; Gupta, S. The multifaceted role of glutathione S-transferases in cancer. *Cancer Lett.* **2018**, *433*, 33–42. [[CrossRef](#)]
54. Zanger, U.M.; Schwab, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol. Ther.* **2013**, *138*, 103–141. [[CrossRef](#)]
55. Paumi, C.M.; Ledford, B.G.; Smitherman, P.K.; Townsend, A.J.; Morrow, C.S. Role of multidrug resistance protein 1 (MRP1) and glutathione S-transferase A1-1 in alkylating agent resistance. Kinetics of glutathione conjugate formation and efflux govern differential cellular sensitivity to chlorambucil versus melphalan toxicity. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 7952–7956. [[CrossRef](#)]
56. Smitherman, P.K.; Townsend, A.J.; Kute, T.E.; Morrow, C.S. Role of multidrug resistance protein 2 (MRP2, ABCC2) in alkylating agent detoxification: MRP2 potentiates glutathione S-transferase A1-1-mediated resistance to chlorambucil cytotoxicity. *J. Pharm. Exp.* **2004**, *308*, 260–267. [[CrossRef](#)]
57. Young, S.C.; Wang, C.J.; Hsu, J.D.; Hsu, J.L.; Chou, F.P. Increased sensitivity of Hep G2 cells toward the cytotoxicity of cisplatin by the treatment of piper betel leaf extract. *Arch. Toxicol.* **2006**, *80*, 319–327. [[CrossRef](#)]
58. Chitcholtan, K.; Sykes, P.H.; Evans, J.J. The resistance of intracellular mediators to doxorubicin and cisplatin are distinct in 3D and 2D endometrial cancer. *J. Transl. Med.* **2012**, *10*, 38. [[CrossRef](#)]
59. Popova, A.A.; Levkin, P.A. Precision Medicine in Oncology: In Vitro Drug Sensitivity and Resistance Test (DSRT) for Selection of Personalized Anticancer Therapy. *Adv. Ther.* **2020**, *3*, 1900100. [[CrossRef](#)]
60. Edgar, R.; Domrachev, M.; Lash, A.E. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 207–210. [[CrossRef](#)]

Supplementary Material



Supplementary Figure S1. **Optimization of spheroid cultures of RenCa cells.** Cell aggregates after 3 days of cultures in hanging drops in different seeding densities.



Supplementary Figure S2. **Cell sensitivity in 2D and 3D culture conditions to everolimus and tariquidar.** A—Sensitivity to everolimus and tariquidar of B16F10 and RenCa cells in 2D and 3D models assessed by quantification of propidium iodide incorporation by fluorescence microscopy. B—Fluorescence staining of spheroids by propidium iodide (orange, dead cells) and calcein (green - live cells). Statistical analysis was performed by One-Way ANOVA/Tukey test—\* $p < 0,05$ ,  $N = 3$  (2D-control).



### **Drug sensitivity assay—Methodology**

AlamarBlue assay results for viability were further compared to fluorescence microscopy assessment data. The cells were grown in 96-well plates according to the procedure mentioned in the text. On the last day of cell growth, the drugs mixed with culture medium were added to reach final testing concentrations of: Everolimus 5 $\mu$ M, Tariquidar 25 $\mu$ M. After 48h, microscopy imaging was performed using calcein acetoxymethyl ester (Calcein AM Biolegend) which is hydrolyzed by cellular esterases to free fluorescent calcein in the cytoplasm and propidium iodide DNA intercalating agent, highly fluorescent after intercalation between the DNA bases (Exbio, Czech Republic). Briefly, after adding the dyes, spheroids and cells grown in 2D were incubated for 15 minutes in the dark, at room temperature. Images were acquired using a Zeiss AxioObserver.7, fluorescence, and inverted microscope (5X magnification) and analysis performed with the Zen 2.6 blue edition software (Zeiss, Germany). The sensitivity to drugs was assessed by comparing the propidium iodide fluorescence intensity of treated cells to untreated control (ImageJ Fiji).

---

## Podsumowanie i wnioski

Badania przedstawione w niniejszej pracy pozwalają wysunąć następujące wnioski:

- otrzymane sferoidy różnią się kształtem oraz wielkością, w zależności od typu nowotworu/ wykorzystanej linii komórkowej,
- sferoidy hodowane w warunkach hipoksji obumierają, prawdopodobnie ze względu na zbyt niskie stężenie tlenu w środku sfery,
- w modelu czerniaka obserwowano wzrost markerów zjawiska hipoksji w przeciwieństwie do modelu nowotworu nerki,
- zastosowane modele nowotworów, w hodowlach 3D wykazują różne mechanizmy związane z progresją raka: w modelu RCC obserwowano wzrost komórek o fenotypie CSC, podczas gdy w modelu czerniaka indukcję zjawiska EMT,
- hodowle 3D odpowiednio dla typu nowotworu odwzorowują mikrośrodowisko guza pod względem takich funkcji jak: aktywacja mechanizmów związanych z odpowiedzią na hipoksję, trójwymiarowy kształt oraz indukcja mechanizmów zwiększających agresywność komórkową (EMT, CSC),
- sferoidy nowotworu skóry wykazują mniejszą wrażliwość na ewerolimus, cisplatynę i doksorubicynę, dla nowotworu nerki obserwowano niską wrażliwość tylko na doksorubicynę,
- dystrybucja leku nie jest zaburzona w przypadku sfer,
- hodowla 3D w różny sposób, w zależności od typu nowotworu, wpływa na ekspresję MDR1, ale nie ma wpływu na ekspresję mTor,
- kultury trójwymiarowe powodują wzrost ekspresji genów związanych z metabolizmem ksenobiotyków przez cytochrom p450,
- określenie mechanizmów pośredniczących w odmiennej wrażliwości modeli 3D na doksorubicynę lub cisplatynę i ewerolimus wymaga dalszych badań.

Powyższe dane sugerują, że pomimo różnicy w obserwowanych procesach między zastosowanym modelem 3D, są one odtworzone w odpowiadających im modelach *in vivo*. Ponadto, chociaż nie udało się zidentyfikować zmian powodujących odmienną wrażliwość na przetestowane terapeutyki o odmiennym charakterze działania, udowodniono przydatność opracowanego modelu w niniejszych badaniach. Wykazano, że hodowla 3D może być istotna w badaniach nad fizjologią raka jako alternatywa dla standardowych metod, przez co może ona potencjalnie zostać wykorzystana do testów z zastosowaniem komórek pochodzących od pacjentów, jako klinicznie istotny i łatwo dostępny instrument.

**Oświadczenia wszystkich współautorów publikacji określające indywidualny wkład (udział merytoryczny i procentowy) każdego z nich w ich powstanie**

Warszawa, 16.05.2022  
(miejsowość, data)

Aleksandra Majewska  
(imię i nazwisko)

**OŚWIADCZENIE**

Jako współautor pracy pt. *Spheroid culture models adequately imitate distinctive features of the renal cancer or melanoma microenvironment.*

Oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

Udział w części eksperymentalnej (badania z udziałem zwierząt) oraz w analizie i interpretacji danych.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 12 %.

Wkład ...Aleksandry Filipiak-Duliban ...w powstawanie publikacji określam jako 58 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie założeń pracy, opracowanie modelu do badań, optymalizacja i przeprowadzenie eksperymentów, analiza i interpretacja danych, napisanie pierwowzoru manuskryptu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Filipiak-Duliban.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

A. Majewska  
(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

22/08/2022  
(miejsowość, data)

Claudine KISDA  
(imię i nazwisko)

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Spheroid culture models adequately imitate distinctive features of the renal cancer or melanoma microenvironment*.

Oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

opracowanie głównych założeń i celu pracy, krytyczna ocena pierwowzoru manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 10 %.

Wkład ...Aleksandry Filipiak-Duliban ...w powstawanie publikacji określam jako 58 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie założeń pracy, opracowanie modelu do badań, optymalizacja i przeprowadzenie eksperymentów, analiza i interpretacja danych, napisanie pierwowzoru manuskryptu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Filipiak-Duliban.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

Claudine KISDA

(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

WARSAWA 1.6.22  
(miejsowość, data)

KLAUDIA BROPAKOWSKA  
(imię i nazwisko)

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Spheroid culture models adequately imitate distinctive features of the renal cancer or melanoma microenvironment*.

Oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:  
opracowanie założeń pracy, pomoc w analizie i interpretacja danych; pomoc i nadzorowanie przeprowadzanych eksperymentów, krytyczna ocena pierwowzoru manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 20 %.

Wkład ...Aleksandry Filipiak-Duliban ...w powstawanie publikacji określam jako 58 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie założeń pracy, opracowanie modelu do badań, optymalizacja i przeprowadzenie eksperymentów, analiza i interpretacja danych, napisanie pierwowzoru manuskryptu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Filipiak-Duliban.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

.....  
(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Poznań, 19.05.2022 r.  
(miejsowość, data)

Arkadiusz Kajdasz  
(imię i nazwisko)

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Spheroid culture differentially affects cancer cell sensitivity to drugs in melanoma and RCC models*.

Oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: analiza danych.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5 %.

Wkład ...Aleksandry Filipiak-Duliban ...w powstawanie publikacji określam jako 60 %,

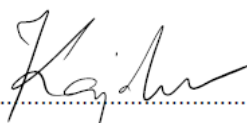
(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie medalu do badań, optymalizacja i przeprowadzenie eksperymentów, analiza danych, napisanie pierwowzoru manuskryptu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Filipiak-Duliban.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

  
.....  
(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

*Claudine Kisza*  
(imię i nazwisko)

23/05/2022  
(miejscowość, data)

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Spheroid culture differentially affects cancer cell sensitivity to drugs in melanoma and RCC models..*

Oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

opracowanie głównych założeń i celu pracy, krytyczna ocena pierwowzoru manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 15 %.

Wkład ...Aleksandry Filipiak-Duliban ...w powstawanie publikacji określam jako 60 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie założeń pracy, opracowanie modelu do badań, optymalizacja i przeprowadzenie eksperymentów, analiza i interpretacja danych, napisanie pierwowzoru manuskryptu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Filipiak-Duliban.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

*Claudine Kisza*

(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

WARSZAWA 1.6.22  
(miejsowość, data)

KLAUDIA BRONA CIEWKA  
(imię i nazwisko)

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Spheroid culture differentially affects cancer cell sensitivity to drugs in melanoma and RCC models.*

Oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

opracowanie założeń pracy, pomoc w analizie i interpretacja danych; pomoc i nadzorowanie przeprowadzanych eksperymentów, krytyczna ocena pierwowzoru manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 20 %.

Wkład ...Aleksandry Filipiak-Duliban ...w powstawanie publikacji określam jako 60 %,

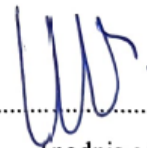
(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie założeń pracy, opracowanie modelu do badań, optymalizacja i przeprowadzenie eksperymentów, analiza i interpretacja danych, napisanie pierwowzoru manuskryptu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Filipiak-Duliban.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników



---

## Bibliografia

1. Hulvat MC: **Cancer Incidence and Trends**. *Surg Clin North Am* 2020, **100**(3):469-481.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A: **Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries**. *CA Cancer J Clin* 2018, **68**(6):394-424.
3. Dagenais GR, Leong DP, Rangarajan S, Lanas F, Lopez-Jaramillo P, Gupta R, Diaz R, Avezum A, Oliveira GBF, Wielgosz A *et al*: **Variations in common diseases, hospital admissions, and deaths in middle-aged adults in 21 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study**. *Lancet* 2020, **395**(10226):785-794.
4. Gray RE, Harris GT: **Renal Cell Carcinoma: Diagnosis and Management**. *Am Fam Physician* 2019, **99**(3):179-184.
5. Fang P, Zhou L, Lim LY, Fu H, Yuan ZX, Lin J: **Targeting Strategies for Renal Cancer Stem Cell Therapy**. *Curr Pharm Des* 2020, **26**(17):1964-1978.
6. Ljungberg B, Campbell SC, Choi HY, Cho HY, Jacqmin D, Lee JE, Weikert S, Kiemeny LA: **The epidemiology of renal cell carcinoma**. *Eur Urol* 2011, **60**(4):615-621.
7. Hancock SB, Georgiades CS: **Kidney Cancer**. *Cancer J* 2016, **22**(6):387-392.
8. Semenza GL: **HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing**. *Curr Opin Cell Biol* 2001, **13**(2):167-171.
9. Ben-Skowronek I, Kozaczuk S: **Von Hippel-Lindau Syndrome**. *Horm Res Paediatr* 2015, **84**(3):145-152.
10. Schödel J, Grampp S, Maher ER, Moch H, Ratcliffe PJ, Russo P, Mole DR: **Hypoxia, Hypoxia-inducible Transcription Factors, and Renal Cancer**. *Eur Urol* 2016, **69**(4):646-657.
11. Jonasch E, Walker CL, Rathmell WK: **Clear cell renal cell carcinoma ontogeny and mechanisms of lethality**. *Nat Rev Nephrol* 2021, **17**(4):245-261.
12. di Martino S, De Luca G, Grassi L, Federici G, Alfonsi R, Signore M, Addario A, De Salvo L, Francescangeli F, Sanchez M *et al*: **Renal cancer: new models and approach for personalizing therapy**. *J Exp Clin Cancer Res* 2018, **37**(1):217.
13. Elder DE, Bastian BC, Cree IA, Massi D, Scolyer RA: **The 2018 World Health Organization Classification of Cutaneous, Mucosal, and Uveal Melanoma: Detailed Analysis of 9 Distinct Subtypes Defined by Their Evolutionary Pathway**. *Arch Pathol Lab Med* 2020, **144**(4):500-522.
14. Linares MA, Zakaria A, Nizran P: **Skin Cancer**. *Prim Care* 2015, **42**(4):645-659.
15. Kozovska Z, Gabrisova V, Kucerova L: **Malignant melanoma: diagnosis, treatment and cancer stem cells**. *Neoplasma* 2016, **63**(4):510-517.
16. Eddy K, Chen S: **Overcoming Immune Evasion in Melanoma**. *Int J Mol Sci* 2020, **21**(23).
17. Davis LE, Shalin SC, Tackett AJ: **Current state of melanoma diagnosis and treatment**. *Cancer Biol Ther* 2019, **20**(11):1366-1379.
18. Butturini E, Carcereri de Prati A, Boriero D, Mariotto S: **Tumor Dormancy and Interplay with Hypoxic Tumor Microenvironment**. *Int J Mol Sci* 2019, **20**(17).
19. Ribeiro Franco PI, Rodrigues AP, de Menezes LB, Pacheco Miguel M: **Tumor microenvironment components: Allies of cancer progression**. *Pathol Res Pract* 2020, **216**(1):152729.

- 
20. Klimkiewicz K, Weglarczyk K, Collet G, Paprocka M, Guichard A, Sarna M, Jozkowicz A, Dulak J, Sarna T, Grillon C *et al*: **A 3D model of tumour angiogenic microenvironment to monitor hypoxia effects on cell interactions and cancer stem cell selection.** *Cancer Lett* 2017, **396**:10-20.
  21. Boucherit N, Gorvel L, Olive D: **3D Tumor Models and Their Use for the Testing of Immunotherapies.** *Front Immunol* 2020, **11**:603640.
  22. Quail DF, Joyce JA: **Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis.** *Nat Med* 2013, **19**(11):1423-1437.
  23. Wu T, Dai Y: **Tumor microenvironment and therapeutic response.** *Cancer Lett* 2017, **387**:61-68.
  24. Lunt SJ, Chaudary N, Hill RP: **The tumor microenvironment and metastatic disease.** *Clin Exp Metastasis* 2009, **26**(1):19-34.
  25. Hinshaw DC, Shevde LA: **The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression.** *Cancer Res* 2019, **79**(18):4557-4566.
  26. Elizabeth LSaYJKaPW: **Nanomedicine targeting the tumor microenvironment: Therapeutic strategies to inhibit angiogenesis, remodel matrix, and modulate immune responses.** *Journal of Cellular Immunotherapy* 2016, **2**(2):69-78.
  27. Li Y, Zhao L, Li XF: **Hypoxia and the Tumor Microenvironment.** *Technol Cancer Res Treat* 2021, **20**:15330338211036304.
  28. Mao X, Xu J, Wang W, Liang C, Hua J, Liu J, Zhang B, Meng Q, Yu X, Shi S: **Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: new findings and future perspectives.** *Mol Cancer* 2021, **20**(1):131.
  29. Senthebane DA, Jonker T, Rowe A, Thomford NE, Munro D, Dandara C, Wonkam A, Govender D, Calder B, Soares NC *et al*: **The Role of Tumor Microenvironment in Chemoresistance: 3D Extracellular Matrices as Accomplices.** *Int J Mol Sci* 2018, **19**(10).
  30. Shoal H, Karsch-Bluman A, Brill-Karniely Y, Stern T, Zamir G, Hubert A, Benny O: **Tumor cells and their crosstalk with endothelial cells in 3D spheroids.** *Sci Rep* 2017, **7**(1):10428.
  31. Räsänen K, Vaheri A: **Activation of fibroblasts in cancer stroma.** *Exp Cell Res* 2010, **316**(17):2713-2722.
  32. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M: **The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization.** *Trends Immunol* 2004, **25**(12):677-686.
  33. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, Seifi B, Mohammadi A, Afshari JT, Sahebkar A: **Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease.** *J Cell Physiol* 2018, **233**(9):6425-6440.
  34. Gabilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V: **Coordinated regulation of myeloid cells by tumours.** *Nat Rev Immunol* 2012, **12**(4):253-268.
  35. Oya Y, Hayakawa Y, Koike K: **Tumor microenvironment in gastric cancers.** *Cancer Sci* 2020, **111**(8):2696-2707.
  36. Majewska A, Wilkus K, Brodaczewska K, Kieda C: **Endothelial Cells as Tools to Model Tissue Microenvironment in Hypoxia-Dependent Pathologies.** *Int J Mol Sci* 2021, **22**(2).
  37. Jain RK: **Antiangiogenesis Strategies Revisited: From Starving Tumors to Alleviating Hypoxia.** *Cancer Cell* 2014, **26**(5):605-622.
  38. Mandriota SJ, Turner KJ, Davies DR, Murray PG, Morgan NV, Sowter HM, Wykoff CC, Maher ER, Harris AL, Ratcliffe PJ *et al*: **HIF activation identifies early lesions**

- 
- in VHL kidneys: evidence for site-specific tumor suppressor function in the nephron.** *Cancer Cell* 2002, **1**(5):459-468.
39. Collet G, Skrzypek K, Grillon C, Matejuk A, El Hafni-Rahbi B, Lamerant - Fayel N, Kieda C: **Hypoxia control to normalize pathologic angiogenesis: Potential role for endothelial precursor cells and miRNAs regulation.** *Vascular Pharmacology* 2012, **56**(5-6):252-261.
40. Ho YJ, Chu SW, Liao EC, Fan CH, Chan HL, Wei KC, Yeh CK: **Normalization of tumor vasculature by oxygen microbubbles with ultrasound.** *Theranostics* 2019, **9**(24):7370-7383.
41. Martin JD, Seano G, Jain RK: **Normalizing Function of Tumor Vessels: Progress, Opportunities, and Challenges.** *Annual Review of Physiology* 2019, **81**:505-534.
42. Yu F, White SB, Zhao Q, Lee FS: **HIF-1alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(17):9630-9635.
43. Iwai K, Yamanaka K, Kamura T, Minato N, Conaway RC, Conaway JW, Klausner RD, Pause A: **Identification of the von Hippel-lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(22):12436-12441.
44. Hon WC, Wilson MI, Harlos K, Claridge TD, Schofield CJ, Pugh CW, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Stuart DI, Jones EY: **Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL.** *Nature* 2002, **417**(6892):975-978.
45. Cooper GM, Hausman RE: **The cell: a molecular approach**, vol. 4: ASM press Washington, DC, USA.; 2007.
46. Walker C, Mojares E, Del Río Hernández A: **Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression.** *Int J Mol Sci* 2018, **19**(10).
47. Lytle NK, Barber AG, Reya T: **Stem cell fate in cancer growth, progression and therapy resistance.** *Nat Rev Cancer* 2018, **18**(11):669-680.
48. Meacham CE, Morrison SJ: **Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity.** *Nature* 2013, **501**(7467):328-337.
49. Suhail Y, Cain MP, Vanaja K, Kurywchak PA, Levchenko A, Kalluri R, Kshitz: **Systems Biology of Cancer Metastasis.** *Cell Syst* 2019, **9**(2):109-127.
50. Zeeshan R, Mutahir Z: **Cancer metastasis - tricks of the trade.** *Bosn J Basic Med Sci* 2017, **17**(3):172-182.
51. Pastushenko I, Blanpain C: **EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis.** *Trends Cell Biol* 2019, **29**(3):212-226.
52. Saitoh M: **Involvement of partial EMT in cancer progression.** *J Biochem* 2018, **164**(4):257-264.
53. Fares J, Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA, Fares Y: **Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited.** *Signal Transduct Target Ther* 2020, **5**(1):28.
54. Jing X, Yang F, Shao C, Wei K, Xie M, Shen H, Shu Y: **Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment.** *Mol Cancer* 2019, **18**(1):157.
55. Eble JA, Niland S: **The extracellular matrix in tumor progression and metastasis.** *Clin Exp Metastasis* 2019, **36**(3):171-198.
56. De Craene B, Berx G: **Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression.** *Nat Rev Cancer* 2013, **13**(2):97-110.
57. Clara JA, Monge C, Yang Y, Takebe N: **Targeting signalling pathways and the immune microenvironment of cancer stem cells - a clinical update.** *Nat Rev Clin Oncol* 2020, **17**(4):204-232.

- 
58. Chae YC, Kim JH: **Cancer stem cell metabolism: target for cancer therapy.** *BMB Rep* 2018, **51**(7):319-326.
  59. Nassar D, Blanpain C: **Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications.** *Annu Rev Pathol* 2016, **11**:47-76.
  60. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE: **A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice.** *Nature* 1994, **367**(6464):645-648.
  61. Wu Q, Yang Z, Nie Y, Shi Y, Fan D: **Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: mechanisms and lab approaches.** *Cancer Lett* 2014, **347**(2):159-166.
  62. Haider T, Pandey V, Banjare N, Gupta PN, Soni V: **Drug resistance in cancer: mechanisms and tackling strategies.** *Pharmacol Rep* 2020, **72**(5):1125-1151.
  63. Belisario DC, Akman M, Godel M, Campani V, Patrizio MP, Scotti L, Hattinger CM, De Rosa G, Donadelli M, Serra M *et al*: **ABCA1/ABCB1 Ratio Determines Chemo- and Immune-Sensitivity in Human Osteosarcoma.** *Cells* 2020, **9**(3).
  64. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG: **Cancer drug resistance: an evolving paradigm.** *Nat Rev Cancer* 2013, **13**(10):714-726.
  65. Najafi M, Mortezaee K, Majidpoor J: **Cancer stem cell (CSC) resistance drivers.** *Life Sci* 2019, **234**:116781.
  66. Bukowski K, Kciuk M, Kontek R: **Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy.** *Int J Mol Sci* 2020, **21**(9).
  67. Cho Y, Kim YK: **Cancer Stem Cells as a Potential Target to Overcome Multidrug Resistance.** *Front Oncol* 2020, **10**:764.
  68. Filipiak-Duliban A, Brodaczewska K, Kajdasz A, Kieda C: **Spheroid Culture Differentially Affects Cancer Cell Sensitivity to Drugs in Melanoma and RCC Models.** *International Journal of Molecular Sciences* 2022, **23**(3):1166.
  69. Go RE, Hwang KA, Choi KC: **Cytochrome P450 1 family and cancers.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 2015, **147**:24-30.
  70. McDonnell AM, Dang CH: **Basic review of the cytochrome p450 system.** *J Adv Pract Oncol* 2013, **4**(4):263-268.
  71. Dalpiaz A, Paganetto G, Botti G, Pavan B: **Cancer stem cells and nanomedicine: new opportunities to combat multidrug resistance?** *Drug Discov Today* 2020, **25**(9):1651-1667.
  72. McLellan LI, Wolf CR: **Glutathione and glutathione-dependent enzymes in cancer drug resistance.** *Drug Resist Updat* 1999, **2**(3):153-164.
  73. Kaur G, Gupta SK, Singh P, Ali V, Kumar V, Verma M: **Drug-metabolizing enzymes: role in drug resistance in cancer.** *Clin Transl Oncol* 2020, **22**(10):1667-1680.
  74. Pathania S, Bhatia R, Baldi A, Singh R, Rawal RK: **Drug metabolizing enzymes and their inhibitors' role in cancer resistance.** *Biomed Pharmacother* 2018, **105**:53-65.
  75. Hoarau-Véchet J, Rafii A, Touboul C, Pasquier J: **Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions?** *Int J Mol Sci* 2018, **19**(1).
  76. Cheon DJ, Orsulic S: **Mouse models of cancer.** *Annu Rev Pathol* 2011, **6**:95-119.
  77. Gupta R, Schrooders Y, Hauser D, van Herwijnen M, Albrecht W, Ter Braak B, Brecklinghaus T, Castell JV, Elenschneider L, Escher S *et al*: **Comparing in vitro human liver models to in vivo human liver using RNA-Seq.** *Arch Toxicol* 2021, **95**(2):573-589.

- 
78. Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, Chen Z: **Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture.** *Physiology (Bethesda)* 2017, **32**(4):266-277.
  79. Jensen C, Teng Y: **Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture?** *Front Mol Biosci* 2020, **7**:33.
  80. Imamura Y, Mukohara T, Shimono Y, Funakoshi Y, Chayahara N, Toyoda M, Kiyota N, Takao S, Kono S, Nakatsura T *et al*: **Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer.** *Oncol Rep* 2015, **33**(4):1837-1843.
  81. Kieda C, El Hafny-Rahbi B, Collet G, Lamerant-Fayel N, Grillon C, Guichard A, Dulak J, Jozkowicz A, Kotlinowski J, Fylaktakidou KC *et al*: **Stable tumor vessel normalization with pO<sub>2</sub> increase and endothelial PTEN activation by inositol trispyrophosphate brings novel tumor treatment.** *Journal of Molecular Medicine* 2013, **91**(7):883-899.
  82. Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FD: **3D cell culture systems: advantages and applications.** *J Cell Physiol* 2015, **230**(1):16-26.
  83. Habanjar O, Diab-Assaf M, Caldefie-Chezet F, Delort L: **3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages.** *Int J Mol Sci* 2021, **22**(22).