



# Etablering och karaktärisering av organotypiska 3D co-kulturer med tumör- och T-celler

Pro gradu-avhandling i cellbiologi (40 sp)

Helena Backman, 37650

Handledare: Malin Åkerfelt

Fakulteten för naturvetenskaper och teknik

[helena.backman@abo.fi](mailto:helena.backman@abo.fi)

Åbo, 2018

**ÅBO AKADEMI**

**Fakulteten för naturvetenskaper och teknik**

**Helena Backman, 2018**

**Rubrik: Etablering och karaktärisering av organotypiska 3D co-kulturer med tumör- och T-celler**

**Pro gradu-avhandling: 67 sidor**

**Nyckelord: 3D co-kultur, tumörmikro miljö, extracellulärt matrix, prostatacancer, bröstcancer, T-cell, FOXP3**

---

**Abstrakt**

Epitela tumörer bildas då normala celler omvandlas till tumörceller som börjar dela på sig okontrollerat till följd av genetiska eller externa faktorer. Till de vanligaste epitela cancertyperna hör prostatacancer (PrCa) hos män och bröstcancer (BrCa) hos kvinnor. För att utveckla och testa läkemedel mot dessa cancertyper krävs bra modellsystem som hämmar den biologiska tumör mikromiljön (TME). Eftersom det i biologisk tumörvävnad finns extracellulärt matrix (ECM) och flera typer av immunceller behövs tredimensionella (3D) co-kulturer för att efterlikna immuncellernas samspel med tumörceller och TME. Målet med detta pro gradu-projekt var att etablera och optimera en stabil 3D co-kulturmodell för cancer och T-celler. Vidare var målet att undersöka hur PrCa- (LNCaP) och BrCa- (MDA-MB-231) organoidernas tillväxt, differentiering och invasion påverkas av T-cellerna. Därutöver undersöktes vilken effekt FOXP3-överuttryck (FOXP3<sup>+</sup>) i T-celler hade på tumörorganoidernas fenotyp. Etableringen och optimeringen resulterade i en lyckad, stabil 3D co-kultur. Resultaten visade att tillsatsen av T-celler till co-kulturen ökade tillväxt och differentiering hos LNCaP-organoiderna medan T-cellerna bidrog till ökad invasion hos de aggressiva MDA-MB-231-organoiderna. FOXP3<sup>+</sup> i T-celler resulterade i en rundare, mer väldifferentierad morfologi hos PrCa-organoiderna. Hos BrCa-organoiderna medförde tillsatsen av FOXP3<sup>+</sup> T-celler ökad tumörtillväxt och invasion. Dessa resultat tyder på att FOXP3<sup>+</sup> T-celler ökar tillväxten hos de aggressiva MDA-MB-231-cellerna och fungerar som en inducerare av invasion. Det nya fungerande modellsystemet kunde användas för vidare läkemedelsforskning inom fältet för immunonkologi.

**ÅBO AKADEMI UNIVERSITY**  
**Faculty of Science and Engineering**  
**Helena Backman, 2018**

**Headline: Establishment and characterisation of organotypic 3D co-cultures with tumor and T cells**

**M.Sc. thesis: 67 pages**

**Keywords: 3D co-culture, tumor micro environment, extracellular matrix, prostate cancer, breast cancer, T cell, FOXP3**

---

## **Abstract**

Epithelial tumors arise when normal cells transform to tumor cells which begin to uncontrollably due to genetic external factors. One of the most common types of cancer in men is prostate cancer (PrCa), and in women breast cancer (BrCa). The development and testing of drugs against these cancer types, require adequate model systems that mimic the biological tumor micro environment (TME). In three-dimensional (3D) cell culture models, the tumor cells have the ability to form tumorlike organoids that present the traits of tumors. Co-cultures are required to mimic the interaction of immune cells and tumor cells in extracellular matrix (ECM) and moreover to visualize the role of T cells in the TME. The aim with this Master's thesis project was to establish and optimize a substantial 3D co-culture model for tumor and immune cells. Further, the aim was to study how the growth, differentiation and invasion of the PrCa (LNCaP) and BrCa (MDA-MB-231) tumor organoids was affected by the addition of T cells to the co-culture. Moreover, we studied which effect FOXP3 overexpression (FOXP3<sup>+</sup>) in T cells had on the tumor organoids phenotype. The establishment and optimization, resulted in a stable 3D co-culture model. Results showed that addition of T cells to the culture increased growth and differentiation of the LNCaP organoids whilst the T cells induced increased invasion of the aggressive MDA-MB-231 organoids. The addition of FOXP3<sup>+</sup> T cells to the culture, resulted in a rounder and more well differentiated morphology of the PrCa organoids. Moreover, the FOXP3<sup>+</sup> T cells increased the growth and invasion of the BrCa organoids. The new functioning model system could be used for further research in drug development, in the field of immune-oncology.

# INNEHÅLLSFÖRTECKNING

|  |           |
|--|-----------|
| <b>FÖRKORTNINGAR OCH BETECKNINGAR .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1. INLEDNING.....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>2. LITTERATURÖVERSIKT .....</b>   | <b>5</b>  |
| 2.1 Epitelcancer.....  | 5         |
| 2.2 Tumörens mikromiljö .....  | 6         |
| 2.3 T-celler i tumörens mikromiljö .....   | 7         |
| 2.4 T-celler infiltreras i prostatacancer- respektive bröstcancervävnad.....         | 9         |
| 2.5 FOXP3-proteinet i regulatoriska T-celler .....                                   | 9         |
| 2.6 In vitro-cancermodellssystem.....  | 11        |
| 2.6.1 2D-cellkultur .....  | 11        |
| 2.6.2 Organotypisk 3D-cellkultur .....   | 12        |
| <b>3. MÅLSÄTTNING .....</b>  | <b>15</b> |
| <b>4. MATERIAL OCH METODER.....</b>  | <b>16</b> |
| 4.1 Cellinjer .....  | 16        |
| 4.2 2D-cellkultur .....  | 16        |
| 4.3 Cellräkning.....   | 17        |
| 4.4 Aktivering av T-celler .....   | 17        |
| 4.5 Organotypisk 3D co-kultur.....   | 18        |
| 4.5.1 3D co-kultur med tumörceller och T-celler .....                                | 18        |
| 4.6 Real-tids uppföljning av 3D co-kulturerna .....                                  | 20        |
| 4.7 Visualisering av levande organoider vid slutpunkten .....                        | 20        |
| 4.7.1 Färgning av levande celler med Calcein AM.....                                 | 20        |
| 4.7.2 Tredimensionell visualisering med konfokalmikroskop.....                       | 21        |
| 4.7.3 Visualisering av tumörorganoiderna med spinning disk konfokalmikroskopet ..... | 22        |
| 4.8 Segmentering och morfometrisk bildanalys av tumörorganoider .....                | 22        |
| 4.9 Kvantitativ analys och statistik .....   | 24        |
| 4.10 Fixering av 3D-organoider.....  | 24        |
| 4.11 Immunofluorescensfärgning.....  | 24        |
| 4.11.1 Immunofluorescensfärgning av biomarkörer .....                                | 24        |
| 4.11.2 Visualisering av de immunofluorescensfärgade strukturerna .....               | 25        |
| 4.12 Viabilitetsanalys för att mäta proliferationskillnader mellan T-celler.....     | 26        |
| <b>5. RESULTAT .....</b>   | <b>27</b> |
| 5.1. Etablering av organotypisk 3D co-kultur.....                                    | 27        |
| 5.1.1 Visualisering av 3D co-kulturerna i realtid .....                              | 27        |
| 5.1.2 Optimering av cellantal.....   | 27        |
| 5.1.3 Optimering av ECM .....  | 28        |

|                  |   |           |
|------------------|---|-----------|
| <b>5.2</b>       | <b>Karaktärisering av organoiderna med immunhistokemisk färgning .....</b>                                | <b>30</b> |
| <b>5.3</b>       | <b>Visualisering och segmentering av tumörorganoidernas morfologi med kvantitativ bildanalys.....</b>     | <b>32</b> |
| <b>5.4</b>       | <b>Tumörorganoidernas tillväxt och morfologi påverkas vid tillsats av T-celler till co-kulturen .....</b> | <b>34</b> |
| 5.4.1            | Tillsats av T-celler leder till ökad proliferation och oregelbundhet i PrCa-organoider..                  | 34        |
| 5.4.2            | Tillsats av T-celler har endast små effekter på morfologin av BrCa- organoider .....                      | 35        |
| <b>5.5</b>       | <b>Tillsats av oaktiverade versus aktiverade T-celler till 3D co-kulturer .....</b>                       | <b>38</b> |
| <b>5.6</b>       | <b>Effekten av primära immunceller på tumörorganoiderna i co-kultur .....</b>                             | <b>40</b> |
| <b>5.7</b>       | <b>FOXP3 överuttryckande T-cellers inverkan på tumörorganoiderna i co-kulturen .</b>                      | <b>42</b> |
| 5.7.1            | Optimering av antalet FOXP3 <sup>+</sup> T-celler för co-kulturen .....                                   | 42        |
| 5.7.2            | FOXP3 <sup>+</sup> T-celler inducerar epitelisk differentiering av PrCa-organoider .....                  | 45        |
| 5.7.3            | FOXP3 <sup>+</sup> i T-cellerna ökar invasion och tillväxt av BrCa-organoider .....                       | 45        |
| <b>6.</b>        | <b>DISKUSSION .....</b>   | <b>48</b> |
| <b>6.1</b>       | <b>Biologiskt relevanta 3D-cancermodeller.....</b>  | <b>48</b> |
| <b>6.2</b>       | <b>Etablering av den tredimensionella co-kulturmodellen .....</b>   | <b>49</b> |
| <b>6.3</b>       | <b>T-celler påverkar tumörorganoidernas proliferation och morfologi.....</b>                              | <b>50</b> |
| <b>6.4</b>       | <b>T-cellernas aktivering hade inga markanta effekter på tumörmorfologin .....</b>                        | <b>51</b> |
| <b>6.5</b>       | <b>FOXP3-överuttryck i T-celler bidrar till ökad invasion hos BrCa-organoider.....</b>                    | <b>53</b> |
| <b>6.6</b>       | <b>Slutsatser och fortsatt forskning .....</b>  | <b>54</b> |
| <b>7.</b>        | <b>TILLKÄNNAGIVANDEN.....</b>   | <b>57</b> |
| <b>8.</b>        | <b>LITTERATURFÖRTECKNING .....</b>  | <b>58</b> |
| <b>8.1</b>       | <b>Artiklar .....</b>   | <b>58</b> |
| <b>8.2</b>       | <b>Webbsidor .....</b>  | <b>65</b> |
| <b>BILAGA 1:</b> | <b>RECEPT .....</b>   | <b>66</b> |

## FÖRKORTNINGAR OCH BETECKNINGAR

|                    |   |
|--------------------|---|
| 2D                 | Tvådimensionell   |
| 3D                 | Tredimensionell   |
| ACT                | Adaptiv cellterapi (eng. adoptive cell therapy)   |
| AMIDA              | Automatiserad morfometrisk blidanalys (eng. automated morphometric image data analysis)       |
| APC                | Antigenpresenterande cell (eng. antigen-presenting cell)                                      |
| ATCC               | American Type Culture Collection  |
| BrCa               | Bröstcancer   |
| CAF                | Cancer-associerad fibroblast (eng. carcinoma-associated fibroblast)                           |
| CO <sub>2</sub>    | Koldioxid   |
| CSC                | Cancerstamcell (eng. cancer stem cell)  |
| CTLA               | Cytotoxiskt T-lymfocyt-associerat protein (eng. cytotoxic T-lymphocyte-associated protein)    |
| dsRed              | Eng. Discosoma sp. Red fluorescent protein  |
| ECM                | Extracellulärt matrix (eng. extra cellular matrix)  |
| EMT                | Epitel-mesenkymal övergång (epithelial-mesenchymal transition)                                |
| FBS                | Fetalt kalvserum (eng. fetal bovine serum)  |
| FOX                | Forhead box (eng. forkhead box)   |
| FOXP3              | Eng. Forkhead box P3)   |
| FOXP3 <sup>+</sup> | FOXP3 överuttryck   |
| GFP                | Grönt fluorescerande protein (eng. green fluorescent protein)                                 |
| GITR               | glukokortikoidinducerad tumornekrosfaktor (eng. glucocorticoid induced tumor necrosis factor) |
| IFN                | Interferon  |
| IF                 | Immunofluorescens   |
| IL                 | Interleukin   |
| LSCM               | Laser skannande konfokalmikroskop (eng. laser scanning confocal microscope)                   |
| MHC                | Histokompatibilitetskomplex (eng. major histocompatibility complex)                           |
| MSC                | Mesenkymal stamcell (eng. mesenchymal stem cell)  |
| NADH               | Dehydrogenas  |

|       |   |
|-------|---|
| NEAA  | Icke-essentiella aminosyror (eng. non-essential amino acid)                   |
| PBMC  | Perifer blod mononukleär cell (eng. peripheral blood mononuclear cell)        |
| PBS   | Fosfatbuffrad salinlösning (eng. phosphate buffered saline)                   |
| PD    | Programmerad död (eng. programmed death)                                      |
| PD-L  | Programmerad dödsligand (eng. programmed death-ligand)                        |
| PFA   | Paraformaldehyd (eng. paraformaldehyde)                                       |
| PrCa  | Prostatacancer  |
| TCR   | T-cellreceptor (eng. T cell receptor)   |
| TGF   | Transformerande tillväxtfaktor (eng. Transforming growth factor)              |
| TIL   | Tumörinfiltrerande lymfocyt (eng. tumor-infiltrating lymphocyte)              |
| TME   | Tumörens mikromiljö (eng. tumor microenvironment)                             |
| Treg  | Regulatorisk T-cell (eng. regulatory T cell)                                  |
| VEGF  | Vaskulär endotelcellstillväxtfaktor (eng. vascular endothelial growth factor) |
| WHO   | Världshälsoorganisationen (eng. World Health Organization)                    |
| WST-8 | Vattenlösligt tetrazoliumsalt (eng. water-soluble tetrazolium salt)           |

## 1. INLEDNING

Cancer är den näst största dödsorsaken runt om i världen och resulterade i 9,6 miljoner dödsfall under 2018, enligt Världshälsoorganisationen (eng. World Health Organisation, WHO) (webbsidan <https://www.who.int/cancer/en/>, 16.12.2018). En av de mest förekommande typerna av cancer hos män är prostatacancer (PrCa) medan bröstcancer (BrCa) hör till de vanligaste hos kvinnor. Cancertumörens utveckling börjar då normala celler omvandlas till tumörceller som börjar dela på sig okontrollerat och trycka på omgivande vävnad. Denna utveckling kan påbörjas som följd av att de normala cellerna påverkas av genetiska faktorer och/eller utvärtes faktorer och denna okontrollerade celledelning kan påbörjas i så gott som vilken del av kroppen som helst. Den växande cellmassan kan invadera och metastasera i den omgivande vävnaden och ta över den normala vävnaden.

Läkemedelsforskningen för att utveckla nya behandlingar som hämmar tumörtillväxt och metastasering blir allt viktigare. Ett stort område inom läkemedelsforskningen är så kallad immuno-onkologi (Marshall & Djamgoz, 2018). I tumörvävnad finns en samling av normala immunceller som T-, B- och NK-celler. Dessa immunceller associerar med cancercellerna och det extracellulära matrixet (eng. extra cellular matrix, ECM) och tillsammans med tumörcellerna bildar dessa tumörens mikromiljö (eng. tumor micro environment, TME) (Chen et al., 2015). I TME får immuncellerna immunosuppressiva egenskaper och kan inducera ökad tumörtillväxt och invasion. Vid immunoterapi av cancer används egenskaperna av kroppens egna normala immunförsvar för att inducera en systemisk respons mot cancercellerna och på så sätt hindra och förstöra cancercellernas funktion (Marshall & Djamgoz, 2018). Både de maligna och icke-maligna komponenterna i TME, samt förmedlarna inom den intercellulära signaleringsräckorna är potentiella mål för immunoterapi. Undersökning av immuncellernas roll i TME och deras effekt på tumörens morfologi fungerar som grund för att utveckla modeller som kan användas för att studera läkemedelsrespons av antikroppar, immunaktivatorer och immunosuppressiva läkemedel.

Målet med detta projekt var att etablera en stabil tredimensionell (3D) co-kulturmodell innehållande tumörceller och immunceller samt biologiskt relevant ECM, för att kunna studera T-cellernas effekt på tumörmorfologin. Effekten av T-cellernas aktivering studerades för att ta reda på ifall aktiveringen påverkar PrCa- samt BrCa-organoidernas



morfologi jämfört med oaktiverade T-cellerna. Ytterligare studerades effekterna på tumörmorfologin då T-celler tillsattes till modellen samt hur Forkhead box-protein 3 (eng. Forkhead box P3, FOXP3) överuttryck (FOXP3<sup>+</sup>) i T-celler påverkade tumörmorfologin.

## 2. LITTERATURÖVERSIKT

### 2.1 Epitelcancer

Epitelcancer eller carcinom är den vanligaste typen av cancer och får sin början i epitelceller vars DNA har skadats eller förändrats som följd av t.ex. en mutation. Epitelcancer bildas på olika ytor i kroppen som t.ex. på ytan av olika organ eller i epitelcellerna i gångar och håligheter i kroppen. Denna form av cancer kan bildas i vissa endokrina organ som har specialiserade epitelceller och kallas då adenocarcinom. Cancerceller blir elakartade (maligna) då cellerna förlorar sin polaritet och cell-cell adhesion. Det sker en så kallad epitel-mesenkymal övergång (eng. epithelial-mesenchymal transition, EMT), vilket leder till att cellerna får invasiva och migratoriska egenskaper och detta betyder att cellerna invaderar och sprider sig till omgivande vävnader och organ. (Huang et al., 2015). Dessa invasiva cancerceller kan dock också metastasera d.v.s. sprida sig till mer avlägsna organ och därmed orsaka svår skada och dödsfall.

I världsvärlden är PrCa den vanligaste formen av epitelcancer efter hudcancer, hos män (Jemal et al., 2011; Ilic et al., 2013; Packer & Maitland, 2016; Pullar & Shah, 2016). Enligt världshälsoorganisationens cancerprofiler för enskilda länder står prostatacancer för 14,5 % av dödsfallen i Finland (webbsidan [http://www.who.int/cancer/country-profiles/fin\\_en.pdf?ua=1](http://www.who.int/cancer/country-profiles/fin_en.pdf?ua=1), 16.12.2018). Prostatacancer utvecklas som följd av ett invecklat samarbete av både genetiska faktorer och möjligtvis miljöberoende faktorer (Pullar & Shah, 2016). Ökad tillväxt och proliferering av cancercellerna leder till att cellmassan trycker på den normala epitelvävnaden så att basalmembranet skadas och tumören trycks mot lumen av prostatan (Packer & Maitland, 2016). Då cancercellerna blir maligna, förlorar dessa celler kontakten med det basala cellagret och cancercellerna tränger sig igenom det basala membranet (Pullar & Shah, 2016).

BrCa som är en annan typ av epitelcancer är den vanligaste canceren och samtidigt den näst vanligaste dödsorsaken hos kvinnor (Weigelt et al., 2005). Enligt WHO står bröstcancer för 15,8 % av dödsfallen bland kvinnor (webbsidan [http://www.who.int/cancer/country-profiles/fin\\_en.pdf?ua=1](http://www.who.int/cancer/country-profiles/fin_en.pdf?ua=1), 16.12.2018). BrCa blir ofta väldigt invasiv och kan metastasera till lymfknutarna, lungorna och andra organ. Ifall tumören inte upptäcks i god tid ökar risken för mortalitet. Det är dessa invasiva

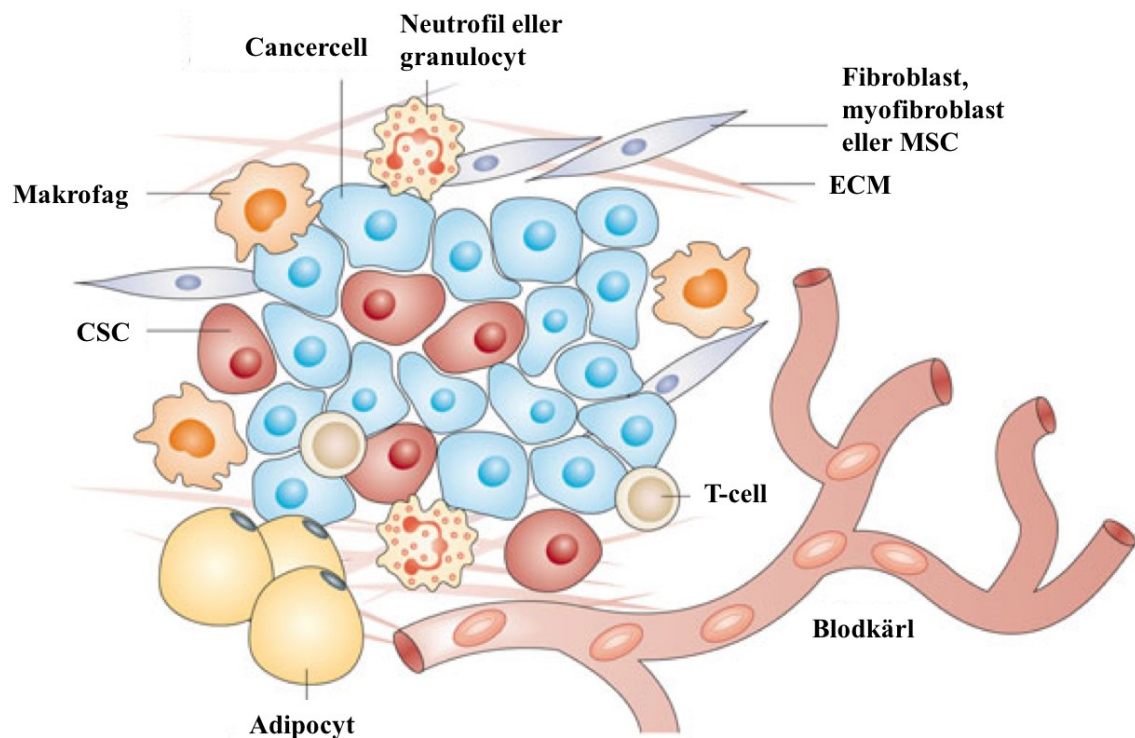
metastaser, som utvecklas från normal bröstvävnad som bidrar till den höga mortaliteten bland bröstcancerpatienter (Weigelt et al., 2005).

## 2.2 Tumörens mikromiljö

För att en epitelcancertumör ska kunna växa och metastasera behöver tumören andra celler runt om sig. Cancercellerna har kontakt med de omgivande cellerna i vävnaden. TME är därför en viktig faktor då tumörens tillväxt, utveckling och metastasering studeras (Figur 1). Tumören skapar sin TME och denna miljö styrs av signaler från tumörcellerna. Till exempel en nedreglerad eller förhöjd produktion av olika stromakomponenter kan försnabba tumörbildning och öka risken för allvarlig metastasering (Chen et al., 2015). Likaså kan ökad invasion som induceras av TME-komponenter försnabba tumörbildning (Chen et al., 2015). Stroman i en typisk TME består av fibroblaster, myofibroblaster, neuroendokrinceller, adipocyter (fettceller), immunceller (t.ex. T-celler) och inflammatoriskaceller (t.ex. makrofager, neutrofiler eller granulocyter), blod- och lymfkärl samt ECM. Generellt sätt är stroman en viktig komponent för att upprätthålla homeostasen i kroppen och vissa komponenter i stroman reglerar bl.a. immunsuppression och hindrar carcinogenes (Ozdemir et al., 2014; Rhim et al., 2014). Då normal stroma omvandlas till tumör-associerad-stroma, kan stroman istället få cancerfrämjande egenskaper. Till exempel lockas flera olika T-effektorceller (eng. T effector cell) från immunförsvaret till stroman (Chen et al., 2015). Dessa immunceller kan dock inte hindra tumörtillväxten eftersom deras anti-tumör funktioner har nedreglerats, till följd av signaler från tumören. Stroman stimuleras även bland annat till att producera olika cytokiner och tillväxtfaktorer som cancercellerna har nytta av. Stroman runt tumören består av cancer-associerade fibroblaster (carcinoma-associated fibroblasts, CAFs), myofibroblaster samt uppvisar omprogrammerad metabolism och ett förändrat ECM (Chen et al., 2015).

Bildningen av organspecifika tumörer beror även på infiltrationen av immunceller och hur välutvecklade blodkärlen i TME är. Dessa tillsammans förser cancer-stamcellerna och de andra cancercellerna med en näringsrik och mångsidig miljö för signalering mellan de olika celltyperna (Pattabiraman & Weinberg, 2014; Chen et al., 2015). Flera tumörtyper har cancerstamceller (eng. cancer stem cell, CSC) i sin mikromiljö som bland annat underlättar tumören bilda resistens mot olika cytotoxiska ämnen som används vid

kemoterapin. CSC:s reagerar också på immunförsvärssignaler. En annan typ av celler som tumören lockar till sig är mesenkymala stamceller (eng. mesenchymal stem cell, MSC) som samlas runt tumören och blir en del av tumörstroman. MSC:s kommunicerar sedan aktivt med flera andra celltyper i närheten, och styr på så sätt den biologiska regleringen av tumörutvecklingen (Chen et al., 2015).



Figur 1. Tumörens mikromiljö. För att en tumör ska fungera behöver den kontakt med andra celler samt kontakt till blodkärl för tillgång till syre och näring. (Bild modifierad från Pattabiraman & Weinberg, 2014).

### 2.3 T-celler i tumörens mikromiljö

Lymfocyter är celler som cirkulerar i blodet och överförs till vävnader runt om i kroppen. Från vävnaderna återförs lymfocyterna till blodet via det lymfatiska systemet. T-lymfocyter eller T-celler finns runt om i kroppen i olika vävnader, likaså i cancervävnad (Sharpe & Mount, 2015). T-celler är viktiga för immunresponsen och kan förmedla långvariga, antigen-specifika minnesresponsen i olika T-effektorceller. T-cellerna skiljer sig från andra lymfocyter eftersom de har så kallade T-cellreceptorer (eng. T cell receptor, TCR) på cellytan. TCR är ett stort transmembrankomplex med flera underenheter som styr den antigen-specifika aktiveringen av T-cellerna (Sharpe & Mount, 2015).

Korrelationen mellan dessa immunceller och deras inverkan i tumörvävnad har undersökts i flera studier. I dessa studier har det visats att det i tumörvävnaden finns omfattande populationer av olika lymfocyter som bland annat T-celler, B-celler, NK-celler (eng. natural killer cells) och makrofager. Tumörinfiltrerande lymfocyter (eng. tumor-infiltrating lymphocyte, TIL) är till exempel  $CD4^+$  T-hjälparcellerna eller de cytotoxiska  $CD8^+$  T-cellerna. Dessa celler uttrycker markörer för bland annat CD25 och transferinreceptorer. TIL:s i allmänhet producerar och utsöndrar vaskulära endotelcellstillväxtfaktorer (eng. vascular endothelial growth factor, VEGF) och fibroblastiska tillväxtfaktorer, som kan inducera lymfangiogenes och angionesen. Utvecklingen av nya lymf- och blodkärl från de redan existerande kärlen kan resultera i en spridning av tumörcellerna genom lymfsystemet till andra lymfknutar runtom i kroppen (Hu et al., 2015).

För att åstadkomma en immunrespons måste T-cellerna känna igen olika antigener för att kunna proliferera och differentiera. Detaljerna i signalmaskineriet som sätts igång då T-celler aktiveras är väl kända och signalsystemet är beroende av ett strikt reglerade och balanserade receptor-stimulerade biokemiska signaler (Oeste & Alarcón, 2016). Då TCR binder till en okänd antigen, bunden till ett stort histokompatibilitetskomplex (eng. major histocompatibility complex, MCH) på antigenpresenterande celler (eng. antigen-presenting cells, APC) kommer flera makromolekylära komplex som t.ex. olika signalprotein att förändra genuttrycket som reglerar differentiering (Oeste & Alarcón, 2016). Dessa förändringar bestämmer om cellerna differentieras till T-hjälparceller eller till T-minnesceller. Signalmaskineriet sätts igång då TCR kommer i kontakt med antigener. TCR har också andra underenheter som t.ex. CD3 som styr aktiveringen av T-celler. Likaså gör CD28-receptorer och integriner som finns vid stället där TCR och MHC-receptorerna möts. Dessa tillsammans bestämmer ifall en T-cells immunreaktion sker. TCR aktiverar sedan flera olika proteintyrosinkinaser och styr många viktiga signalräckor i immunresponsen (Oeste & Alarcón, 2016).

Regulatoriska T-celler (eng. regulatory T cell, Treg) är en fenotypiskt distinkt typ av specialiserade T-celler som är ansvariga över att optimera immunresponser runt om i kroppen och upprätthålla homeostasen (Kondělková et al., 2010). Tregs kan förhindra andra T-cellers proliferation och cytokinproduktion och spelar en viktig roll i

autoimmunitet men orsakar på så sätt också immunosuppression i vävnader (Abo-Elein et al., 2008). Tregs upprätthåller immuntoleransen och hindrar inflammation genom att speciellt blockera aktiviteten av cytotoxiska T-celler och proliferationen av T-hjälparceller. Då Tregs finns i närheten av tumören, främjar de invasion och metastasering av tumörceller vilket kan leda till drastiska förändringar hos cancerpatienten (Chen et al., 2015). Själva migreringen av T-celler till tumören styrs av kemokiner (eng. chemokines), medan T-cellernas aktivitet nära tumören hindras av kväveoxid. Detta leder till immunosuppression som hjälper tumören att växa ifred utan att immunsystemet försöker förstöra cancercellerna. MSC:s medverkan i tumörbildning och resistens är välkänt men exakt hur MSC:s styr Tregs tillväxt och utveckling samt immunosuppression, är inte än så väl studerat. (Chen et al., 2015).

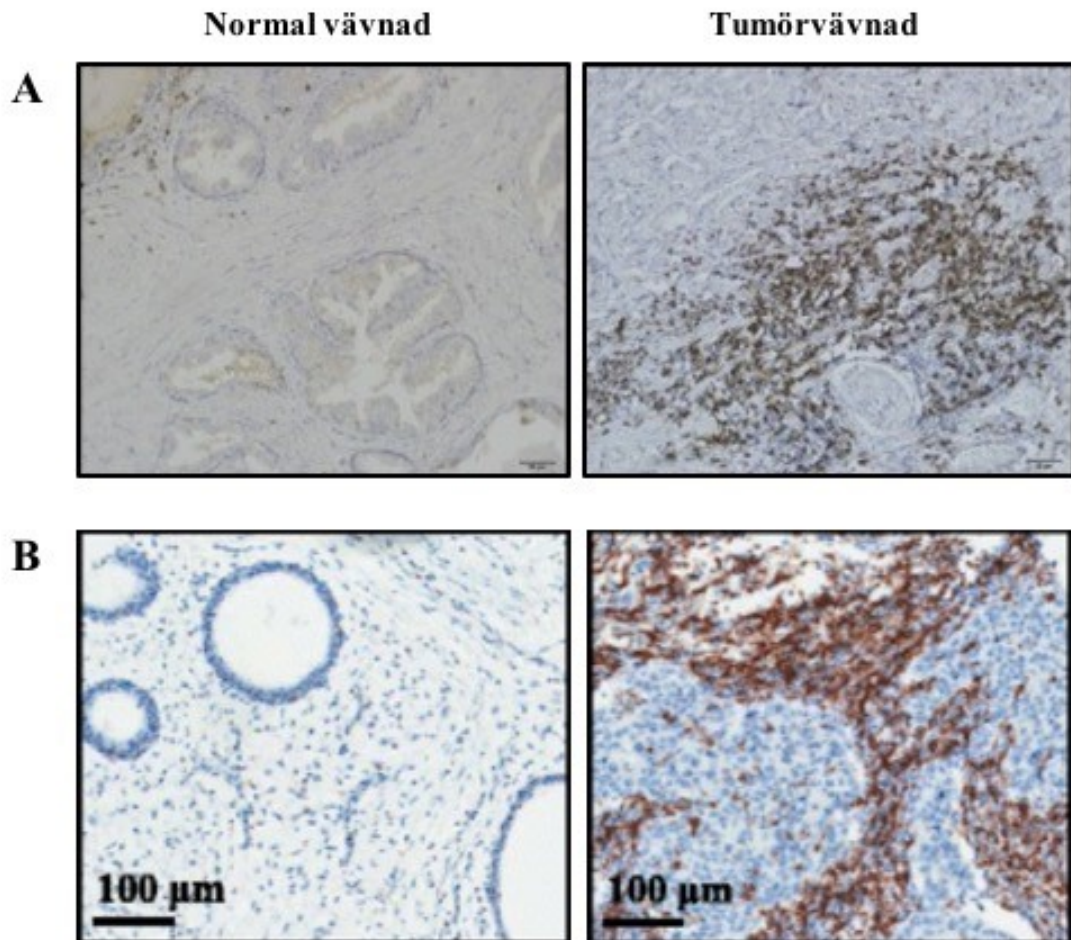
#### **2.4 T-celler infiltreras i prostatacancer- respektive bröstcancervävnad**

Ökad migrering av olika TIL:s till PrCa-vävnad har påvisats i flera olika studier. I en studie gjord av Hu et al. (Hu et al., 2015) rapporterades att PrCa-vävnad från patienter har mera CD4+ T-celler än den näraliggande normala prostatavävnaden (Pr-vävnad). Detta visades bland annat med immunohistokemisk färgning av T-celler i respektive vävnader (Figur 2A). Liknande resultat har även observerats av Miller et al. (Miller et al., 2006) och Kiniwa et al. (Kiniwa et al., 2007).

Ökade mängder av TIL:s har likaså påvisats i BrCa-vävnad. I en studie gjord av Sawe et al. (Sawe et al., 2016) rapporterade att flera olika T-celler infiltreras i BrCa-vävnad och att dessa finns i mycket högre antal i tumörvävnaden jämfört med mängden T-celler som finns i den omgivande normala bröstvävnaden. Sawe et al. visade bland annat med immunohistokemiska färgning av vävnader att mängden CD4+ T-celler i BrCa-vävnad är högre än i normal bröstvävnad (Figur 2B).

#### **2.5 FOXP3-proteinet i regulatoriska T-celler**

FOXP3-proteinet hör till familjen av forkheadbox (eng. forkhead box, FOX) transkriptionsfaktorer. Genen för forkhead hittades i *Drosophila melanogaster* (Weigelt et al., 1989). FOXP3 kännetecknas av ett helixformat forkhead-DNA-bindande domän (Weigelt et al., 1989) och kan binda till cirka 700 olika gener (Figur 3). Flera av dessa gener är upp- eller nedreglerade i Tregs som överuttrycker FOXP3 (Zheng et al., 2007).

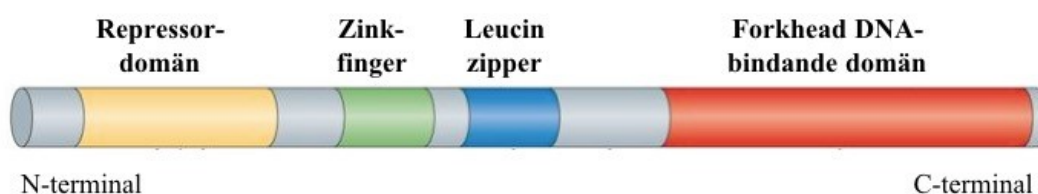


Figur 2. Ackumulering av T-celler i PrCa- och BrCa-vävnader. Immunohistokemi färgning av kliniska vävnadsprov från (A) PrCa- och (B) BrCa-patienter visade att fler CD4<sup>+</sup> T-celler infiltreras i PrCa- samt BrCa-vävnad än i den normala omgivande vävnaden (Pr-vävnad). (Bilden är modifierad från Hu et al., 2015 och Sawe et al., 2016.)

Detta betyder att FOXP3 i Tregs fungerar både som en transkriptionsaktivator och som en repressor (Zheng et al., 2007). FOXP3 som transkriptionsfaktor, är essentiell för utvecklingen och funktionen av normalt fungerande CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Tregs (Kim et al., 2007). Förändringar i genuttrycket i Tregs är kopplat till Treg-cellernas förmåga att förstärka eller dämpa immunresponser (Tang & Bluestone, 2008).

Överuttryck av FOXP3 inducerar en Treg-fenotyp i T-celler. Detta betyder att antalet Treg-associerade receptorer på cellytan ökar samt att cytokinproduktionen inhiberas. FOXP3<sup>+</sup> Tregs förhindrar flera immuncellers funktion, så som andra T-lymfocytter, B-celler och makrofagers aktivitet, via flera olika signaleringsräckor. Denna immunosuppressiva aktivitet gynnar tumörcellernas tillväxt i cancervävnad. Till exempel då mängden CD8<sup>+</sup> T-celler minskar och ersätts av flera FOXP3<sup>+</sup> Tregs i tumörvävnaden,

blir prognosen ofta sämre i flera cancertyper. Detta sker till exempel i bröstcancervävnad (Bates et al., 2006). Tregs kan hämma funktionen av immunceller antingen direkt via cell-cell kontakt eller indirekt via sekretion av olika anti-inflammatoriska molekyler (Abo-Elein et al., 2008). FOXP3<sup>+</sup> Tregs utsöndrar till exempel inhiberande cytokiner, så som interleukiner och transformerande tillväxtfaktor 1 $\beta$  (eng. Transforming growth factor, TGF) som inhiberar effektor T-celler (Kim et al., 2014). Ansamlingar av Tregs i de primära tumörerna har associerats med ökad risk för metastasering i flera olika tumörmodeller, vilket underlättar frigörelsen och spridningen av tumörcellerna (Foley, 2011; Halvorsen et al., 2014).



Figur 3. Illustration över FOXP3-proteinets uppbyggnad. C-terminalen av proteinet består av ett kännetecknande helixformat forkhead DNA-bindande domän. Efter det DNA-bindande domänet följer leucin zipper-regionen och zinkfinger regionen. N-terminalen består av ett repressordomän. (Bild modifierad från Ramsdell & Ziegler, 2014.)

## 2.6 In vitro-cancermodellssystem

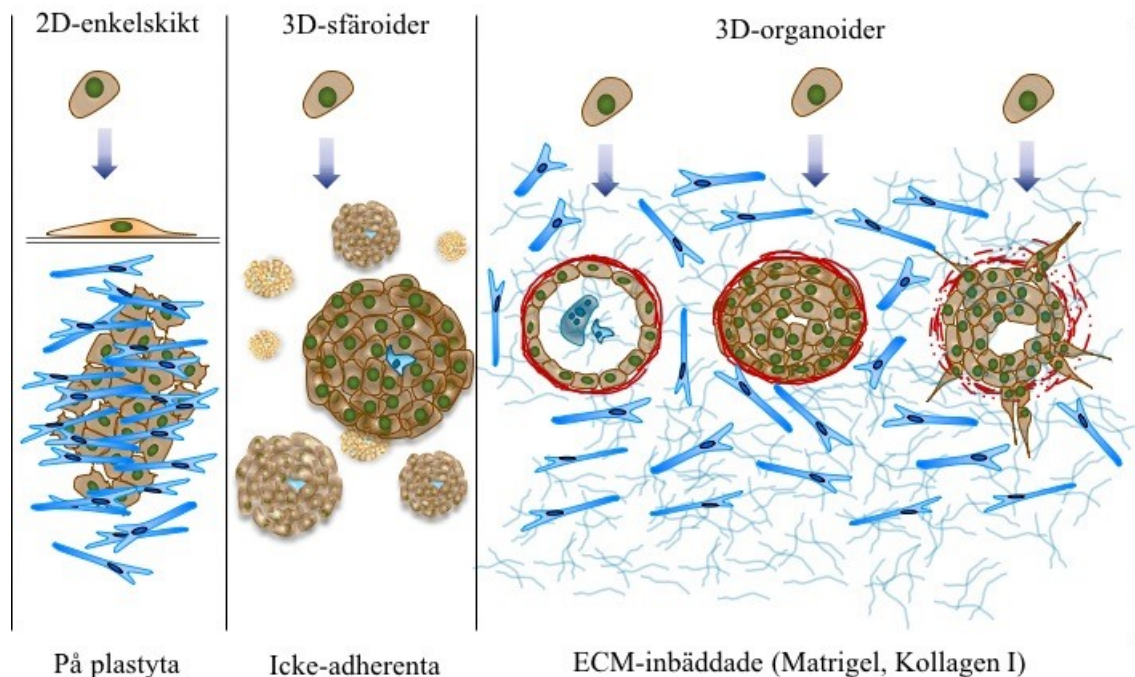
För tillfället är det brist på biologiskt relevanta in vitro-modellssystem där cancerceller kan samverka med immunceller i 3D, så som de gör i in vivo tumörer. Eftersom immunceller både hindrar tumörcellers proliferation men kan även främja metastasering, vore det väldigt viktigt att utveckla nya, fungerande in vitro cellmodeller som verkligen imiterar tumör- och stromavävnaden runt tumören. Att efterlikna TME är viktigt för att kunna studera läkemedelsresponser, lokal invasion och läkemedelsresistens i cancerceller i cellkultur (Härmä et al., 2014; Chen et al., 2015).

### 2.6.1 2D-cellkultur

I människokroppen är celler naturligt i kontakt med varandra och omgivna av ECM. I de vanligaste och mest använda cellmodellerna odlas cellerna dock på en plastyta i en sådan miljö som endast främjar proliferation av cellerna, så kallad tvådimensionell (2D) cellkultur (Antoni et al., 2015). Detta betyder att cancercellerna inte har en naturlig



mikromiljö, utan de växer som ett lager i ett odlingskärl med näringsmedium (Figur 4). Cellerna växer utan ECM, vilket betyder att cellerna förlorar sin förmåga att differentiera, polarisera, invadera, samt möjligheten att bilda kontakt med ECM-proteiner och andra celler i närheten (Härmä et al., 2010). 2D-celldkultur är därför inte en tillräckligt avancerad cellmodell för att studera tumörbildning eller rollen av tumörens mikromiljö (Härmä et al., 2010).



Figur 4. Olika cellkultur modeller. I traditionella 2D-celldkulturer växer cellerna på en plastyta och bildar ett enkelskikt. I vissa 3D-modeller bildar cellerna sfäroider i tillväxtmediumet. I organotypiska 3D-modeller är cellerna inbäddade i ECM som Matrigel eller kollagen I och cellerna bildar då differentierade organliknande organoider. (Bild modifierad från Åkerfelt et al., 2011.)

### 2.6.2 Organotypisk 3D-celldkultur

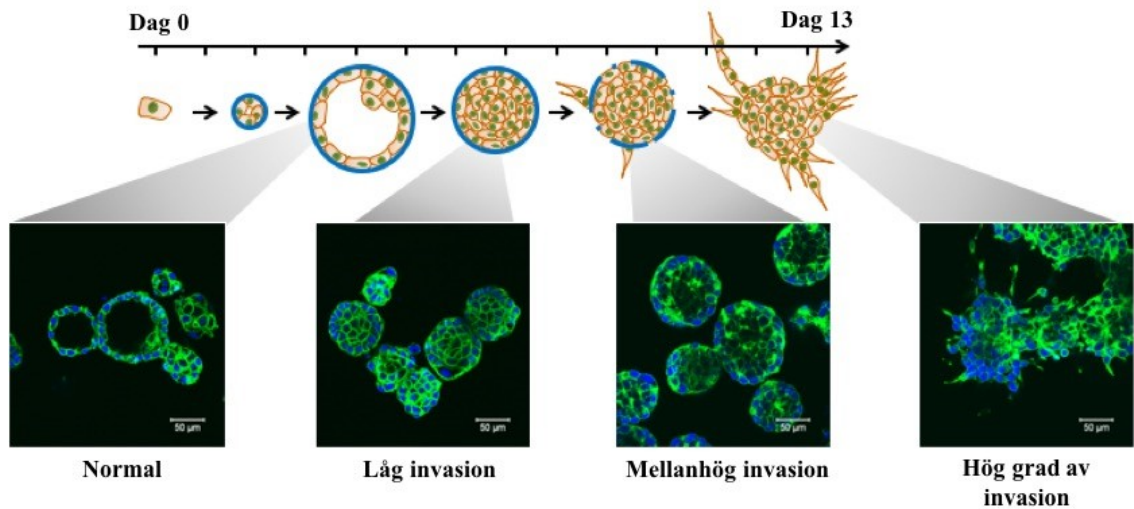
I organotypisk 3D-celldodling, är cancercellerna inte fästa vid plastskålen, utan odlas i biologiskt relevant ECM där cellerna kan interagera med varandra och bilda så kallade organoider (Åkerfelt et al., 2015). ECM utsöndras av celler till sin omgivning och fungerar som mekaniskt stöd och fästpunkter för celler (Sadava et al., 2013). ECM består av ett nätverk av fibrösa proteiner som kollagen, laminin, entaktin, proteoglykaner, tillväxtfaktorer och adhesiva proteiner och halterna av dessa proteiner varierar beroende på vilken typ av ECM det är frågan om (Antoni et al., 2015). ECM:s olika beståndsdelar formar dess fysikaliska egenskaper vilket påverkar t.ex. vävnaders elasticitet. ECM kan

även hjälpa celler att omorganiseras då t.ex. ny vävnad bildas. ECM har dessutom en viktig roll i cell-cell kontakter eftersom membranbundna proteiner (t.ex. integriner) i celler sträcker sig till ECM och utsöndrar kemiska signaler, som sedan andra cellers integriner reagerar på (Antoni et al., 2015).

I organotypisk 3D-celldkultur kommer cellerna i kontakt med varandra och ECM, som både tillsätts i odlingskärlet och som cellerna själv utsöndrar runtom sig. Celler kan t.ex. odlas i Matrigel som är naturlig produkt. Matrigelen består av ECM-protein som extraherats från Engelbreth-Holm-Swarm tumörceller i möss (Hughes et al., 2010). Vissa epitela cancercellinjer visar ökad differentiering, polarisation och invasion i Matrigel då till exempel kollagen tillsätts till Matrigelen (Kikuchi et al., 2011; Fang et al., 2014).

Riktiga vävnader och organ är inte uppbyggda av endast en typ av celler utan består av komplexa strukturer av flera olika typer av celler som är i kontakt med ECM, blodkärl, nerver och bindvävnad. Organotypisk cellodling har bevisats vara mer fysiologiskt relevant för cellernas proliferation, respons på olika stimulin, migration, metabolism av läkemedel, cancercellers invasion, eftersom cellerna i en 3D-odling får växa i mer naturlig miljö och bilda små organiska strukturer (Figur 5) (Härmä et al., 2010; Fennema et al., 2013; Åkerfelt et al., 2015).

För tillfället finns det inte så mycket publicerade resultat där organotypiska 3D co-kulturer med T-celler använts. Huruvida T-cellerna påverkar morfologin av tumörorganoiderna i 3D co-kulturerna återstår att undersökas. Även betydelsen av FOXP3-överuttryck i T-cellerna som odlas i organotypisk co-kultur är inte än studerat, vilket betyder att mer forskning måste utföras. Det återstår att se vilken roll FOXP3-överuttryck har i TME och ifall de FOXP3 överuttryckande T-cellerna stimulerar tumörcellernas invasion.



Figur 5. Tumörbildning och invasion i 3D-kulturmodeller. Illustration över tumörceller i 3D-kultur. I 3D-modeller där tumörcellerna inbäddas i ECM får växa i mer naturlig miljö och bilda små organiska strukturer. Från en tumörcell bildas multicellulära organoider som kan utveckla invasiva egenskaper. (Bild modifierad från Björk et al., 2016.)

### 3. MÅLSÄTTNING

Den första målsättningen med pro gradu-projektet är att etablera och karaktärisera organotypisk 3D co-kulturmodell som består av epitela tumörceller och immunceller. För att etablera stabila cellkulturer, ska cellantal och ECM-koncentrationer optimeras för att försöka efterlikna mikromiljön i patienternas verkliga tumörvävnad. Dynamiken och morfologin av de olika celltyperna kommer att uppföljas i realtid med IncuCyte FLR för att visualisera samspelet mellan de levande tumörorganoiderna och immuncellerna. Vid slutpunkten används spinning disk konfokalmikroskopet för att samla bilddata varefter konfokalbilderna kommer att segmenteras och tumörmorfologin kvantifieras med automatiserad morfometrisk bildanalys (eng. automated morphometric image data analysis, AMIDA) (Härmä et al., 2014). För att karaktärisera cellmodellerna kommer immunofluorescens färgning (eng. immunofluorescence staining, IF) att användas för att studera uttrycket av olika biomarkörer i co-kulturena. co-kulturena visualiseras med immunofluorescensfärgning

I den andra delena av projektet kommer effekten av immuncellernas tillsats till 3D-kulturer med PrCa- och BrCa-organoider studeras. Speciellt undersöks vilken effekt T-cellerna har på tumörorganoidernas morfologi. Vidare undersöks ifall aktiverade immunceller har annan effekt på tumörorganoidernas morfologi, jämfört med de oaktiverade kontroll immuncellerna. Dessutom kommer effekten av primära immunceller på tumörorganoiderna att undersökas. Projektets avsikt var även att studera FOXP3<sup>+</sup> i T-celler och vilken påverkan detta överuttryck har på tumörorganoidernas morfologi.

Specifika syften med detta pr gradu-projekt var att:

- 1) Etablera en stabil 3D co-kulturmodell för tumörceller och immunceller.
- 2) Undersöka vilken effekt, tillsats av immunceller har på tumörorganoidernas morfologi och funktion.
- 3) Undersöka om aktivering av immuncellerna påverkar tumörorganoidernas tillväxt och morfologi.
- 4) Undersöka vilken effekt FOXP3<sup>+</sup> i T-cellerna har på tumörmorfologin.

## 4. MATERIAL OCH METODER

### 4.1 Cellinjer

PrCa-cellerna som användes för denna studie var LNCaP-celler, erhållna från American Type Culture Collection (ATCC). LNCaP-cellerna är androgen-sensitiva adenocarcinoma epitelceller och dessa celler används ofta vid oncologiska studier. LNCaP-cellerna kan växa enskilt eller bilda orgaoider (Horoszewicz et al., 1983). Även BrCa-cellerna, MDA-MB-231 som användes var erhållna från ATCC. Både PrCa- och BrCa-cellerna var dsRed (eng. Discosoma sp. red fluorescent protein) märkta. Dessutom användes oaktiverade och aktiverade Jurkat T-celler i denna studie. Jurkat-cellerna är humana T-lymfocytceller som ofta används bland annat vid studier där T-cellsignalering undersöks. T-cellerna med FOXP3-överuttryck var också Jurkat T-celler men dessa hade en inducerad Treg-fenotyp. Alla dessa T-cellslinjer erhöles från Professor Riitta Lahesmaas forskargrupp (Åbo Bioteknikcentrum, Åbo universitet). Som primära celler, det vill säga celler som filtrerades från humant blod, användes en mix av immunceller, PBMC:s. Från PBMC:s hade T8<sup>+</sup>-celler filtrerats bort.

### 4.2 2D-cellkultur

Cellkultur kräver noggrann kunskap om hur varje cellinje ska upprätthållas, eftersom olika cellinjer kräver olika medium och hantering beroende på om cellerna är adherenta eller suspensions celler. Båda cancercellslinjerna är adherenta cellinjer vilket betyder att cellerna upprätthölls i 2D-cellkultur med RPMI-1640-medium (Sigma-Aldrich) med 10 % fetal bovin serum (FBS, Gibco), 1 % penicillin/streptomycin och 1 % L-glutamin, på polystyren-celldodlingsskålar, där cellerna fäste sig till botten av celldodlingsskålen. Cellerna odlades i en koldioxid (CO<sub>2</sub>) inkubator där temperaturen var +37 °C och CO<sub>2</sub>-halten var 5 %. Eftersom dessa adherenta celler fäster sig till skålen då de växer, användes en behandling av trypsin för att lösgöra cellerna från botten av skålen. Trypsin är ett serinproteas, det vill säga ett enzym som klyver nära lysin- och argininaminosyror. Denna klyvning bryter olika celladhesionsproteiner på cellytan vilket leder till att cellerna lossnar från celldodlingsskålen. Celldodlingsskålarna med cancercellerna tvättades således först med rumstempererad steril fosfatbuffrad salinlösning (eng. phosphate buffered saline, PBS). Då PBS-lösningen försiktigt aspirerats, tillsattes trypsin som inkuberades i två minuter. Efter trypsinbehandlingen tillsattes RPMI-medium till skålen och cellerna

överflyttades till sterila Falcon rör och centrifugerades i tre minuter i 200xG. Trypsinlösningen aspirerades försiktigt bort cellpelleten suspenderades i 1 ml RPMI-medium (+37 °C). Cellerna delades sedan i 1/10 förhållande till nya skålar. Mer RPMI-medium tillfördes till skålarna som sedan placerades i +37 °C för fortsatt tillväxt.

T-cellerna, i sin tur, var suspensionsceller, vilket betyder att cellerna växer fritt i medium i obehandlade polystyren-flaskor menade för suspensionskultur med icke adherenta celler. T-cellerna upprätthölls i 2D-celldkultur med RPMI-1640-medium (Sigma Aldrich) med med 10 % fetal bovin serum, 1 % penicillin/streptomycin, 1 % L-glutamin och 1 % icke-essentiella aminosyror (eng. non-essential amino acid, NEAA). Cellerna odlades i +37 °C med CO<sub>2</sub>-halten 5 %. Då cellerna skulle delas för fortsatt tillväxt, flyttades cellsuspensionen från flaskan till ett sterilt Falconrör och centrifugerades tre minuter i 200xG. Det gamla mediumet aspirerades sedan bort och cellerna suspenderades i några ml nytt medium. Cellerna delades i 1/20 förhållande till nya cellodlingsflaskor Mer RPMI-medium tillfördes i flaskorna som placerades i +37 °C för fortsatt tillväxt.

### **4.3 Cellräkning**

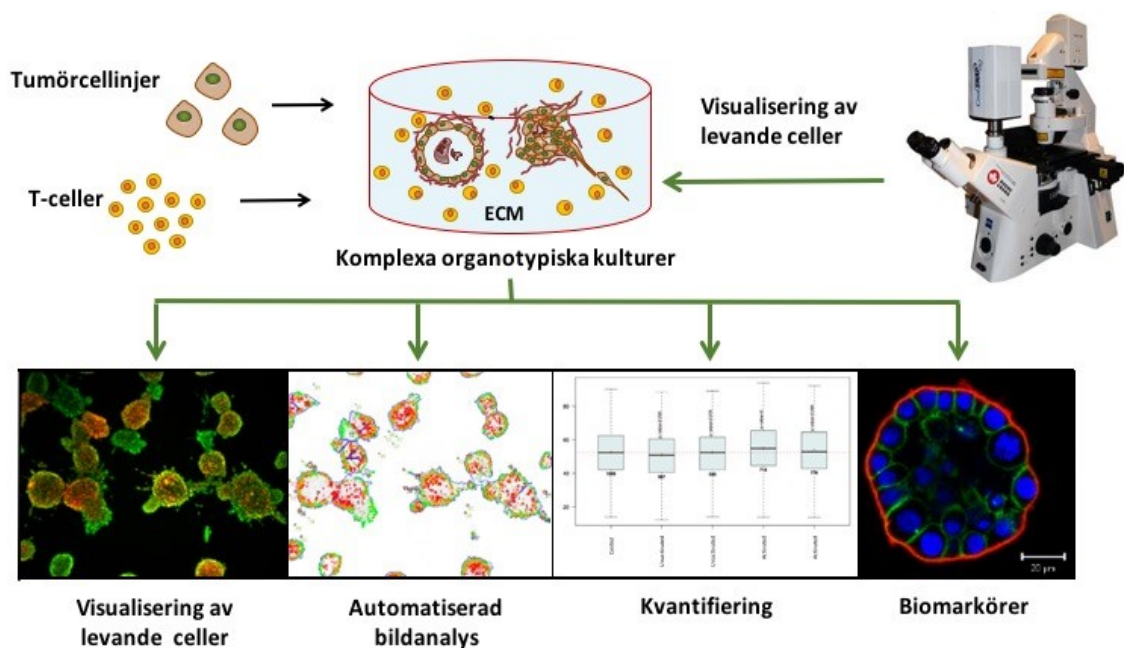
Då cellerna skulle räknas lösgjordes cellerna från skålarna eller flyttades från flaskorna till sterila Falconrör. Ärefter lösgjordes tumörcellerna med trypsin och flyttades över till sterila Falconrör. Rören centrifugerades i tre minuter i 200xG. Trypsinlösningen eller det gamla mediumet aspirerades sedan försiktigt bort före nytt medium tillsattes i rören och suspenderades. Cellerna räknades genom att sätta 20 µl cellsuspension på en cellräkningsglas (eng. cell counting slide, Sigma-Aldrich, Nexcelom SD100). Objektglaset placerades sedan i cellräknarapparaten (Cellometer Auto T4 Bright Field Cell Counter, Nexcelom Bioscience).

### **4.4 Aktivering av T-celler**

Eftersom en del av denna studie var att undersöka skillnaden mellan aktiverade och oaktiverade T-cellers påverkan för tumörtillväxten i 3D-celldkultur, så aktiverades samtliga Jurkat T-celler och PBMC:s med anti-CD3-antikroppar. Före aktiveringen räknades och flyttades cellerna till en 6-håls cellkulturplatta. Koncentrationen av celler under aktiveringen var  $4 \cdot 10^6$  celler/ml i RPMI-medium. Antikroppar tillsattes till brunnarna och T-cellerna aktiverades i 24 timmar i +37 °C. Aktiveringen påbörjades på så sätt ett dygn före 3D-celldkulturen skulle påbörjas.

## 4.5 Organotypisk 3D co-kultur

I organotypisk 3D co-kultur får cellerna möjlighet att interagera med varandra och det omgivande ECM, i detta fall biologiskt relevant ECM, som Matrigel och kollagen I. För den organotypiska 3D co-kulturen var det därför viktigt att optimera förhållandet mellan de olika celltyperna, så att tumörcellerna inte växte för tätt och för att det skulle finnas ett lämpligt antal T-celler. Även koncentrationen av Matrigel och kollagen I optimerades. Som basis för experimenten användes ett tidigare publicerat protokoll för 3D co-kultur (Åkerfelt et al., 2015). I denna cellkulturmodell inbäddades tumörceller och T-celler i ECM och cellerna visualiserades som levande vid slutpunkten av experimenten (Figur 6). Konfokalbilderna segmenterades sedan med automatiserad bildanalys och de morfologiska egenskaperna av tumörorganoiderna kvantifierades. För att karakterisera tumörorganoiderna användes biomarkörer (Figur 6).



Figur 6. Biologiskt relevanta organotypiska modeller för kvantifiering av tumörmorfologi. Tumörceller och T-celler tillsätts i extracellulärt matrix (ECM). Tumörcellerna bildar komplexa tumörorganoider i ECM:et och de levande tumörorganoiderna och T-cellerna visualiseras vid slutpunkten av experimentet. Konfokalbilderna segmenteras med automatiserad bildanalys och de morfologiska skillnaderna i tumörorganoiderna kvantifieras. För att karakterisera modellen färgas cellerna med informativa biomarkörer.

### 4.5.1 3D co-kultur med tumörceller och T-celler

I dessa 3D co-kulturer inbäddades cellerna i Matrigel (BD Biosciences) med förminskad mängd tillväxtfaktorer (eng. growth factor reduced), som fungerade som ECM för att

gynna proliferationen och invasion av organoiderna (Figur 6). I några brunnar tillsattes också kollagen typ I (BD Biosciences) till Matrigelen, för att främja invasion hos aggressiva tumörceller. En kombination av Matrigel och kollagen I användes i co-kulturerna eftersom vissa cellinjer, som till exempel BrCa MDA-MB-231-cellerna, kräver kollagen I för att bli mer invasiva. Denna ökade invasion vid tillsatts av kollagen I hade observerats i tidigare opublicerade studier i labbet. Co-kulturerna med PrCa-celler byggdes ECM:et upp av en undre gel bestående av 50 % ECM, Matrigel i RPMI-medium. Den övre gelen byggdes upp av 25 % Matrigel i RPMI-medium. För BrCa-cellerna bestod den undre gelen av 100 % ECM, bestående av en blandning av Matrigel och kollagen I. Den övre gelen byggdes upp av 50 % Matrigel och kollagen I i RPMI-medium, För 3D-cellkulturerna användes 96-håls Angiogenes- $\mu$ -plattor (eng. 96 Well Angiogenesis  $\mu$ -plate, Ibidi GmbH).

Dagen före påbörjan av experimenten hade Matrigelen placerats på is och i kylskåpet för att smälta. Följande dag späddes både Matrigel och kollagen I ut och blandades till sina rätta koncentrationer (se receptbilagan, sid 66). Eftersom ECM:et polymeriserar i rumstemperatur så hölls rören och eppendorfrören på is. Kollagenet ska användas inom tre timmar efter blandning, så ECM:et behåller sin rätta konsistens, vilket betyder att kollagenet blandades samma dag. De undre gelarna blandades sedan (se receptbilagan, sid 66). Den undre gel-mixen pipetteras i bottnet av brunnarna med en automatpipett. Då den undre gelen pipetteras till 96-håls Angiogenes- $\mu$ -plattan så var plattan placerad på is för att förhindra polymerisering av gelen. Därefter flyttades plattan till en centrifug med rumstemperatur och plattan centrifugerades i 20 minuter i 200xG. Efter centrifugeringen flyttades plattan till en +37 °C inkubator där den undre gelen ytterligare polymeriserades i 30-40 minuter. Under tiden då den undre gelen polymeriseras så blandades ECM:et för de övre gelarna i eppendorfrör (se receptbilagan, sid 66). Eppendorfrör placerades på is för att förhindra polymerisering av gelarna.

För PrCa co-kulturerna var cellantalen per brunn 1200 av LNCaP PrCa-cellerna och 150-300 av T-cellerna. Medans i BrCa co-kulturerna var cellantalen 600 av MDA-MB-231 och mellan 150-1500 T-celler per brunn. Då de olika celltyperna räknats tillsattes rätt mängd cellsuspensionen till eppendorfrören med ECM-blandningarna och suspades omsorgsfullt för att få en så homogen blandning som möjligt. 96-håls Angiogenes- $\mu$ -plattan placerades på is och den övre gelen pipetterades sedan försiktigt ovanpå den undre



gelen. Då alla övre gelar pipetterats till plattan, flyttades den åter till centrifugen och centrifugerades i tio minuter, varefter den placerades i +37 °C. Tre till fyra timmar senare tillsattes RPMI-medium försiktigt ovanpå gelerna i brunnarna. De yttersta kanterna och brunnarna fylldes med PBS för att upprätthålla en fuktig miljö för cellerna. Därefter flyttades plattan till +37 °C.

Mediumet byttes var varannan eller var tredje dag genom att försiktigt aspirera bort det gamla mediumet och sedan pipettera till nytt medium. I och med medium-bytet så fylldes också PBS:et på ifall mycket av det hade avdunstat. Mediumet byttes i laminarskåp för att upprätthålla en steril cellkultur.

#### **4.6 Real-tids uppföljning av 3D co-kulturerna**

De organotypiska 3D co-kulturerna uppföljdes i realtid under hela experimentet med IncuCyte FLR (Essen BioScience). IncuCyte FLR tog en bild varannan timme under hela experimentet. IncuCyten tog därmed faskontrast bilder genom experimentet, som vanligen räckte åtta dagar. I och med att IncuCyten är placerad inne i inkubatorn möjliggörs långtidsobservation av cellkulturerna. Efter slutpunkten för var och ett experiment valdes representativa bilder från olika tidpunkter av experimenten och bilderna exporterades.

#### **4.7 Visualisering av levande organoider vid slutpunkten**

##### **4.7.1 Färgning av levande celler med Calcein AM**

Vid slutpunkten av experimentet, det vill säga vid dag åtta färgades de levande cellerna i co-kulturen med Calcein AM (Thermo Scientific, C1430) i RPMI-medium (se receptbilagan, sid 67). Meningen med denna färgning var främst att visualisera de olika T-cellerna för exempelbilderna, då tumörcellerna färdigt var dsRed-märkta, men även tumörcellerna färgades med Calceinet. Det annars icke-fluorescenta Calcein AM-molekylen transporteras genom plasmamembranet in till levande celler. Inne i cellerna konverteras Calcein AM-molekylen till grönfluorescerande calcein, då färgen hydrolyseras av intracellulära esteraser. Det hydrolyserade calceinet frigör kalciumjoner som utger den gröns fluorescerande färgen som exciteras på en våglängd runt 495/515 nm. För att färga varje brunn på 96-håls Angiogenes- $\mu$ -plattan utspäddes Calcein AM färg i RPMI-medium till en slutkoncentration på 1,5  $\mu$ M. Det gamla mediumet i

brunnarna aspirerades försiktigt bort, varefter Calcein AM-medium-lösning pipetterades till varje brunn. Plattan flyttades sedan till +37 °C och Calcein AM färgen inkuberades i 30 minuter före mikroskopering.

#### **4.7.2 Tredimensionell visualisering med konfokalmikroskop**

Konfokalmikroskopi är en högt uppskattad teknik som har möjliggjort upptäckten av flera tredimensionella strukturer av flera cellulära komponenter. Tekniken bakom konfokalmikroskopets funktion är att mängden ljus som reflekteras från objektet är begränsad före den slutliga bilden byggs upp. Detta betyder att det ljus som inte är i fokus lämnas bort från bilden som formas. Bilder som tas med konfokalmikroskop har därför mycket bättre definition än bilder som tas med traditionella ljusmikroskop (Paddock, 2000). Principen med konfokalmikroskopet är att hela objektet inte visualiseras på samma gång. Istället fokuseras ljuset till en specifik punkt och på en specifik djuphet av objektet. För att få en så exakt fokuspunkt måste ljuset styras till och från objektet genom pinnhål. Ljus från objektet som inte är i fokus tas inte i beaktande genom pinnhålet och detekteras då inte. Istället samlas data från varje punkt av objektet då ljusstrålen skannar objektet. Denna data samlas sedan i programmet och bildar en bild av objektet. Genom att inte samla data från ur-fokusljuset är det möjligt att visualisera tjocka objekt som i detta fall tumörorganoider. Genom att ställa in djupheten för objekten är det möjligt att infånga z-stacker (eng. z-stacks) och sedan konstituera 3D-bilder (Paddock, 2000).

En typ av konfokala mikroskop är laser skannande konfokalmikroskop (eng. laser scanning confocal microscope, LSCM) som använder en laserljusstråle för att skanna objektet. LSCM består även av fotoförstärkande rör (eng. photomultiplier tubes) som detekterar det emitterade ljuset och också av pinnhål (eng. pinholes) som ökar resolutionen genom att lämna bort urfokus-ljuset. En annan typ av konfokala mikroskop är spinning disk konfokalmikroskopet som användes i dessa studier. I spinning disk mikroskopet utnyttjas flera hundra till tusentals pinnhål på Nipkow spinning disken. Dessa pinnhål är jämnt fördelade över spinning disken i ett spiralformat mönster. Detta mönster av ljusstrålar som roterar i hög hastighet möjliggör att objektet kan skannas längre och på så sätt kan excitationenergin sänkas, vilket samtidigt bidrar till lägre risk för blekning av objektet. Denna teknik gör det möjligt att utföra visualisering även på levande objekt så som tumörorganoider.

### 4.7.3 Visualisering av tumörorganoiderna med spinning disk konfokalmikroskopet

Efter Calcein AM färgningen, visualiserades cellmodellerna med ett spinning disk konfokalmikroskop (Figur 6). Zeiss Axiovert-200M mikroskopet med Yokogawa CSU22 spinning disk konfokal enheten är ett så kallat automatiserat konfokalmikroskop som känner igen inprogrammerade positioner och kan därmed automatiskt ta 5x bilder på fyra specifika positioner i varje brunn på plattan. Den lägsta och den högsta positionen i brunnarna bestämdes så att bildstacken max var 800  $\mu\text{m}$  tjock och att högsta antalet plan per brunn var under 20. Den maximala stegstorleken (eng. step size) var då ungefär 40  $\mu\text{m}$ . Förutom dessa inställningar bestämdes också exponeringstiderna för både den gröna och röda kanalen. Då konfokalet automatiskt tagit bilder från varje plan på alla fyra punkter i varje brunn så gjordes maximum intensitetsprojektioner (eng. maximum intensity projektions) av spinning disk bilderna i SlideBook 6 programmet (Intelligent Imaging Innovations Inc, Denver, CO, USA). Detta betyder att datan från de 3D-konfokalbilderna slogs ihop till 2D-projektioner. Dessa 2D-projektioner renormaliserades i samma program. Med renormalisering menas att räckvidden av pixlarnas intensitetsvärden normaliseras så bilden lättare kan förstås. I stora bildset som dessa bidrar normaliseringen till bilderna har samma följdriktighet och kontrast.

### 4.8 Segmentering och morfometrisk bildanalys av tumörorganoider

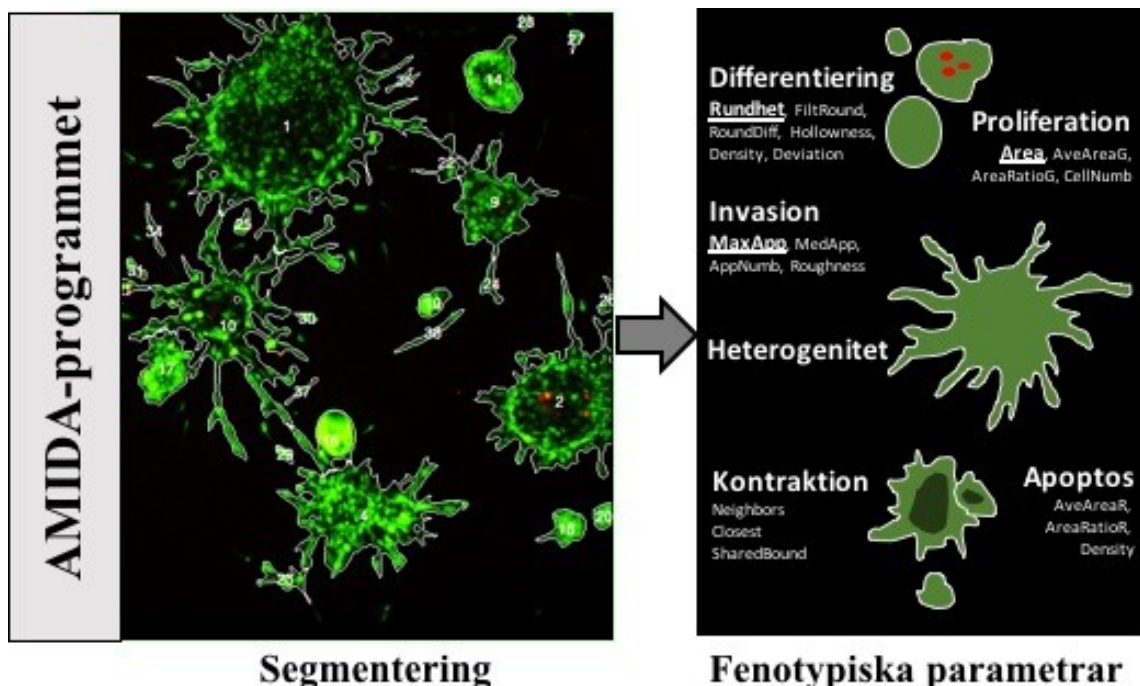
Konfokalbilderna på de levande cellerna som togs med spinning disk konfokalmikroskopet segmenterades med AMIDA-bildanalysprogrammet (Figur 6) (Härmä et al., 2014). AMIDA är ett multi-parametriskt bildanalysprogram som möjliggör kvantitativa mätningar av heterogena och komplexa 3D-organoidkulturer. Programmet känner igen multicellulära strukturer, i detta fall organoider, med hjälp av segmentering (Figur 7). AMIDA numrerar organoiderna och analyserar sedan valda cancer-relaterade parametrar. De numeriska värdena för varje parameter exporteras som en Excel-fil. De enda parametrarna i programmet som behöver väljas före AMIDA-analysen är känsligheten (eng. sensitivity) och tröskelvärdet (eng. threshold). Känslighetsparametern styr hur organoiderna avgränsas på den analyserade konfokalbilderna. Tröskelvärdet kontrollerar avskärningsvärdet (eng. cut-off value) i histogrammen (Härmä et al., 2014).

AMIDA kvantifierade på så sätt förändringen i organoidmorfologin då PrCa-cellerna eller BrCa-cellerna interagerat med T-cellerna. Parametrarna som valdes att observeras i

detta projekt var organoid storleken (Area), epitelets differentiering (Rundhet) och längden av de oregelbundna eller invasiva strukturerna från mitten av organoiderna (MaxApp) (Tabell 1) (Figur 7). För att effektivare analysera de invasiva strukturerna av BrCa-organoiderna höjdes signalintensiteten av den röda kanalen från dsRed-färgen. Denna justering av röda kanalen gjordes med ImageJ (webbsidan <https://imagej.net/Welcome>, 16.12.2018). Justeringen gjordes i alla konfokalbilder från BrCa co-kulturerna.

Tabell 1. Cancer-relaterade parametrar på tumörorganoidernas morfologi som analyserades samt deras förklaring.

| Parameter | Förklaring   | Enhet |
|-----------|--|-------|
| Area      | Arean av den segmenterade strukturen   | Pixel |
| Rundhet   | Rundheten av den segmenterade strukturen   | %     |
| MaxApp    | Beräkning för den största möjliga längden av invapodier av den segmenterade strukturen | Pixel |



Figur 7. Segmentering med AMIDA-programmet. AMIDA känner igen multicellulära strukturer, i detta fall organoider, med hjälp av segmentering. AMIDA numrerar organoiderna och analyserar sedan valda cancer-relaterade parametrar. Endast några av dessa parametrar, som Area, Rundhet och MaxApp användes i dessa studier.

## 4.9 Kvantitativ analys och statistik

Rex är ett redskap som användes för att rita upp låddiagram (eng. box and whisker plots) (Figur 6). Med Rex sammanfattades resultaten från AMIDA analyserna och Rex visualiserade olika analyserade parametrar. P-värdet baserar sig på Bonferroni-rättade t-test. Rex ritade upp låddiagram för de valda parametrarna. Antalet analyserade organoider indikerar n.

## 4.10 Fixering av 3D-organoider

Efter visualisering av de levande cellerna, kunde de fixeras och användas för IF-färgningar. Ändamålet med vidare studier var att IF-färga specifika proteiner i cellerna. Före färgningen fixerades cellerna/organoiderna med 4 % paraformaldehyd (eng. paraformaldehyde, PFA) i PBS (se receptbilagan, sid 67). PFA-lösningen inkuberades 20 minuter i rumstemperatur och under inkubationen hölls plattan övertäckt för att skyddas dsRed-färgen i cancercellerna. Alla brunnar tvättades sedan tre gånger med PBS. Fixativet avlägsnar Matrigelen så tvättarna utfördes väldigt försiktigt så organoiderna inte tvättas bort. Efter tvättarna, permabiliserades organoiderna med 0,5 % Triton-X och blockerades med 20 % hästserum (eng. horse serum) i PBS under 60 minuter i rumstemperatur (se receptbilagan, sid 67). Åter igen hölls plattan övertäckt. Efter inkubationen tvättades brunnarna med PBS tre gånger.

## 4.11 Immunofluorescensfärgning

Karaktäriseringen av de organotypiska co-kulturerna gjordes med IF-färgning där olika biomarkörer användes (Figur 6). Vid indirekt IF-färgning används specifika antikroppar för att märka proteiner av intresse i celler. Till dessa primära antikroppar binds sedan sekundära antikroppar för att amplifiera signalen. Dessa sekundära antikroppar har ofta en fluorescerande markör fästa till sig. De fluorescerande markörerna visualiseras sedan under lämplig våglängd av laserljus.

### 4.11.1 Immunofluorescensfärgning av biomarkörer

I denna studie användes just denna teknik där både primära (Tabell 2) och fluorescerande sekundära antikroppar nyttjas (Tabell 2). De primära antikropparna späddes ut 1:100 i 20 % hästserum i PBS och pipetterades till brunnarna efter tvättarna. De primära antikropparna inkuberades över natten i + 4 °C. Följande dag tvättades brunnarna tre

gångar med PBS för att avlägsna alla de primära antikroppar som inte bundit till cellerna. De sekundära antikropparna utspäddes 1:500 i 20 % hästserum i PBS och inkuberades över natten i + 4 °C. Följande dag tvättades brunnarna åter igen med PBS för att avlägsna de sekundära antikropparna som inte bundit till de primära antikropparna. Denna gång tvättades brunnarna två gånger med PBS och den sista tvätten fick verka över natten före plattan placerades under konfokalmikroskopet.

Den primära antikroppen som användes för att visualisera T-cellerna var  $\alpha$ -CD3-zeta (Abcam).  $\alpha$ -CD3-zeta binder till CD3-receptorerna på T-cellernas yta. Laminin  $\alpha$ -1 (Santa Cruz) användes för att visualisera basalmembranet runt organoiderna. Vidare användes  $\alpha$ -Vimentin (Abcam) för att påvisa mesenkymala celler och därmed invasiva strukturer av organoiderna. DraQ5 (Cell Signaling Technology) användes för att färga cellkärnor. Det var speciellt användbart för att visualisera T-cellerna som annars var icke-färgade. Tumörcellerna fluorescent dsRed-färgade och sågs på så sätt i den röda kanalen. Som sekundära antikroppar användes Alexa 488, Alexa 647 och Alexa 555.

Tabell 2. Primära och sekundära antikroppar som användes för immunofluorescensfärgning (IF) av PrCa- och BrCa-organoiderna samt T-cellerna.

| Primära antikroppar   | Leverantör                               | Organism | Koncentration |
|-----------------------|--|----------|---------------|
| $\alpha$ -CD3-zeta    | Abcam, ab-40804                          | Kanin    | 1:100         |
| $\alpha$ -Vimentin    | Abcam, ab-16700                          | Kanin    | 1:100         |
| Laminin $\alpha$ -1   | Santa Cruz<br>Biotechnology,<br>sc-59849 | Mus      | 1:100         |
| Sekundära antikroppar |  |          |               |
| Alexa 488             | Invitrogen, A11034                       | Kanin    | 1:500         |
| Alexa 555             | Invitrogen,<br>A27039                    | Kanin    | 1:500         |
| Alexa 647             | Invitrogen, A31571                       | Mus      | 1:500         |
| Andra använda färger  |  |          |               |
| DRAQ5                 | Cell Signaling<br>Technology, 4084L      |          | 1:1000        |

#### 4.11.2 Visualisering av de immunofluorescensfärgade strukturerna

De brunnar som färgats med antikroppar visualiserades med spinning disk konfokalmikroskopet. Denna visualisering skedde dock inte automatiskt och objektiven

som användes för detta ändamål var 20x eller 40x. Även här bestämdes bildstackens höjd som passade objektet i fråga och likaså bestämdes exponeringstiden för de tre olika kanalerna.

#### **4.12 Viabilitetsanalys för att mäta proliferationskillnader mellan T-celler**

För att undersöka ifall de normala Jurkat T-cellerna prolifererar snabbare än de FOXP3 överuttryckande T-cellerna utfördes en WST-8 viabilitetsanalys på cellerna under en fyra dagars tillväxtperiod. Med denna analys mäts dehydrogenas (NADH) aktiviteten i levande celler. WST-8 (eng. water-soluble tetrazolium salt) reagensen reduceras till gul färg (formazanfärg) i cellerna, med hjälp av cellernas dehydrogenasaktivitet. Andelen färg är direkt proportionerlig med andelen levande celler i brunnarna. Andelen färg mäts via absorbans. Sensitiviteten för WST-8 analysen är högre än för andra analyser så som MTT, XTT och MTS.

För denna studie användes en Nunclon™ Delta Surface platta (Thermo Scientific) där 10 000 celler av respektive T-celotyp såddes per brunn. Då cellerna såtts i brunnarna flyttades plattan till +37 °C för fyra dagar. Därefter tillsattes 1:10 WST-8 reagens (Dojindo Laboratories) i RPMI-medium till varje brunn, varefter plattan flyttades tillbaka till +37 °C. Efter en timme mättes absorbansen med en spektrofotometer (Thermo Scientific multiscan FC) där absorbansen för brunnarna avlästes vid 450 nm våglängd. Därefter inkuberades plattan ytterligare två timmar varefter absorbansen mättes på nytt med samma våglängd. Dessa absorbansvärden exporterades till Excel. För att kunna räkna ut antalet celler från den ovannämnda viabilitetsanalysen så användes en standardkurva där respektive T-cellers dehydrogenaseffektivitet mättes. Först mättes dehydrogenasaktiviteten i brunnar med 3000-100 000 celler/brunn, för de två olika Jurkat T-celotyperna. Genast då cellerna såtts i brunnarna, tillsattes 1:10 WST-8 reagens i RPMI-medium till varje brunn. Plattan inkuberades sedan i +37 °C i två timmar, varefter absorbansen mättes på 450 nm. Absorbansvärdena flyttades över till Excel och användes för att rita upp en standardkurva.

## **5. RESULTAT**

### **5.1. Etablering av organotypisk 3D co-kultur**

I den första delen av detta projekt optimerades co-kulturförhållandena mellan tumörcellerna och T-cellerna. Ändamålet med etableringen var att se till att ingen celltyp övertar den andra i co-kulturen och att på så sätt utveckla stabila co-kulturer. Såväl valet av ECM som ECM-koncentrationerna och cellantalerna för PrCa- och BrCa-cellerna samt T-cellerna anpassades för att etablera lämpliga cellkulturförhållanden för respektive celler. Likaså uppföljdes längden av experimentet, för att bestämma den bästa tidpunkten för att möjliggöra visualiseringen av organoiderna innan de var för utbredda.

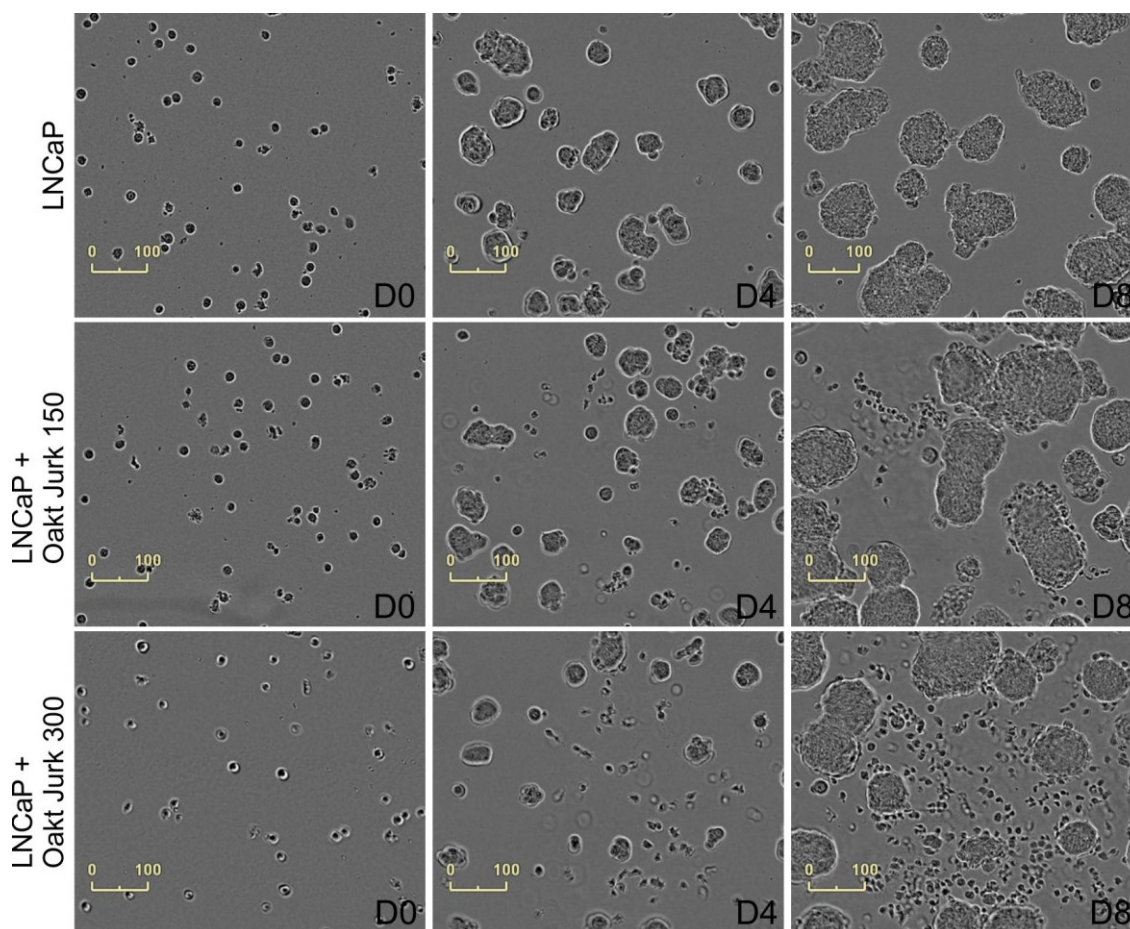
#### **5.1.1 Visualisering av 3D co-kulturerna i realtid**

För att följa med proliferationen av tumör- och T-cellerna i co-kulturen i realtid under hela experimentet, visualiserades co-kulturerna med IncuCyte FLR (Essen BioScience). IncuCyte FLR stod placerad inne i inkubatorn och var inställd på att ta bilder på co-kulturen varannan timme. Faskontrastbilder exporterades från IncuCyte FLR från startpunkten, vid dag noll fram tills slutpunkten vid dag åtta. Representativa bilder av tumörorganoider och T-celler valdes ut vid tre olika tidpunkter.

#### **5.1.2 Optimering av cellantal**

Som tumörcellslinjer valdes LNCaP PrCa-cellinjen som härstammar från en metastasisk human prostata adenocarcinoma och den invasiva MDA-MB-231 BrCa-cellinjen som härstammar från pleuravätska (Cailleau et al., 1974; Horoszewicz et al., 1983). För co-kulturerna bestämdes antalet PrCa-celler till 1200 celler per brunn baserat på tidigare studier i laboratoriet (Härmä et al., 2010, Härmä et al., 2014, Åkerfelt et al., 2015). Antalet BrCa-celler bestämdes till 600 celler per brunn. Valet att använda ett lägre antal BrCa-celler berodde på att dessa tumörceller prolifererade snabbare och bildade större organoider. Ett lämpligt antal T-celler för respektive co-kulturer bestämdes genom att testa användningen av olika antal T-celler. Antingen 150 eller 300 stycken T-celler per brunn tillsattes i co-kulturen vid startpunkten. I brunnen med 150 T-celler samlades T-cellerna omkring och mellan tumörorganoiderna (Figur 8). I brunnen med högre antal T-celler prolifererade dessa explosivt fram till slutpunkten vid dag åtta och befann sig överallt i brunnen (Figur 8). Väldigt få T-celler kunde därmed tillsättas i co-kulturen eftersom de prolifererade explosivt från dag fyra framåt till slutpunkten till dag åtta.





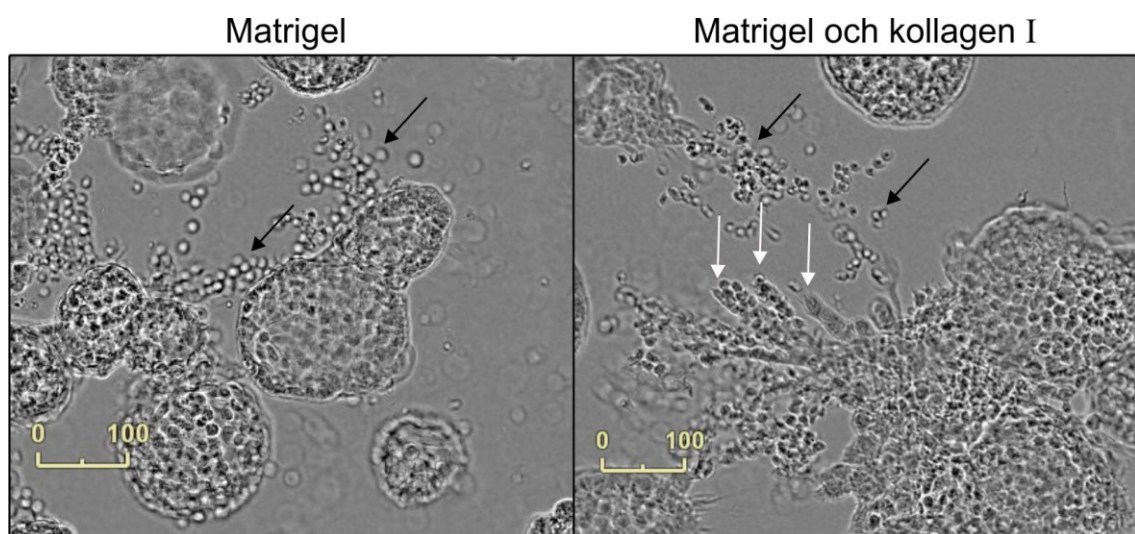
Figur 8. Exempelbilder på olika antal T-celler i co-kultur med PrCa-organoider vid olika tidpunkter. På den översta raden visas endast PrCa-organoider (LNCaP). I brunnen med lägre antal oaktiverade T-celler, 150/brunn (Oakt Jurk 150) samlades T-cellerna runt PrCa-organoiderna. I brunnen med högre antal oaktiverade T-celler (Oakt 300) prolifererade dessa explosionsartat och fanns runt om i hela brunnen. Skalan 100 µm finns markerad i gult. Bilderna är tagna med IncuCyte FLR. D: antal dagar i 3D-kultur.

### 5.1.3 Optimering av ECM

Som följande del av etableringen av co-kulturen, optimerades även ECM:et som cellerna lades i. Detta utfördes ytterligare för att skapa stabila co-kulturer för respektive celler. Från tidigare studier var det känt att PrCa-cellerna växer och differentierar väl i ECM bestående av Matrigel och RPMI-medium (Härmä et al., 2010). Resultaten bekräftade tidigare observationer som visade att LNCaP-cellerna bildade runda, väldifferentierade organoider (Figur 8). Eftersom LNCaP-cellerna är kända för att inte bilda invasiva strukturer, valdes således Matrigel som ECM för dessa PrCa-celler i vidare experiment (Härmä et al., 2010). BrCa-cellerna bildade runda väldifferentierade organoider i samma ECM som användes för PrCa-cellerna, men för att få fram de invasiva egenskaperna hos MDA-MB-231 BrCa-cellerna tillsattes kollagen I till Matrigelen (Figur 9). Olika

kollagenkoncentrationer testades för att uppnå stabila cellkulturförhållanden. Då BrCa-cellerna lades i en ECM bestående av 60 % Matrigel och 40 % kollagen I bildade organoiderna invasiva strukturer, så kallade invadopodier (Figur 9). Mängden kollagen I i ECM-mixen optimerades till 40 % för att få BrCa-organoiderna att bli invasiva men inte allt för aggressiva. BrCa co-kulturerna odlades således i fortsatta experiment i Matrigel och kollagen I mixen.

Även T-cellernas proliferation i olika ECM uppföljdes. Från optimeringskulturerna observerades att T-cellerna prolifererade och samlades runt organoiderna oberoende av valet av ECM. T-cellerna samlades märkbart runt PrCa-organoiderna i Matrigel (Figur 8). I ECM innehållande 60 % Matrigel och 40 % kollagen I, samlades T-cellerna också runt BrCa-organoiderna men på grund av BrCa-organoidernas invadopodier, blev T-cellerna svårare att utskilja med faskontrastmikroskopi (Figur 9). Valet av ECM bestämdes därmed helt och hållet utgående från tumörcellerna, eftersom T-cellernas proliferation och rörelse var liknande i alla typer av ECM.

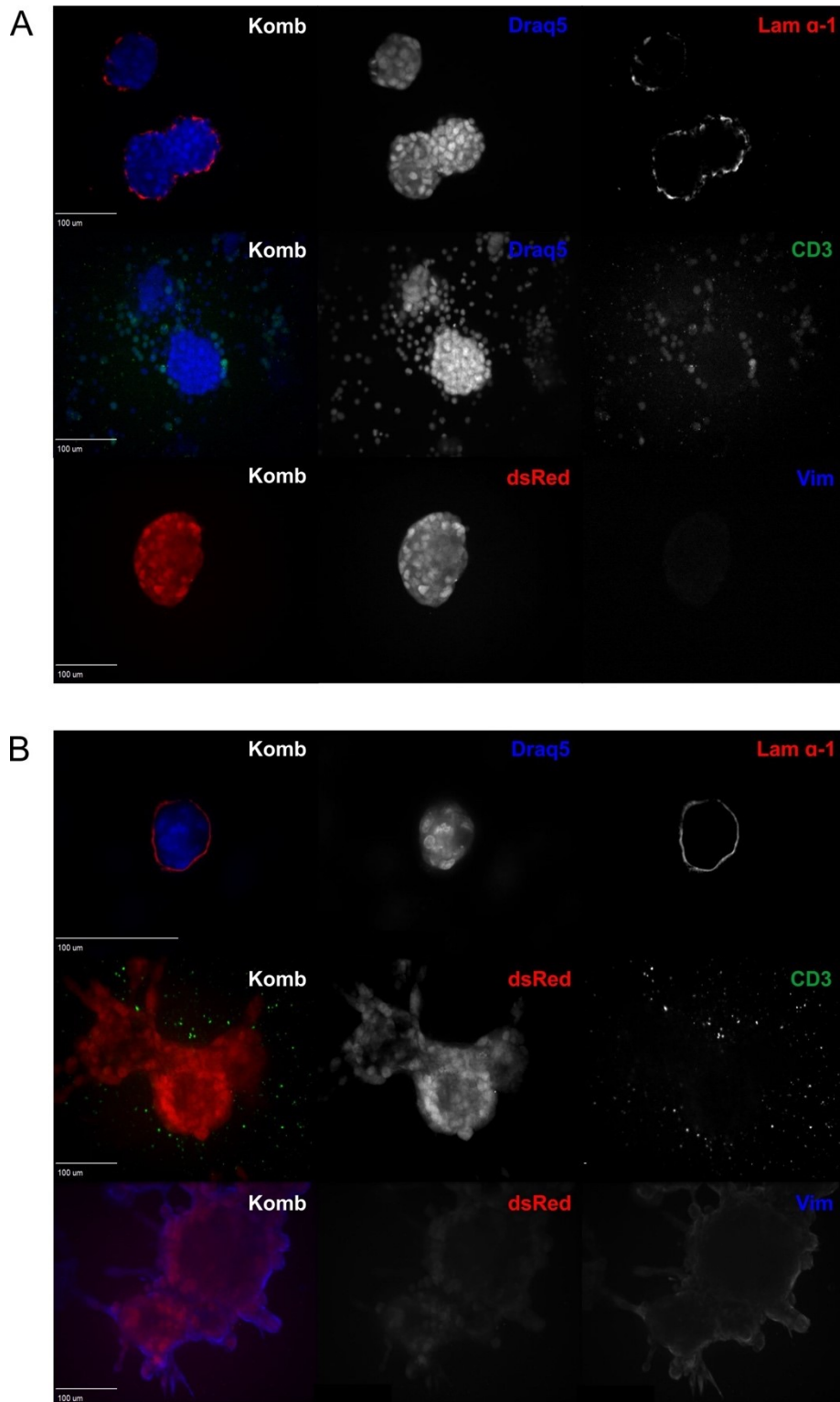


Figur 9. 3D co-kultur av BrCa-organoider och T-celler i olika ECM, vid slutpunkten dag åtta. I Matrigel bildar BrCa-cellerna runda icke-invasiva organoider. I en ECM-blandning bestående av Matrigel och kollagen I bildar BrCa-cellerna invasiva strukturer. Bilderna är tagna med IncuCyte FLR. De svarta pilarna visar T-celler. De vita pilarna indikerar invasiva strukturer.

## 5.2 Karaktärisering av organoiderna med immunhistokemisk färgning

För att undersöka de olika karakteristiska egenskaperna av co-kulturerna färgades både tumör- och T-cellerna med olika biomarkörer. Enskilda celler visualiserades med hjälp av Draq5 som färgar både tumörcellernas och T-cellernas cellkärnor (Figur 10). Tumörcellerna var från början fluorescent dsRed-märkta (Figur 10). För att visualisera basalmembranet runt väldifferentierade organoider användes laminin  $\alpha 1$ , som är en markör för en komponent i basalmembranet. Runt de runda, väldifferentierade PrCa-organoiderna, observerades basalmembranet som ett icke-fullständigt basalmembran (Figur 10A; Åkerfelt et al., 2015). I en rund väldifferentierad BrCa-organoid sågs däremot basalmembranet tydligt runt hela organoiden (Figur 10B). Vimentin binder till de intermediära filamenten och är speciellt en markör för mesenkymala celler, det vill säga celler som genomgått EMT och förlorat sin polaritet. Vimentin är därmed en markör för invasion, vilket observerades hos de invasiva BrCa-organoiderna (Figur 10B; Satelli & Li, 2011). Eftersom LNCaP PrCa-cellerna är epitela celler och inte invasiva mesenkymala celler, syns vimentin-markören inte i en väldifferentierad PrCa-organoid. För att visualisera T-cellerna användes  $\alpha$ -CD3 Zeta som markör. T-cellerna kunde ses runt både PrCa- och BrCa-organoiden (Figur 10).

IF-färgingen av co-kulturerna visade att PrCa-organoiderna blir väldifferentierande och har ett basalmembran runt organoiden (Figur 10A). BrCa-organoiderna karaktäriserades som invasiva då vimentin visualiserade de invasiva strukturerna men samtidigt visades att runda väldifferentierade BrCa-organoider fortfarande hade sitt basalmembran intakt (Figur 10B). Att T-cellerna samlades kring tumörorganoiderna uppföljdes redan med IncuCyte FLR under studiens gång och bekräftades även med IF-färgningen där  $\alpha$ -CD3 Zeta visualiserar T-cellerna runt organoiderna (Figur 8 och 9). Nu gick det dessutom att särskilja T-cellerna från de invasiva BrCa-cellerna med hjälp av biomarkörer.

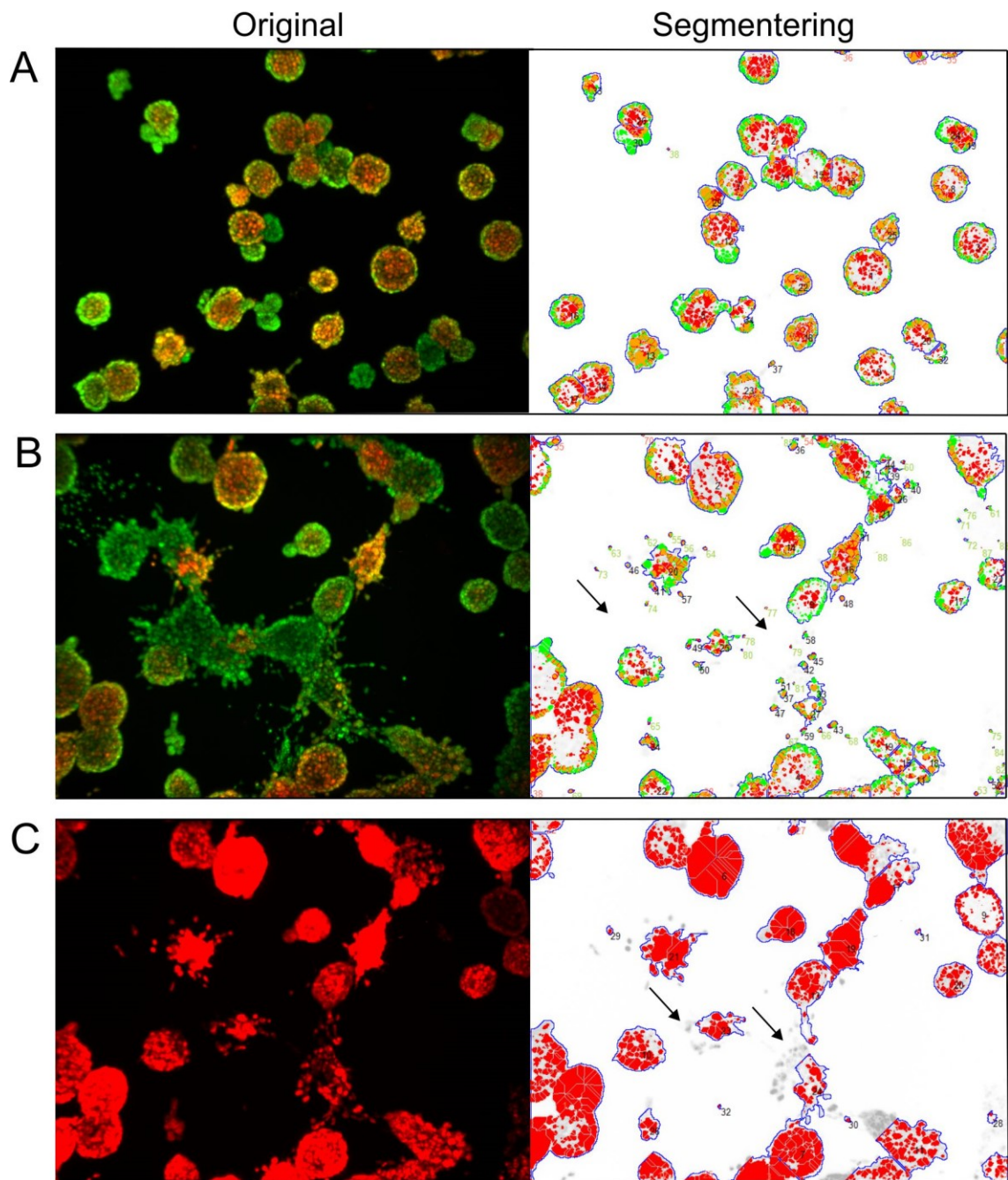


Figur 10. Karakterisering av PrCa- (A) och BrCa-organoiderna (B) med immunofluorescensfärgning. Draq5 (blå) användes som markör för cellkärnorna. Tumörcellerna visualiserades med dsRed-märkning (röd). Basalmembranet i väldifferentierade tumörorganoider visualiserades med laminin  $\alpha 1$  (Lam  $\alpha 1$ , röd). Mesenkymala, invasiva celler visualiserades med vimentin (Vim, blå). Invasionen ses i BrCa-organoider men inte i PrCa-organoiden. T-cellerna runt tumörorganoiderna visualiserades med  $\alpha$ -Zeta CD3 (CD3, grön). Längst till vänster ses kombinerad bild av de olika kanalerna (Komb). Skalan är 100  $\mu\text{m}$ . Bilderna togs med spinning disk konfokalmikroskopet.

### 5.3 Visualisering och segmentering av tumörorganoidernas morfologi med kvantitativ bildanalys

Vid slutpunkten av varje experiment färgades co-kulturerna med Calcein AM för att visualisera alla celltyper, inklusive T-cellerna. Efter färgningen visualiserades co-kulturerna med det automatiserade spinning disk konfokalmikroskopet. För att sedan möjliggöra en fenotypisk bildanalys av tumörorganoidernas morfologi utfördes en kvantitativ bildanalys. Tumörcellerna var dsRed-märkta sedan tidigare och eftersom den fenotypiska analysen gällde endast tumörorganoidernas morfologi, analyserades endast den röda kanalen på konfokalbilderna. För att utreda hur tumörmorfologin skilde sig i kulturer med endast tumörceller jämfört med i co-kulturer analyserades flera cancer-relaterade parametrar. Först segmenterades konfokalbilderna tagna med spinning disk konfokalmikroskopet med AMIDA-programmet (Härmä et al., 2014). Kort fattat möjliggör AMIDA kvantitativa mätningar med olika parametrar av heterogena och komplexa 3D-organoidkulturer. Det sker genom att känna igen organoidernas signal och struktur med hjälp av segmentering. Segmenteringen känner igen organoidernas yttre gränser och inre strukturer. AMIDA räknar hur många organoider det finns per konfokalbild och analyserar sedan valda cancer-relaterade parametrarna.

Segmenteringen av rundare, väldifferentierade organoider och organoidernas oregelbundna utbuktningar i PrCa-organoiderna, lyckades väl med AMIDA (Figur 11A). Den blåa linjen runt organoiderna indikerar var programmet kände igen de yttre gränserna av organoiderna. Däremot fungerade segmenteringen av BrCa-organoiderna inte optimalt, utan i dessa fall klippte programmet av invadopodierna, eller räknade dessa som mindre individuella organoider (Figur 11B). För att förbättra segmenteringen av de invasiva strukturerna användes ImageJ-programmet (webbsidan <https://imagej.net/Welcome>, 16.12.2018) för att först öka dsRed-signalen i BrCa-organoiderna. Segmenteringen efter justeringen av den röda kanalen fungerade inte optimalt, men bättre än segmenteringen av de ursprungliga konfokalbilderna (Figur 11C). Informationen från dessa segmenteringar användes för kvantifieringar. Från segmenteringen skapas ett värde för varje cancer-relaterad parameter, från varje organoid och det är dessa värden som sedan analyseras. För detta projekt användes parametrar för att mäta arean av organoiderna och organoidernas rundhet alltså mått på differentiering. Dessutom beaktades ett mått på längden av de oregelbundna eller invasiva strukturerna



Figur 11. Segmentering av tumörorganoiderna med AMIDA. AMIDA-programmet (Härmä et al., 2014) söker de yttre gränserna för organoidstrukturerna på konfokalbilderna. Till vänster visas de originala konfokalbilderna på co-kulturerna (Original) och till höger visas bilderna efter segmenteringen (Segmentering). Calcein AM användes för att visualisera T-cellerna och cellpopulationer med svag fluorescens. Den röda färgen visar dsRed-signalen i tumörorganoiderna och det är endast den kanalen som segmenterats för att framvisa tumörorganoidernas morfologi. Segmenteringen av runda PrCa-organoider (A). Svag fluorescent signal resulterade dålig segmentering (B, pilar). Ökad intensitet av den fluorescanta dsRed-signalen gav förbättrat resultat (C). Programmet räknar strukturerna på bilden och numrerar dem. De svarta siffrorna indikerar organoider som räknats med i analysen. Gröna siffror indikerar små strukturer som inte räknats med i analysen och de röda siffrorna indikerar strukturer som är halverade och även räknas bort från analysen.

som sträcker sig ut från organoiden. För själva kvantifieringen användes Rex, ett webbaserat analysredskap för att rita upp låddiagram på de valda parametrarna.

I och med att även bildanalysen hade blivit optimerad för co-kulturen och att alla optimeringar gjorts för att möjliggöra stabila co-kulturer kunde vidare undersökningar påbörjas. Dessutom har redskap för analysering prövats och visats lämpliga. Med denna kunskap var det möjligt att fortsätta besvara de biologiska frågeställningarna.

## **5.4 Tumörorganoidernas tillväxt och morfologi påverkas vid tillsats av T-celler till co-kulturen**

Till nästa övergick vi till att studera biologiska frågor kring T-cellernas påverkan på tumörorganoiderna. I ett samarbete med Prof. Riitta Lahesmaas grupp, som forskar i immuncellers utveckling och deras aktivitet, ville vi undersöka vilken effekt, tillsats av T-celler hade på tumörorganoidernas tillväxt och morfologi i co-kulturen. T-cellerna tillfördes i co-kulturen vid startpunkten av experimentet samtidigt som tumörcellerna lades i ECM:et. Vid slutpunkten av experimenten, vid dag åtta visualiserades co-kulturen och tumörorganoidernas morfologi kvantifierades med AMIDA.

### **5.4.1 Tillsats av T-celler leder till ökad proliferation och oregelbundhet i PrCa-organoider**

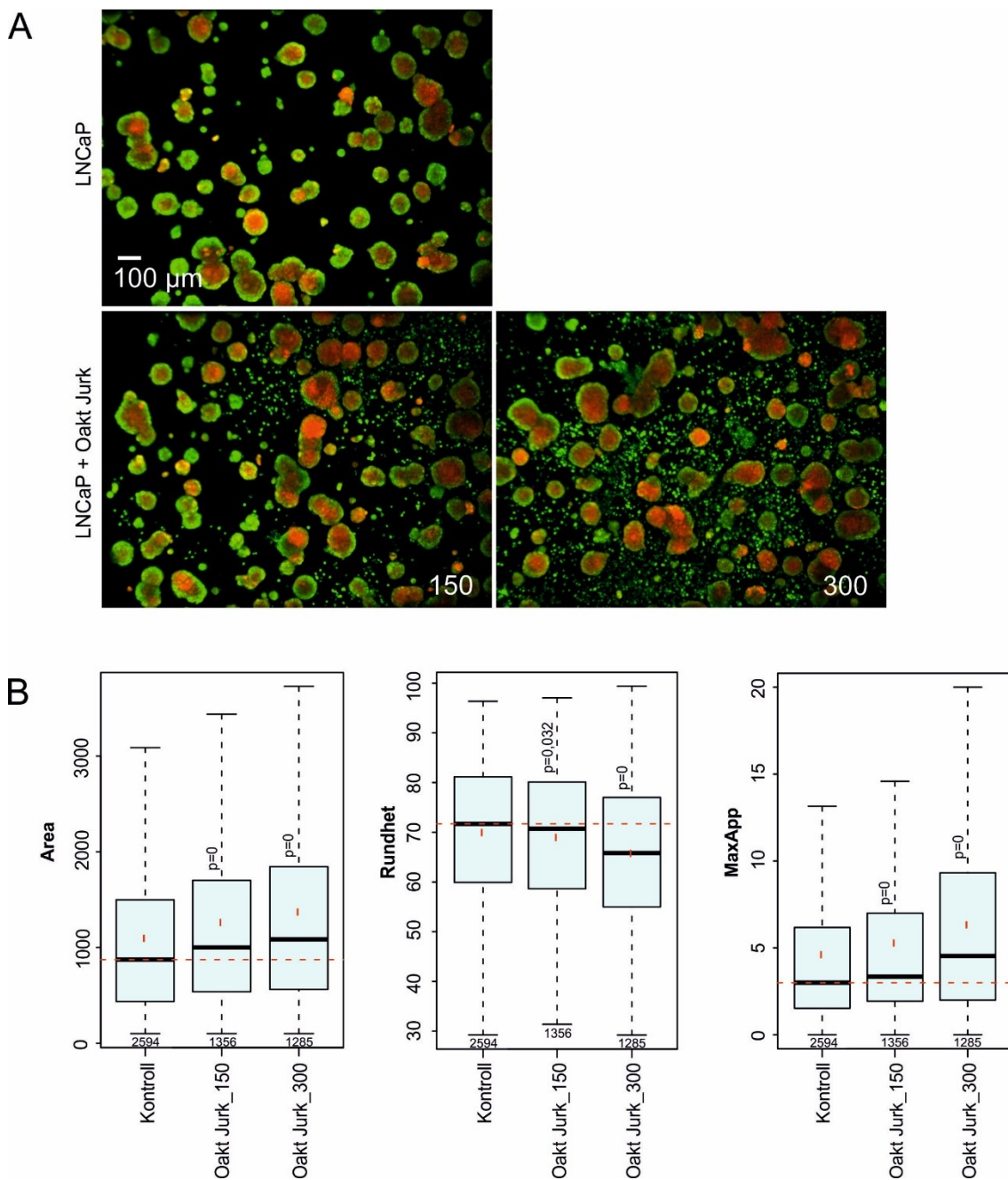
För att undersöka vilken effekt T-celler hade på tumörorganoiderna tillfördes T-cellerna till co-kulturen, vid dag noll av experimenten. Olika antal T-celler studerades även för att undersöka om mängden T-celler hade olika inverkan på PrCa-organoiderna. De parametrar som erhöles vid den fenotypiska analysen och studerades var area, rundhet och MaxApp (Härmä et al., 2014). Arean är ett mått på storlek och proliferation av organoiden baserat på antal pixlar. Rundheten påvisar hur väldifferentierad en organoid är. Normala epitela strukturer är oftast runda och ihåliga. Rundheten mäts i procent. MaxApp är ett mått på den maximala längden av de oregelbundna eller invasiva strukturerna från organoidernas mittpunkt är och mäts i antalet pixlar. Då PrCa-organoider odlades i co-kultur med T-celler observeras inga invasiva strukturer. I detta fall syftar MaxApp endast på oregelbundenheter i organoidens yta.

Tillsatsen av T-celler till PrCa co-kulturerna med hade tydliga skillnader jämfört med endast PrCa-kulturer. Kvantifiering av konfokalbilderna (Figur 12A) visade att redan ett antal av 150 T-celler vid startpunkten ökade såväl tillväxten av PrCa-organoiderna (Area) som oregelbundheten (MaxApp) (Figur 12B). Även större skillnader observerades då 300 T-celler tillsattes vid startpunkten. Då oregelbundheten av organoiderna ökade, minskade rundheten (Figur 12B).

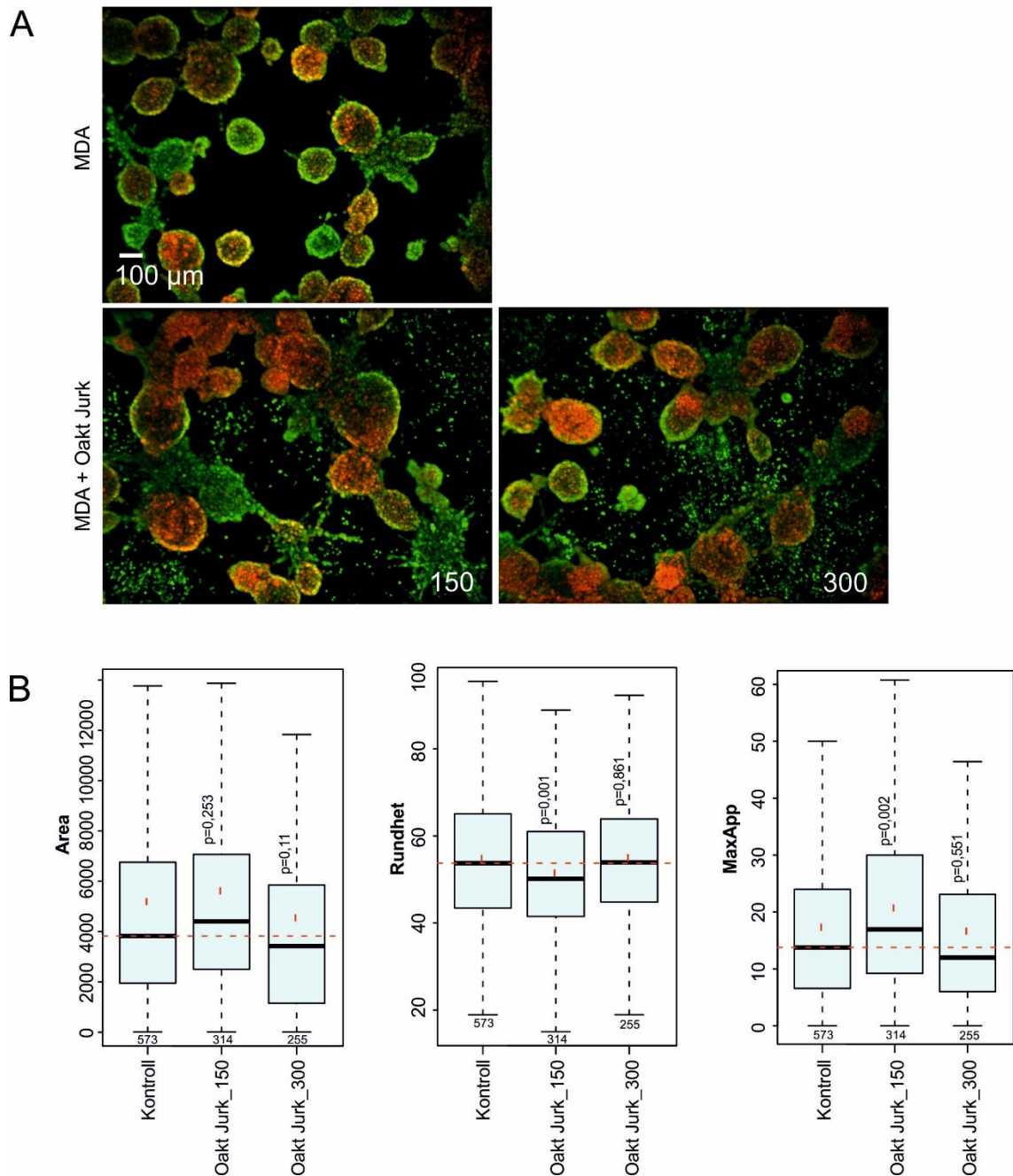
#### **5.4.2 Tillsats av T-celler har endast små effekter på morfologin av BrCa- organoider**

För att sedan undersöka ifall tillsats av T-celler hade samma eller avvikande effekt på BrCa-organoidernas morfologi, tillfördes T-cellerna vid dag noll av experimentet. Till skillnad från det ovannämnda resultatet från PrCa-organoiderna, visade tillsatsen av T-celler till co-kulturen med BrCa-organoider inga stora skillnader då organoidernas morfologi observeras. Även med BrCa-organoiderna undersöktes olika antal av T-cellerna, 150 eller 300 celler per brunn som visade olika effekt på tumörorganoidernas morfologi (Figur 13). I co-kulturen med 150 T-celler per brunn visade det sig att organoidernas proliferation och invasion ökade litet. Ett högre antal T-celler, 300 celler per brunn hade dock motsatt effekt men utan signifikanta skillnader (Figur 13). Denna motsatta effekt kunde bero på att för många T-celler i en brunn hämmade tillväxten av tumörorganoiderna. Då differentieringen av BrCa-organoiderna jämfördes observerades att tillsats av det lägre antalet T-celler fick organoiderna att bli mindre runda och mer invasiva. Denna tillsats av 150 T-celler till BrCa co-kulturen vid startpunkten, visade motsatta resultat till vad observerades hos PrCa co-kulturen. Ett högre antal T-celler påverkade inte märkbart BrCa-organoidernas differentiering jämfört med kontrollförhållandena. I denna co-kultur var BrCa-organoiderna till och med mindre invasiva än i kontrollförhållandena. Detta kunde bero på att ett för högt antal T-celler hämmade både tillväxten och invasionen hos organoiderna.





Figur 12. Fenotypiska förändringar hos PrCa-organoiderna vid tillsats av olika antal T-celler. (A) Konfokalbilder från kulturer bestående av endast PrCa-organoider (Kontroll), och co-kulturer med PrCa-organoider samt olika antal T-celler, 150 (Oakt Jurk\_150) eller 300 celler (Oakt Jurk\_300) per brunn. (B) Låddiagram för valda parametrar från AMIDA-analysen. Arian visar storleken för den segmenterade strukturen i pixlar, rundheten visar i procent hur väldifferentierad en organoid är, MaxApp är ett mått på hur långa de längsta oregelbuntheterna från mitten av en organoid är. P-värdet är baserat på Bonferroni korrigerade t-test. P = 0 indikerar att P-värdet är < 0,001. Antal analyserade organoider (n) syns med små siffror under låddiagrammen. Den röda sträckade linjen visar medianen och den röda prickn medeltalet.



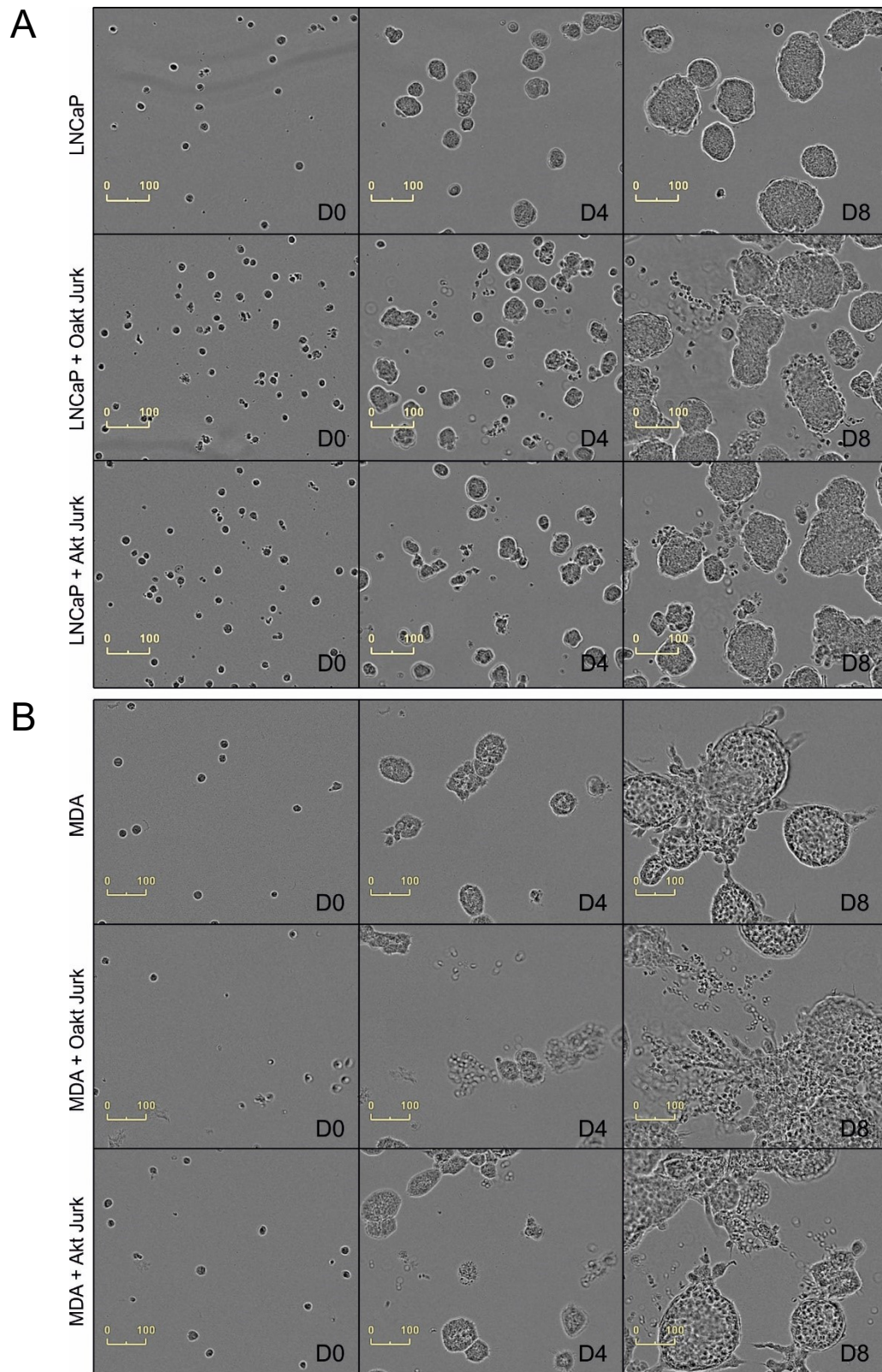
Figur 13. Fenotypiska förändringar hos BrCa-organoider vid tillsats av olika antal T-celler. (A) Konfokalbilder från kulturer med endast BrCa-organoider (Kontroll), och co-kulturer med BrCa-organoider samt olika antal T-celler, 150 (Oakt Jurk\_150) eller 300 (Oakt Jurk\_300) celler per brunn. (B) Lådidiagram för valda parametrar från AMIDA-analysen. Arealen visar storleken för den segmenterade strukturen i pixlar, rundheten visar i procent hur väldifferentierad en organoid är, MaxApp är ett mått på hur långa de längsta invadopodierna från mitten av en organoid är. P-värdet är baserat på Bonferroni korrigerade t-test.  $P = 0$  indikerar att P-värdet är  $< 0,001$ . Antal analyserade organoider (n) syns med små siffror under låddiagrammen. Den röda sträckade linjen visar medianen och den röda prickens medeltalet.

## 5.5 Tillsats av oaktiverade versus aktiverade T-celler till 3D co-kulturer

Till nästa undersöktes vilken effekt aktiveringen av T-cellerna hade på tumörmorfologin i dessa co-kulturer. Tillsatsen av oaktiverade T-celler jämfördes med tillsats av aktiverade T-celler. T-cellerna aktiverades av Prof. Lahesmaas grupp inför experimenten. Under aktiveringen tillsattes anti-CD3-antikroppar till T-cellerna och inkuberades i 24 timmar innan dessa T-celler sedan tillfördes co-kulturen. Under aktiveringen interagerar T-cellernas TCR med antikropparna. Denna interaktion startar en signalkaskad som leder till förändringar i DNA uttryck och fastställer hur T-cellerna differentieras. I detta fall tillför aktiveringen en Treg-fenotyp i T-cellerna. Treg står för regulatoriska T-celler och Tregs uppgift är att upprätthålla immuntoleransen och förhindra inflammation. I tumörvävnad betyder detta ökad invasion och metastasering (Chen et al., 2015).

3D co-kulturen med respektive tumörorganoider och de oaktiverade samt aktiverade T-celler uppföljdes i realtid med IncuCyte FLR under experimenten. I kontrollförhållandena bildade PrCa-cellerna runda, väldifferentierade organoider medan BrCa-cellerna bildade invasiva organoider (Figur 14). T-cellerna samlades omkring tumörorganoiderna både i co-kulturen med PrCa-celler och likaså i kulturen med BrCa-celler (Figur 14). Då fördelningen av de oaktiverade versus de aktiverade T-cellerna runt PrCa-organoiderna studerades märktes att de oaktiverade samlades jämnare runt organoiderna vid dag åtta. Dock blev det svårare att urskilja T-cellerna som samlades omkring BrCa-organoiderna på grund av BrCa-organoidernas invadopodier. En stor mängd oaktiverade T-celler syns runt invadopodierna hos BrCa-organoiderna. De aktiverade T-cellernas fördelning runt BrCa-organoiderna observerades inte lika tydligt (Figur 14).

Från IncuCyte bilderna gjordes inga kvantitativa mätningar utan tumörorganoidernas morfologi kvantifierades som tidigare från konfokalbilderna tagna med spinning disk konfokalmikroskopet vid slutpunkten. Då organoidernas area, rundhet och oregelbundenhet eller invasiva egenskaper observerades efter segmentering och analys med AMIDA märktes endast små skillnader mellan co-kulturen med oaktiverade versus aktiverade T-celler (Figur 15). PrCa- och BrCa-organoiderna reagerar dock olika på de oaktiverade versus de aktiverade T-cellerna. Då arean av PrCa-organoiderna analyserades observerades inga signifikanta skillnader mellan de PrCa-organoider som växt i co-kultur med oaktiverade T-celler jämfört med arean av de organoider som växt med aktiverade



Figur 14. Visualisering av 3D co-kulturer med tumör- och jurkat T-celler, oaktiverade (Oakt Jurk) och aktiverade (Akt Jurk) Jurkat T-celler i Matrigel (A) vid olika tidpunkter. MDA-MB-231 (MDA) BrCa-organoider och T-celler i Matrigel och kollagen blandning (B) vid olika tidpunkter. Pilarna indikerar T-celler. Bilderna är tagna med IncuCyte FLR. D: antal dagar i 3D-kultur.

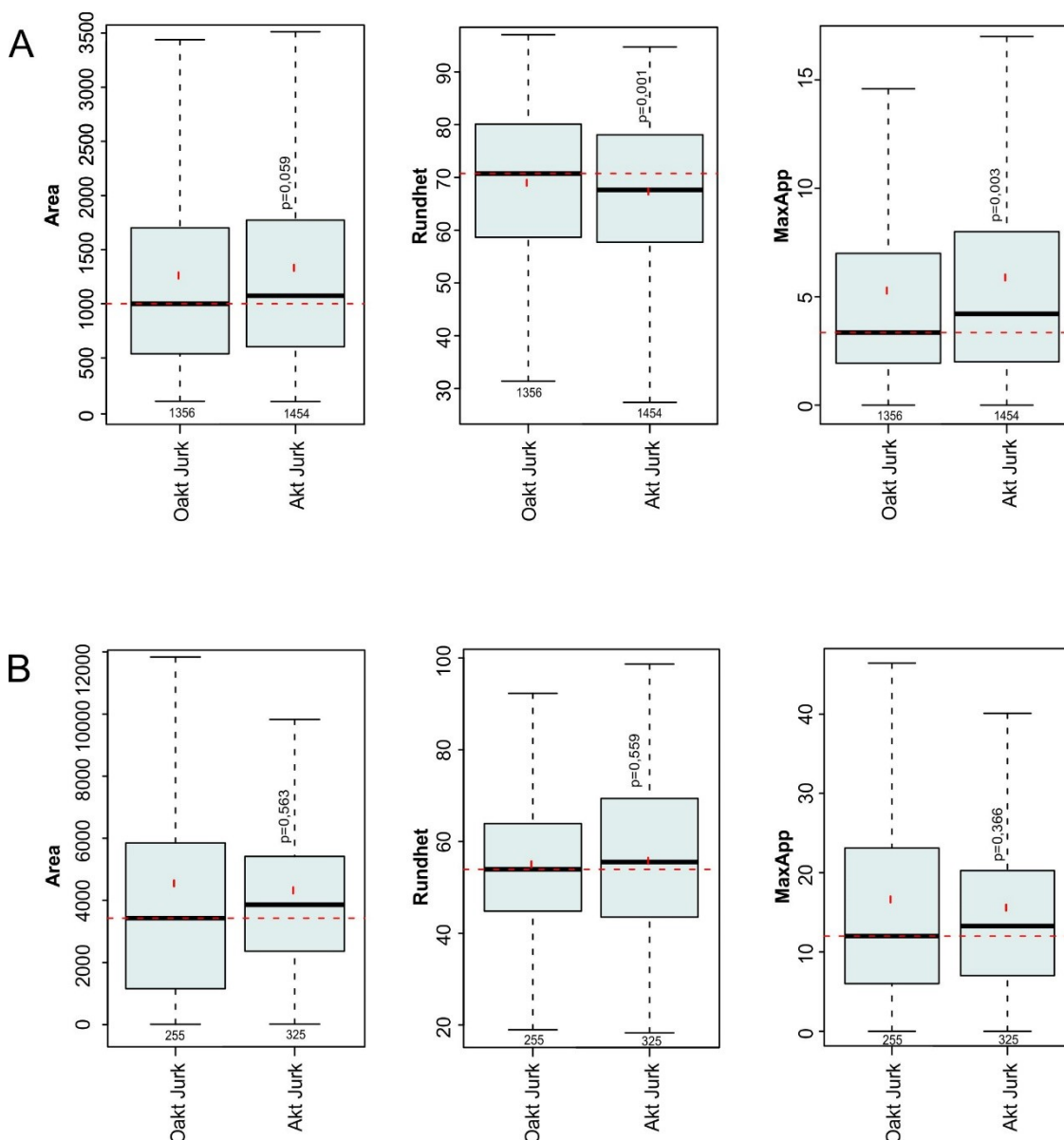
T-celler (Figur 15A). Då rundheten av organoiderna studerades observerades att de organoiderna som omgivits av de oaktiverade T-cellerna var mer runda, det vill säga differentierade än de organoiderna som omgivits av de aktiverade T-cellerna. Detta korrelerade med oregelbundheten av PrCa-organoiderna. De PrCa-organoider som omgivits av de aktiverade T-cellerna var mer oregelbundna (hade ett högre MaxApp värde) än de organoider som omgivits av oaktiverade T-celler vilket är ett tecken på att aktiveringen bidrar till förändrad morfologi av organoiderna (Figur 15A).

I motsats till PrCa-organoiderna påverkades BrCa-organoiderna av T-cellerna med motsatt effekt jämfört med PrCa-organoiderna. Aktiveringen av T-cellerna orsakade inga signifikanta skillnader i BrCa-organoidernas tillväxt eller differation (Figur 15B). Detta kunde bero på att BrCa-organoiderna redan i kontrollförhållande (Figur 14B) var invasiva och att endast tillsats av T-celler påverkade tumörmorfologin (Figur 13B). Aktivering av T-celler påverkade således inte BrCa-organoidernas morfologi märkbart. Detta kunde ha berott på att segmenteringen av de invasiva strukturerna inte fungerade optimalt, vilket rapporterades tidigare (Figur 11).

## **5.6 Effekten av primära immunceller på tumörorganoiderna i co-kultur**

I denna studie ville vi inte endast använda oss av en T-cellslinje utan även primära humana immunceller i co-kultur med tumörcellerna. Detta eftersom det i biologisk tumörvävnad finns flera olika typer av immunceller men även för att primära celler kan bete sig väldigt annorlunda än immortaliserade cellinjer som odlats lång tid i laboratorium (Ozdemir et al., 2014; Rhim et al., 2014). De isolerade cellerna bestod av en blandning med flera olika typer av immunceller i okända antal, så kallade PBMC:s (eng. peripheral blood mononuclear cell). Celltyper som ingår i PBMC:s är bland annat lymfocyter som T-, B- och NK-celler samt monocyter. Även dessa PBMC:s användes som oaktiverade medan en annan del av dessa CD3-aktiverades på samma sätt som i tidigare experiment. Skillnaden mellan PBMC:s effekt både som oaktiverade och aktiverade, på tumörorganoidernas morfologi analyserades med AMIDA.

De aktiverade PBMC:s påverkade organoidernas tillväxt så att dessa PrCa-organoider blev mindre till storleken än de PrCa-organoider som påverkats av de oaktiverade PBMC:s (Figur 16A). En viss population PrCa-organoider blev mer runda, medan en



Figur 15. Fenotypiska effekter av oaktiverade versus aktiverade Jurkat T-celler på LNCaP PrCa- (A) samt MDA-MB-231 BrCa-organoider (B). Låddiagram för parametrar av storlek (Area), differentiering (Rundhet) och längden av de oregelbundna eller invasiva strukturerna (MaxApp) för tumörorganoiderna i co-kultur med oaktiverade (Oakt Jurk) versus aktiverade (Akt Jurk) Jurkat T-celler. Statistiken är baserad på Bonferroni korrigerade t-test.  $P = 0$  indikerar att P-värdet är  $< 0,001$ . Antal analyserade organoider (n) syns med små siffror under låddiagrammen. Den röda sträckade linjen visar medianen och den röda prickens medeltalet.

annan population blev med oregelbundna då de omgavs av de aktiverade PBMC:s. Denna trend är motsatt till det tidigare experimentet där effekten av oaktiverade versus aktiverade Jurkat T-cellers effekt på tumörmorfologin studerades (Figur 15A). Då effekten av de aktiverade PBMC:s versus aktiverade Jurkat-celler på PrCa-organoider

jämförs observerades en liten motsatt effekt på PrCa- organoidernas storlek (Area) och oregelbundenhet (MaxApp).

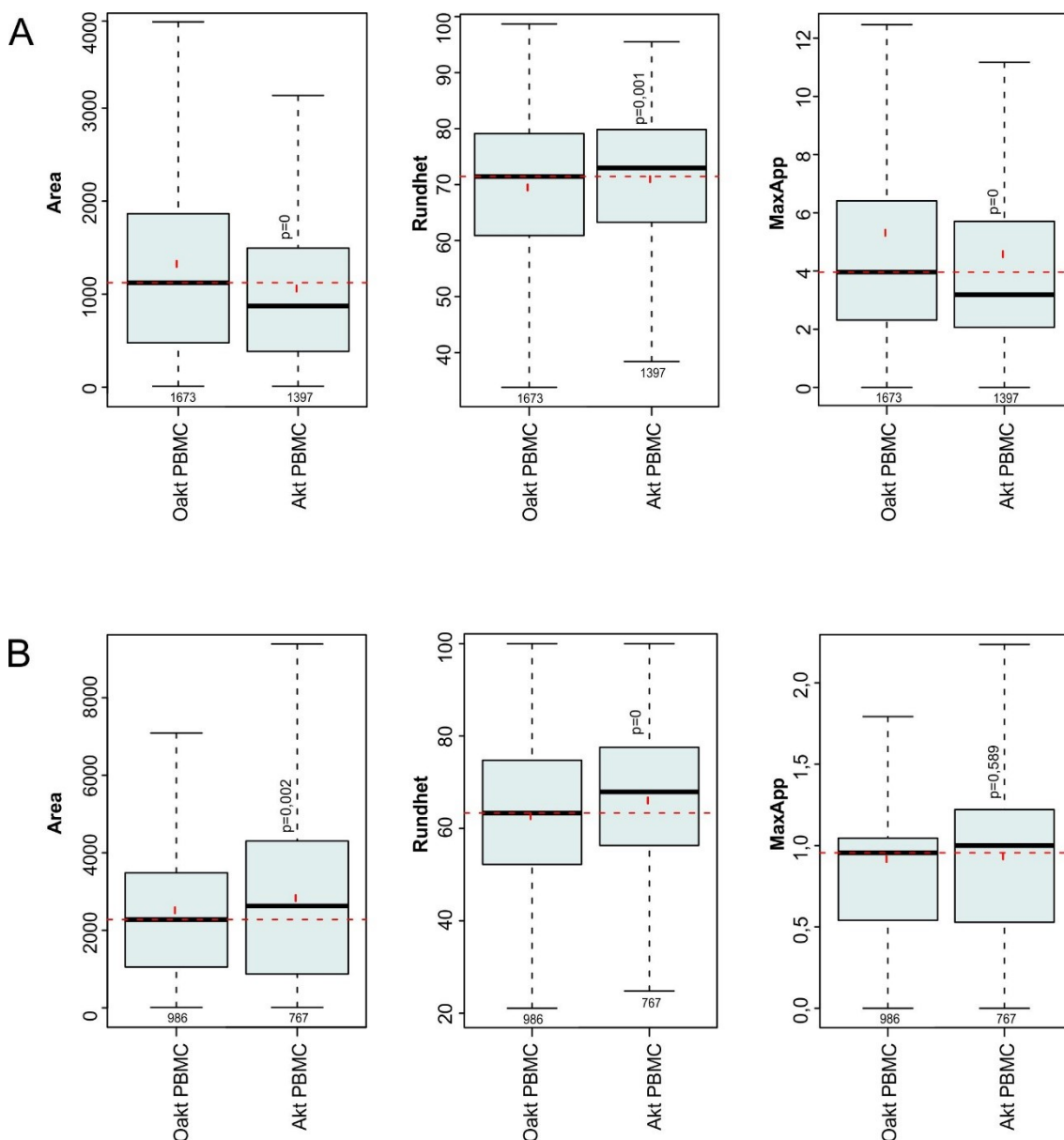
Då morfologin av BrCa-organoiderna studerades märktes endast marginala skillnader (Figur 16B). Även minimala skillnader visades vara signifikanta, eftersom antalet analyserade organoider (n) var så stort. BrCa-organoiderna visade dock motsatt förändring i morfologin vid tillförseln av oaktiverade respektive aktiverade PBMC:s då dessa resultat jämförs till PrCa-organoidernas respons på PBMC:s. Tillsats av de aktiverade PBMC:s fick BrCa-organoiderna att bli större, men samtidigt mindre invasiva, det vill säga rundare (Figur 16B). Brist på effekt gällande invasiviteten kan dels bero på segmenteringsproblemen av invasiva strukturer. Men dessa skillnader visade samma trend som de aktiverade Jurkat T-cellerna hade på BrCa-organoidernas morfologi i tidigare experiment (Figur 15B).

## **5.7 FOXP3 överuttryckande T-cellers inverkan på tumörorganoiderna i co-kulturen**

För att undersöka hurdan inverkan en så kallad Treg-fenotyp i FOXP3-överuttryckande T-celler har på tumörmorfologin tillsattes FOXP3<sup>+</sup> T-celler till 3D co-kulturen. Överuttryck av FOXP3 i T-celler betyder att antalet Treg-associerade receptorer på cellytan ökar samt att cytokinproduktionen inhiberas. FOXP3<sup>+</sup> Tregs förhindrar flera immuncellers funktion, och denna immunosuppressiva aktivitet har påvisats gynna tumörcellers tillväxt i cancervävnad och sägs främja invasion av tumören (Foley, 2011; Halvorsen et al., 2014). I dessa experiment användes samma ECM, cellantal och slutpunkt som i de tidigare experimenten. Här användes oaktiverade T-celler som kontroll för att kunna jämföra vilken effekt FOXP3<sup>+</sup> T-cellerna hade på PrCa- och BrCa-organoiderna i co-kulturen.

### **5.7.1 Optimering av antalet FOXP3<sup>+</sup> T-celler för co-kulturen**

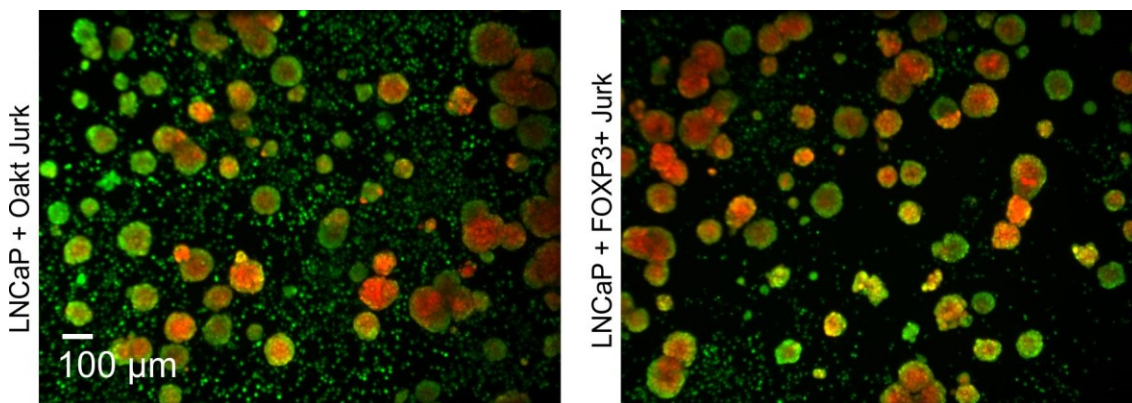
För att visualisera alla celler, speciellt de ofärgade T-cellerna, vid slutpunkten av experimenten färgades co-kulturen med Calcein AM. Efter visualisering av co-kulturen med det automatiserade spinning disk mikroskopet observerades tydligt en mindre mängd FOXP3<sup>+</sup> T-celler än oaktiverade T-celler runt tumörorganoiderna (Figur 17).



Figur 16. Effekten av oaktiverade versus aktiverade PBMC:s på PrCa- (A) samt BrCa-organoider (B). Låddiagram för parametrar av storlek (Area), differentiering (Rundhet) och längden av de oregelbundna eller invasiva strukturerna (MaxApp) för tumörorganoiderna i co-kultur med oaktiverade (Oakt PBMC) versus aktiverade PBMC:s (Akt PBMC). P-värdet är baserat på Bonferroni korrigerade t-test. P = 0 indikerar att P-värdet är < 0,001. Antal analyserade organoider (n) syns med små siffror under låddiagrammen. Den röda sträckade linjen visar medianen och den röda prickken medeltalet.

För att kunna jämföra proliferationsskillnaderna för respektive T-celler utfördes en 2D-cellkulturstudie. Med denna studie utreddes vilket antal FOXP3<sup>+</sup> T-celler måste tilläggas i början av experimentet för att i slutändan av 3D co-kulturerna ha ungefär lika stort antal FOXP3<sup>+</sup> T-celler som de oaktiverade kontroll Jurkat T-cellerna. För detta såddes samma antal av de båda T-cellerna i brunnar och cellerna fick växa i fyra dagar. Viabiliteten i





Figur 17. FOXP3<sup>+</sup> T-celler prolifererar mindre än oaktiverade T-celler i co-kultur med tumörorganoider. Konfokalbilder från co-kulturen med PrCa (LNCaP)-organoider och oaktiverade T-celler (Oakt Jurk) versus FOXP3<sup>+</sup> T-celler (FOXP3<sup>+</sup> Jurk). Vid startpunkten såddes samma antal celler till co-kulturen. Co-kulturen färgades med Calcein AM (grön). PrCa-organoiderna var dsRed-märkta (röda), T-cellerna ses som gröna.

respektive brunnar analyserades med WST-8 (eng. water-soluble tetrazolium salt) reagensen. Med viabilitetsanalysen mäts NADH i levande celler. WST-8 reagensen reduceras av dehydrogenasaktivitet i cellerna till gul eller orange färg (formazanfärg). Andelen färg i brunnarna är direkt proportionerlig med antalet levande celler, och denna färgmängd mättes via absorbansen i brunnarna. Absorbansen mättes med spektrofotometer (Thermo Scientific multiscan FC).

Absorbansen för formazan-färgförändringen i brunnarna mättes efter fyra dagars inkubation, och absorbansvärdena visade att det fanns fler celler i brunnarna med de oaktiverade T-cellerna. För att utesluta att detta endast berodde på att cellerna har olika dehydrogenaseffektivitet, mättes respektive cellers förmåga att omvandla WST-8 reagensen till formazan med hjälp av en standardkurva. Olika cellantal från 3000 till 100 000 celler för båda celltyperna såddes i brunnar. WST-8 reagensen tillsattes i brunnarna samtidigt som cellerna såddes och inkuberades sedan i två timmar varefter absorbansen på formazanmängden mättes vid 450 nm våglängd. På basen av standardkurvan från respektive celltyp räknades antalet T-celler från 2D-kulturen. Vid startpunkten såddes 10 000 av respektive T-celler och vid slutpunkten efter fyra dagar var resultatet ca 167 000 kontroll T-celler versus 67 000 FOXP3<sup>+</sup> T-celler. Som resultat visade det sig att de oaktiverade T-cellerna prolifererade 2,5 gånger snabbare än FOXP3<sup>+</sup>-cellerna. För vidare experiment användes således 150 kontroll T-celler och 375 FOXP3<sup>+</sup> T-celler per brunn för att jämma ut proliferationskillnaderna.

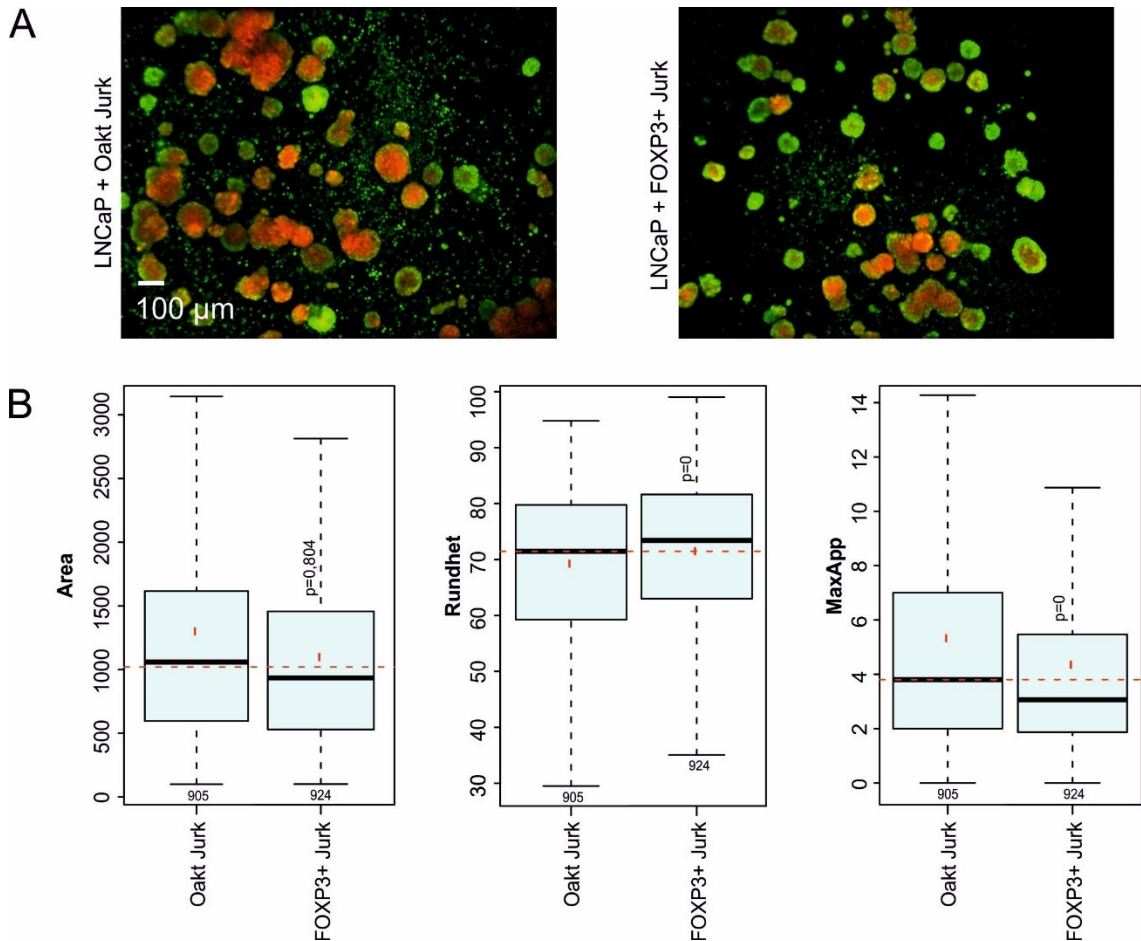
### 5.7.2 FOXP3<sup>+</sup> T-celler inducerar epitelisk differentiering av PrCa-organoider

För att undersöka vilken effekt dessa FOXP3<sup>+</sup> T-celler hade på tumörmorfologin utfördes åter fenotypisk analys av organoiderna med hjälp av AMIDA. För att kunna jämföra FOXP3<sup>+</sup> T-cellernas effekt på tumörorganoiderna användes även oaktiverade T-celler som kontroll. PrCa-organoiderna var sedan tidigare dsRed-märkta (röda) så för att visualisera även T-cellerna, färgades cellerna i co-kulturen med Calcein AM (gröna) före visualiseringen med spinning disk mikroskopet. Eftersom den kvantitativa analysen gällde endast tumörmorfologin, analyserades endast den röda kanalen på konfokalbilderna (Figur 18A). Efter segmentering och analys av PrCa-organoiderna med AMIDA detekterades ingen signifikant skillnad i storleken (Area) av organoiderna då co-kulturen med oaktiverade versus FOXP3<sup>+</sup> T-celler jämfördes (Figur 18B). Endast små skillnader observerades då differentieringen (Rundhet) och oregelbundenheten (MaxApp) studerades. Detta kunde bero på att det är en population som blev rundare medan en annan blev mer oregelbunden (Figur 18B).

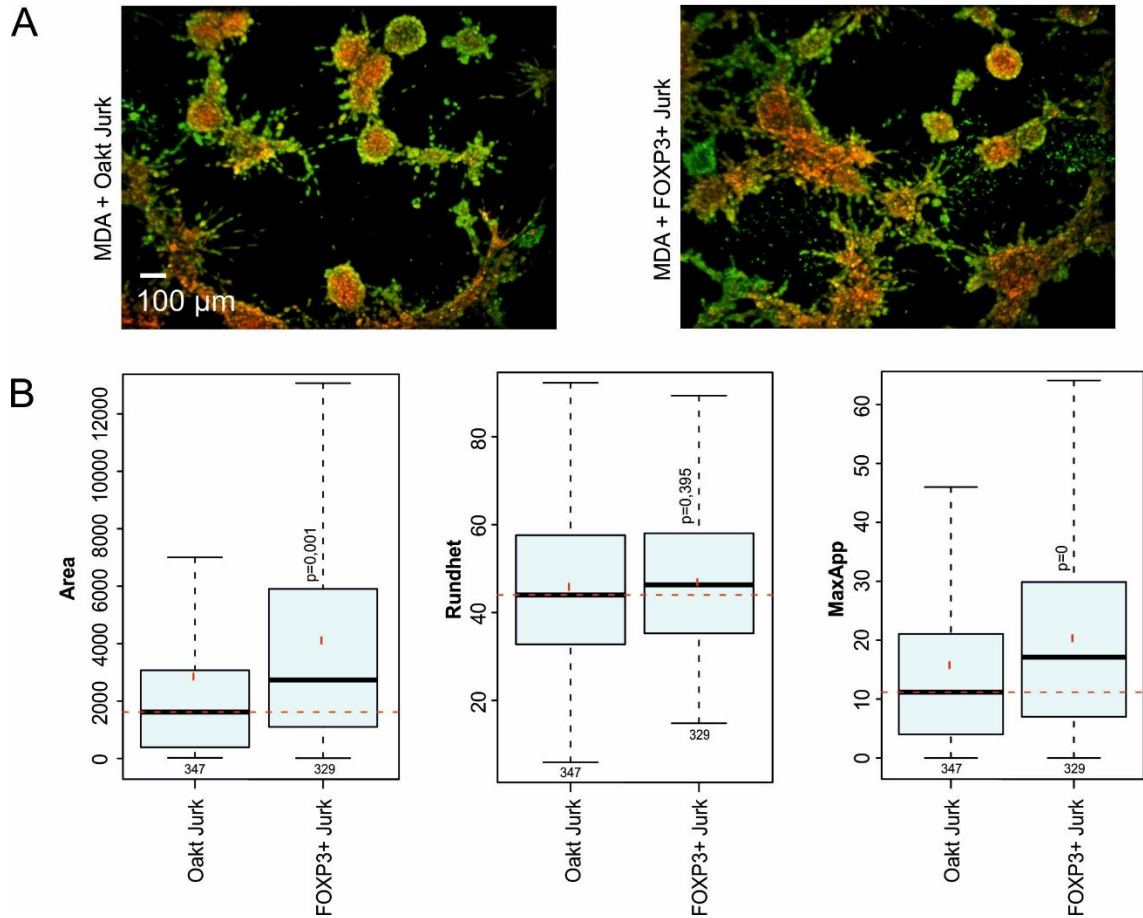
### 5.7.3 FOXP3<sup>+</sup> i T-cellerna ökar invasion och tillväxt av BrCa-organoider

För att undersöka de morfologiska skillnaderna mellan BrCa-organoider som växt i co-kultur med oaktiverade versus FOXP3<sup>+</sup> T-celler, analyserades den röda kanalen på konfokalbilderna med AMIDA. I motsats till PrCa-organoiderna som inte reagerade på Treg-fenotypen hos T-cellerna, visade BrCa-organoiderna tydliga skillnader i de tre parametrar som togs i beaktande. Då AMIDA kvantifieringar över tumörmorfologin utfördes observerades tydliga skillnader mellan de två olika co-kulturerna. De organoider som interagerat med FOXP3<sup>+</sup> T-cellerna var större (Area) än de organoider som levte i samspel med de oaktiverade T-cellerna (Figur 19B). Runda organoider som inte blivit invasiva kunde ses på konfokalbilderna från bägge co-kulturerna (Figur 19A). Dessa runda organoider vid sidan av andra invasiva organoider är ett ypperligt exempel på tumörheterogenitet, som även observeras hos cancerpatienter (Hoarau-Véchet et al., 2018). Dock observerades inga signifikanta resultat för differentiering (Rundhet). Intressant var att då invasiviteten av BrCa-organoiderna analyserades observerades en tydlig skillnad mellan de olika co-kulturerna. De organoider som interagerat med FOXP3<sup>+</sup> T-cellerna påvisade signifikant mera invasion (MaxApp) och längre invadopodier än de organoider som interagerat med de oaktiverade T-cellerna (Figur 19B). Resultaten visar därmed att Treg-fenotypen i T-celler ökar de invasiva egenskaperna hos aggressiva cancerceller. Det korrelerar även med att Tregs inverkar

olika på tumörmorfologin beroende på om Tregs växer i samspel med icke-invasiva tumörcellinjer eller mer aggressiva cellinjer som MDA-MB-231.



Figur 18. Effekten av oaktiverade versus FOXP3 överuttryckande T-celler på PrCa-organoider. (A) Konfokalbilder från co-kulturen med PrCa-organoider och oaktiverade versus FOXP3<sup>+</sup> T-celler. Tumörorganoiderna var dsRed-färgade (röda) medan co-kulturen färgades med Calcein AM för att även visualisera T-cellerna (gröna). (B) Kvantifiering av parametrar för tillväxt (Area), differentiering (Rundhet) och längden av de oregelbundna strukturerna (MaxApp) för tumörorganoiderna i co-kultur med oaktiverade Jurkat T-celler (Oakt Jurk) versus FOXP3<sup>+</sup> T-celler (FOXP3<sup>+</sup> Jurk). P-värdet är baserat på Bonferroni korrigerade t-test. P = 0 indikerar att P-värdet är < 0,001. Antal analyserade organoider (n) syns med små siffror under låddiagrammen. Den röda sträckade linjen visar medianen och den röda prickken medeltalet.



Figur 19. FOXP3<sup>+</sup> T-celler inducerar ökad tumörtillväxt och invasion av BrCa-organoider. (A) Konfokalbilder från co-kulturen med BrCa-organoider och oaktiverade Jurkat T-celler (Oakt Jurk) versus FOXP3<sup>+</sup> T-celler (FOXP3<sup>+</sup> Jurk). Tumörorganoiderna var dsRed-färgade (röda) medan co-kulturen färgades med Calcein AM för att även visualisera T-cellerna (gröna). (B) Kvantifiering av parametrar för tillväxt (Area), differentiering (Rundhet) och längden av de invasiva strukturerna (MaxApp) för tumörorganoiderna i co-kultur. P-värdet är baserat på Bonferroni korrigerade t-test. P = 0 indikerar att P-värdet är < 0,001. Antal analyserade organoider syns med små siffror under låddiagrammen. Den röda sträckade linjen visar medianen och den röda prickken medeltalet.

## 6. DISKUSSION

### 6.1 Biologiskt relevanta 3D-cancermodeller

Trots framsteg inom cancerbehandling under de senaste årtiondena, kvarstår cancer världsomfattande som den ledande dödsorsaken (Hoarau-Véchet et al., 2018). Speciellt svårt blir denna behandlingsforskning på grund av tumörernas komplexa och heterogena natur (Luqmani, 2005; Hoarau-Véchet et al., 2018). Användning av ändamålsenliga cellkulturmodeller för mikromiljön och tumörtillväxten är ett steg mot att bättre förstå den komplexa interaktionen mellan tumörcellerna och deras omgivning. 3D-cellmodeller fungerar som bryggan mellan 2D-cellkultur och biologiska in vivo modeller. I cancerrelaterad forskning är detta speciellt viktigt eftersom en biologisk tumörvävnad är ett komplext tredimensionellt nätverk. Biologisk tumörvävnad består av flera olika celltyper, till exempel olika immunceller och det omgivande ECM:et. I detta nätverk signalerar tumörcellerna sinsemellan, men även med den omgivande stödvävnaden och olika andra celltyper i TME (Saglam-Metiner et al., 2018). De senaste åren har 3D-modeller blivit mer och mer viktiga eftersom dessa modeller är mycket mer informativa än de traditionella 2D-cellkulturerna. I 3D-modellerna har tumörcellerna möjligheten att interagera med omgivande ECM och att differentieras till sammanhängande tumörliknande organoider (Härmä et al., 2010, Björk et al., 2016). I 3D-modellen som användes i detta projekt, fungerar ECM:et som stöd för cellerna men tumörcellerna interagerar även med ECM:et, vilket kan inducera olika egenskaper som till exempel invasion (Härmä et al., 2010; Kikuchi et al., 2011). Flera celltyper har också olika morfologiska egenskaper beroende på om de odlas i 2D eller 3D-kulturer (Breslin och O'Driscoll, 2016). Olika immunceller, till exempel T-, B- och NK-celler finns i biologisk tumörvävnad (Chen et al., 2015). Immunceller i kroppen har som uppgift att inducera inflammation, men även att förhindra tumörprogression. Tumörvävnaden kan i fler fall hämma immuncellernas egenskaper att inducera inflammation genom att nedreglera immuncellernas anti-tumör funktioner och istället omvända immuncellerna till att upprätthålla tumörvävnadens funktioner (Chen et al., 2015).

Målet med detta projekt var att etablera en stabil 3D-cellkulturmodell för både tumör- och immuncellerna, undersöka vilken effekt tillsatsen av immuncellerna har på tumörorganoidernas tillväxt och morfologi och vare sig aktivering av immuncellerna

inducerar en förändring i tumörmorfologin jämfört med de oaktiverade kontrollcellerna. Vidare undersöktes om FOXP3<sup>+</sup> i T-celler inducerar invasion hos tumörorganoiderna.

## 6.2 Etablering av den tredimensionella co-kulturmodellen

Eftersom tumörvävnad i kroppen är ett så komplext nätverk som har invecklade signaleringsräckor och konstant växer och differentieras måste detta tas i beaktande då val av cellkulturmodell väljs. För att utveckla en så biologiskt relevant modell som möjligt går denna typ av studie inte att utföra i de vanliga 2D-modellerna. I 2D-cellkultur kan tumörcellerna inte bilda tumörliknande organoider och inte interagera med det biologiskt viktiga ECM. Därför måste nya mer biologiska cellkulturer utvecklas för att skapa modeller som imiterar in vivo förhållandena. Olika 3D-modeller finns publicerade (Breslin och O'Driscoll, 2016) men här användes en modell där cellerna lades i biologiskt relevant ECM, som Matrigel och kollagen I, som bidrar till en mer äkta miljö för tumörcellerna (Härmä et al., 2010, Åkerfelt et al., 2015). Även tillsatsen av immunceller till 3D-cellkultur är ett relativt ostuderat område, men det bidrar även till en tillväxtmiljö för tumörcellerna som mer efterliknar biologisk TME.

I en annan typ av 3D-modeller kan tumörcellerna bilda så kallade cellsfäroider, som består av komprimerade cellmassor. I dessa strukturer är kompaktheten svår att uppskatta och likaså antalet celler i sfäroiderna. I denna typ av cellkultur har det visats att MDA-MB-231 BrCa-linjen bildar löstsittande sfäroider (Han et al., 2015). I den metod som användes i detta projekt bildar samma cellinje, MDA-MB-231, tumörorganoider med invasiva egenskaper (Figur 13A och 14B). Dock visade det sig svårt att analysera de invasiva strukturerna hos BrCa-organoiderna med AMIDA. AMIDA-programmet klarar inte av att segmentera de invasiva strukturerna utan klipper av dem, eller segmenterar dem till mindre skilda strukturer (Figur 11B). Dock pågår ytterligare utveckling av analysprogrammet i laboratoriet för att förbättra programmets egenskaper.

En liknande 3D co-kulturmodell, med tumörceller och fibroblaster, hade använts i tidigare studier i laboratoriet (Åkerfelt et al., 2015) och användes som grund för den här studien. Modellen utvecklades för att studera immunonkologiska frågeställningar. Eftersom cellerna i in vivo tumörvävnad samspekar med olika typer av immunceller tillsattes T-celler och även andra immunceller till denna modell för att bilda co-kulturer

som bättre efterlikna biologiskt relevant TME. Undersökning av T-cellernas effekt i denna cellkulturmodell är speciellt intressant eftersom den grundläggande tanken bakom immunoterapi är att använda T-celler och andra immunceller samt passande antikroppar att förstöra cancercellerna (Bertucci & Gonçalves, 2017).

Från början var det planerat att GFP- (eng. green fluorescent protein) märkta T-celler skulle användas för att i real-tid kunna följa med hur dessa T-celler rör sig i 3D co-kulturen med respektive tumörorganoider. GFP-signalen var dock inte tillräcklig för visualisering i levande celler i real-tid. Det borde göras en ny fluorescent-märkning av Jurkat-cellerna för att fullborda studien. Detta vore ytterst intressant eftersom det från IncuCyte bilderna observeras att T-cellerna samlas runt tumörorganoiderna (Figur 14). Med en stark fluorescent-märkning av T-cellerna kunde det vara intressant att följa med ifall T-cellerna infiltreras i tumörorganoiderna. Detta är ett välkänt fenomen som påverkar den naturliga och adaptiva immunresponsen i tumörvävnad samt inducera ökad utveckling av blod- och lymfkärl i biologisk tumörvävnad (Hu et al., 2015). Ökad migrering av olika TIL:s till PrCa- och BrCa-vävnad har påvisats i flera olika studier (Miller et al., 2006; Kuniwa et al., 2007; Sawe et al., 2016).

### **6.3 T-celler påverkar tumörorganoidernas proliferation och morfologi**

I och med att det i biologisk tumörvävnad finns ett urval av olika T-celler samt andra immunceller, betyder att tumörvävnaden kräver olika typer av immunceller runtom sig för att kunna växa, inducera angiones och metastasera till omgivande vävnader (Pattabraman & Weinberg, 2014). För att senare kunna använda denna modell för att möjligtvis testa läkemedel relaterade till immunoterapier, valdes T-celler som celltyp för dessa co-kulturer. Det var av speciellt intresse att studera vilken effekt tillsatsen av T-celler hade på PrCa- och BrCa-organoidernas morfologi. Resultaten visade att tillsatsen av T-celler hade tydliga effekter på tumörorganoidernas morfologi. Organoiderna växte sig även större i samspel med T-cellerna och att PrCa-organoiderna blev mer oregelbundna på ytan medan BrCa-organoiderna blev mer invasiva (Figur 12 och 13).

Liknande organotypiska 3D co-kulturer, för att studera tumör- och immuncells interaktioner och förstå signaleringen mellan dessa celler, är inte så vanliga (Adriani et al., 2018; Dijkstra et al., 2018). Det finns några exempel på liknande modeller där olika

immunceller har odlats i co-kultur med olika carcinomaceller. I ett av exemplen har perifera blodlymfocyter odlats i 3D co-kultur med tumörorganoider för att generera tumör-reaktiva T-celler och för att undersöka hur känsliga tumörerna är mot de reaktiva T-cellerna (Dijkstra et al., 2018). Dijkstra et al. etablerade en plattform där de lyckades inducera och analysera tumör-specifika T-cellsresponser hos epitela tumörer. De rapporterade att co-kulturer från autologa tumörorganoider och perifera blodlymfocyter kan användas för att utveckla tumörreaktiva T-celler från perifert blod från patienter. Dessa T-celler kan sedan användas för att undersöka hur effektivt T-celler kan förstöra tumörorganoider (Dijkstra et al., 2018). En annan 3D-cellmodell har använts för att optimera adaptiv cellterapi och med den undersöktes monocytas roll i en levertumörmodell för att screena T-cellsbaserade immunterapier (Adriani et al., 2018). Adriani et al. visade att deras 3D-system kunde användas för att studera effekten av de upprätthållande cytokinerna och förändringar i syrenivåer som vanligtvis påvisas i leverns TME. Denna 3D-modell fungerar som hjälpmedel för att kvantifiera T-cellernas anti-tumör aktivitet under olika förhållanden (Adriani et al., 2018).

Med 3D-modellen som etablerades i vårt laboratorium visade sig T-cellernas enorma proliferation vara ett problem. Trots att väldigt få T-celler såddes vid startpunkten prolifererade dessa celler och fyllde kulturen redan på några dagar. Möjligtvis kunde ett ännu färre antal T-celler användas vid startpunkten. Ett annat problem som observerades genom experimenten med BrCa-organoiderna är att T-cellerna vandrade till botten av brunnarna längs tumörorganoidernas invasiva strukturer. Detta problem är svårt att lösa men denna rörelse av T-cellerna vore intressant att uppfölja i real-tid, ifall fluorescentmärkning av T-cellerna kunde uppnås.

#### **6.4 T-cellernas aktivering hade inga markanta effekter på tumörmorfologin**

Eftersom aktivering av immunceller, speciellt T-celler, är ett så väl studerat område eftersom aktiveringen av T-cellerna inducerar en Treg-fenotyp som dämpar immunresponser riktade mot cancerceller och istället främjar invasion och metastasering av tumörceller. Därmed var det av intresse av att studera aktiveringens effekt på tumörmorfologin. Från publicerad litteratur är det känt att CD3-aktivering inducerar Treg-fenotypen i T-cellerna (Chen et al., 2015; Najafi et al., 2018). Signalmaskineriet



under och efter aktiveringen är välkänt, men effekten av aktiveringen på tumörorganoider i 3D-kultur är inte lika studerat (Oeste & Alarcón, 2016). Då aktiveringen av T-cellerna studerades observerades ingen signifikant skillnad på morfologin hos tumörorganoiderna (Figur 15). Möjligtvis kunde även andra metoder än anti-CD3 ha använts vid aktiveringen för att inducera tydligare morfologiska förändringar hos tumörorganoiderna. Andra aktiveringsmöjligheter kunde vara att använda andra antikroppar för CD28, CD137, CD27, CD70, eller för interleukiner som IL-2 eller IL-12 (Chen & Mellman, 2013; Anastakis et al., 2015). Ifall målet vore att reducera immunaktiviteten kunde inhibitorer som cytotoxiskt T-lymfocyt-associerat protein 4 (eng. cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA4), PD-L1 (eng. programmed death-ligand 1) eller prostaglandiner användas (Chen & Mellman, 2013).

För att inte endast använda Jurkat T-celler, användes också PBMC:s isolerade från humant blod. PBMC:s består bland annat av lymfocyter som T-, B- och NK-celler samt monocyter, så denna blandning av immunceller är någonting som bra kunde finnas i biologisk tumörvävnad (Chen et al., 2015). För att undersöka ifall aktiveringen av PBMC:s hade någon effekt på tumörmorfologin aktiverades även dessa celler med CD3-antikroppar. Resultaten visade att aktiveringen av PBMC:s minskade tillväxten hos PrCa-organoider, ökade rundheten och hämmade bildningen av oregelbundna strukturer (Figur 16A). Denna effekt av aktiverade PBMC:s var motsatt till hur de aktiverade Jurkat T-cellerna påverkade PrCa-organoiderna. De suppressiva egenskaperna av de aktiverade T-cellerna i de tidigare experimenten kanske inte märktes eftersom det bara fanns en typ av immunceller i kulturerna och eftersom Jurkat T-cellerna är en immortaliserad cellinje (Figur 15). PBMC:s består i sin tur av flera olika celltyper. Hos BrCa-organoidernas morfologi påvisades inga signifikanta skillnader då oaktiverade och aktiverade PBMC:s tillsattes i co-kulturen (Figur 16B). Detta kunde bero på svårigheter i segmentering av de invasiva strukturerna.

I de presenterade resultaten isolerades PBMC:s från en frisk individ. Men det ultimata experimentet skulle utföras både med tumörceller och PBMC:s från samma cancerpatient. Om både tumör- och immuncellerna härstammar från samma patient kunde dessa cellers samverkan studeras på patientspecifik nivå i den utvecklade 3D co-kulturmodellen. Trots tumörernas heterogenitet skulle vara möjligt att studera individuella skillnader mellan cancerpatienters responser på olika cancerläkemedel.

## 6.5 FOXP3<sup>+</sup> i T-celler bidrar till ökad invasion hos BrCa-organoider

För att undersöka Treg-fenotypens betydelse på tumörmorfologin i co-kulturen studerades FOXP3<sup>+</sup> T-cellernas effekt hos PrCa- och BrCa-organoider. Detta eftersom just FOXP3 proteinets överuttryck är den mest specifika markören för Tregs och har tidigare visat inducera en Treg fenotyp hos T-celler (Zheng et al., 2007). Under normala förhållanden i kroppen representerar Tregs ett litet antal av populationen T-celler som finns i kroppen och till deras viktigaste uppgift hör att upprätthålla immunsystemets homeostas. Antalet av dessa Tregs är avsevärt förhöjt i så gott som alla typer av cancer, inklusive prostata- och bröstcancer (Najafi et al., 2018). Flera olika signaler som till exempel TGF- $\beta$ , inhiberande cytokiner som interleukiner, och olika transkriptionsinducerare som IL-10, TGF1 och glukokortikoidinducerad tumornekrosfaktor (eng. glucocorticoid induced tumor necrosis factor, GITR) aktiveras av Tregs (Abo-Elenein et al., 2008). Det är bland annat dessa aktiverade signalräckor som bidrar till att Tregs ökar immunsuppression och invasion hos tumörer (Abo-Elenein et al., 2008).

Under det första experimentet där FOXP3<sup>+</sup> T-cellerna växte i samspel med tumörorganoiderna, märktes det vid slutpunkten av experimentet att det fanns ett mycket mindre antal av dessa T-celler än kontroll T-cellerna (Figur 17). Denna skillnad utjämnades i fortsatta experiment så att det i slutpunkten av experimentet fanns ett ungefär lika stort antal FOXP3<sup>+</sup> T-celler som kontroll T-celler. Efter denna justering av cellantalen kunde man mera pålitligt jämföra resultaten från co-kulturen med respektive T-celler. Resultaten visade att tillsatsen av FOXP3<sup>+</sup> T-celler till PrCa co-kulturen inte inducerar invasion hos tumörcellerna. Detta var förväntat eftersom LNCaP-cellerna inte är så aggressiva tumörceller och inte utvecklar en invasiv fenotyp, utan mera oregelbundna strukturer (Härmä et al., 2010). Vidare visade resultaten att PrCa-organoiderna som levte i samspel med FOXP3<sup>+</sup> T-cellerna endast var något mer differentierade och runda än de organoider som växt med kontroll T-cellerna (Figur 18). De mest intressanta resultaten påvisades i co-kulturen med BrCa-organoider (Figur 19). MDA-MB-231-cellerna är av aggressiv natur (Paraic et al., 2007). Det är säkert orsaken till att BrCa-organoiderna som hade levte i samspel med FOXP3<sup>+</sup> T-cellerna blev signifikant större och klart mera invasiva än BrCa-organoiderna i co-kulturen med kontroll T-celler (Figur 19B). Detta resultat stämmer väl överrens med litteraturen där

överuttryck av FOXP3 inducerar invasion av tumörer (Bates et al., 2006; Syed Khaja et al., 2017).

## 6.6 Slutsatser och fortsatt forskning

Under detta pro gradu-projekt har en stabil co-kultursmodell etablerats och visats användbar för att studera immuncellers effekt på två olika tumörcellslinjer. Tillsats av T-celler till både PrCa- och BrCa-organoider resulterade i ökad tillväxt av tumören samt ökad invasion hos BrCa-organoiderna. Aktiveringen av T-cellerna visade inga drastiska skillnader på tumörorganoidernas morfologi. De aktiverade T-cellerna ökade ändå oregelbundenheten hos PrCa-organoiderna. PBMC:s inverkan på tumörorganoiderna visade intressantare resultat. Här påvisades att aktiverade PBMC:s hämmade tillväxten och inducerade differentiering hos PrCa-organoiderna medan BrCa-cellerna växte sig till större men mer differentierade organoider. Ett viktigt och intressant resultat som observerades var att tillsats av FOXP3<sup>+</sup> T-celler till 3D-kulturen med tumörorganoider medförde ökad differentiering och mindre oregelbundna strukturer hos PrCa-organoiderna. Främst fastställdes att FOXP3<sup>+</sup> T-celler inducerade ökad tillväxt och invasion hos BrCa-organoiderna. I och med att FOXP3<sup>+</sup> konstaterades inducera ökad invasion hos BrCa-organoiderna vore det intressant att undersöka om knock down av FOXP3-uttryck skulle hindra invasion och inducera en mer differentierad och rund fenotyp hos BrCa-organoiderna. Knock-down av FOXP3-uttryck kan dock inte utföras i patienter, utan bäst vore det att använda inhibitorer för FOXP3. Några sådana inhibitorer har redan studerats. Casares et al. rapporterade att den syntetiska peptiden P60 inhiberar den nukleära translokationen av FOXP3 och inhiberar samtidigt Tregs. Detta förbättrade stimuleringen av effektor T-celler (Casares et al. 2010). I en annan studie visades att det kemoterapeutiska läkemedlet epirubicin förhindrade interaktionen mellan FOXP3 och transkriptionsfaktorn p65. Epirubicin hindrade även den suppressiva funktionen av Tregs (Kashima et al., 2016). Flera FOXP3 inhibitorer kommer säkert att studeras i vidare forskning.

För vidare forskning vore det intressant att odla andra tumörcellinjer i motsvarande 3D co-kultur. Som följande cellinjer kunde kanske en annan PrCa-celinje som PC-3 användas för att undersöka hur mer invasiva PrCa-organoider reagerar på tillsatsen av olika immunceller. Ett annat alternativ kunde vara att tillsätta andra celltyper till co-

kulturen med tumörceller och T-celler. Några exempel på sådana immunceller kunde vara makrofager. Ackumulation av M<sub>2</sub>-makrofager som aktiveras av interleukiner i tumörvävnad, har korrelerats med försämrad prognos i flera cancertyper (Martinez-Marin et al., 2017). M<sub>1</sub>-makrofager aktiveras av interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) och har visats producera höga halter av inflammatoriska cytokiner och ha tumör-förstörande (eng. tumoricidal) effekt (Martinez-Marin et al., 2017).

I immunterapi utnyttjas egenskaperna av kroppens eget immunförsvarssystem till att förstöra cancerceller. Det finns flera olika former av immunoterapi som i stora drag indelas i passiv eller aktiv immunoterapi (Bertucci & Gonçalves, 2017). I den passiva immunoterapi används en färdig dos av antikroppar eller specifika celler som tillförs i patienten och där identifierar tumören. Den aktiva immunoterapi bygger på patientens egna immunceller aktiveras för att skapa individuella behandlingar mot tumörceller. Till aktiv immunoterapi räknas bland annat cancervacciner och immunosuppressiva läkemedel som CTLA-4 blockerare (ipilimumab) och programmerad död 1 (eng. programmed death 1, PD-1) blockerare (nivolumab) (Sharma & Allison, 2015). Dessutom används icke-selektiva immunaktivatorer som interferon-alfa, i aktiv immunoterapi (Sharma & Allison, 2015; Kobold et al., 2018). Immunoterapi har visats effektivt för att behandla PrCa (Janiczek et al., 2017) och BrCa (Bertucci & Gonçalves, 2017). Också neutraliserade antikroppar används och dessas syfte är att spärra specifika tillväxtfaktorer som är viktiga för receptorerna eller tillväxten av cancerceller (Kobold et al., 2018). För framtida forskningsförslag, kunde immunoterapi först studeras in vitro på cellinjer i denna etablerade 3D co-kulturmodell och i vidare studier på tumör- och immunceller från patientmaterial. För att underlätta valet av rätt immunoterapi till rätt patient, borde patientens egna celler odlas i 3D co-kultur. Olika immunoterapiformer kunde även kombineras med de traditionella cancerbehandlingsformerna för att möjliggöra så effektiv behandling som möjligt (Bertucci & Gonçalves, 2017).

Vid läkemedelstestning är det viktigt att kunna studera effekten av de olika läkemedlen i så relevant 3D-modell som möjligt. Det betyder att aktiva signaleringsräckor i samspelet mellan respektive celler kunde studeras i kontrollförhållanden men också efter att olika inhibitorer tillsatts till co-kulturerna. Inhibitorer för tillväxtfaktorer och invasionsförmedlare kunde användas för att hindra bildningen av dessa tumörorganoider

och invasiva strukturer. I cancertyper som bröst- och äggstockscancer, hämmar PD-1 receptorens T-cellernas aktivitet (Ghebeh et al., 2006; Hamanishi et al., 2007; Ribas, 2012). I behandling för BrCa kunde till exempel CTLA-4, anti-PD-1 och anti-PD-L1 immunkontrollpunktsinhibitorer testas i denna 3D co-kulturmodell (Solinas et al., 2017).

Avslutningsvis är det viktigt att framföra att organotypiska 3D co-kulturer kan användas för flera olika viktiga ändamål inom biologisk forskning. Speciellt användbara är dessa 3D-modeller eftersom de kan ersätta eller minska antalet in vivo studier som kräver flera lov och orsakar etiska problem. Eftersom alla tumörer är heterogena är det väldigt vanligt att tumörceller utvecklar läkemedlesresistens, undanflykt av apoptos och ökad EMT (Housman et al., 2014; Chen et al., 2015). Detta gör det viktigt att utveckla nya modellsystem som har motsvarande komplexitet och heterogenitet som patienters tumörvävnad. Det behövs för att kunna öka läkemedelseffekter i en så biologiskt relevant modell som möjligt. Eftersom undersökning med hjälp av organotypiska 3D co-kulturmodeller blir allt vanligare (Fennema et al., 2013; Augustine et al., 2015; Åkerfelt et al., 2015) är det förhoppningsvis möjligt i framtiden att använda denna optimerade modell med tumörceller och immunceller för vidare studier inom den framskridande immunonkologiska forskningen.

## 7. TILLKÄNNAGIVANDEN

Tusen tack Malin för att du har fungerat som min handledare för detta pro gradu-arbete i Matthias Nees grupp. Jag är verkligen lycklig lottad över att ha fått jobba med ett så här intressant projekt i ert laboratorium. Din handledning Malin, har varit väldigt hjälpsam, noggrann och inspirerande. Jag vill även tacka dig för all praktisk handledning i laboratoriet och över all handledning i varierande dataprogram.

Tack även till Jesse Mattsson som har fungerat som extra handledare i laboratoriet och hjälpt till med de oändligt många AMIDA och Rex-analyserna med tillhörande problematik.

Sist men inte minst vill jag tacka mina härliga klasskamrater Vilma, Sandra och Taru för att ni har gjort min studietid till fem oförglömliga år! Tack åt er för att ni dessutom har stöttat under de stressigare tidpunkterna men också bidragit med avslappnande och skattfyllda kvällar. Ett stort tack går också till Filip som alltid omgiver mig med positivitet och för att han orkat knuffa upp mig för detta graduberg. Tack även till familjen och mommo och mofa för oändligt stöd.

## 8. LITTERATURFÖRTECKNING

### 8.1 Artiklar

- Abo-Elenein A., Elgohary S.E., Hashish A. & El-Halaby E. (2008) Significance of Immunoregulatory T Cells in Different Stages of Breast Cancer Patients. *Egypt. J. Immunol.* 15: 145-152.
- Adriani G., Pavesi A. & Kamm R.D. (2018) Studying TCR T cell anti-tumor activity in a microfluidic intrahepatic tumor model. *Methods. Cell Biol.* 146: 199-214.
- Anestakis D., Petanidis S., Kalyvas S., Nday C.M., Tsave O., Kioseoglou E. & Salifoglou A. (2015) Mechanisms and Applications of Interleukins in Cancer Immunotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 1691-1710.
- Antoni D., Burckel H., Josset E. & Noel G. (2015) Three-dimensionall Cell Culture: A Breakthrough in Vivo. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 5517-5527.
- Augustine T.N., Dix-Peek T., Duarte R. & Candy G.P. (2015) Establishment of a heterotypic 3D culture system to evaluate the interaction of TREG lymphocytes and NK cells with breast cancer. *J. Immunol. Methods* 426: 1-13.
- Bates G.J., Fox S.B., Han C., Leek R.D., Garcia J.F., Harris A.L. & Banham A.H. (2006) Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J. Clin. Oncol.* 24: 5373-5380.
- Bertucci F. & Gonçalves A. (2017) Immunotherapy i Breast Cancer: the Emerging Role of PD-1 and PD-L1. *Curr. Oncol. Rep.* 19: 1-10.
- Björk J.K., Åkerfelt M., Joutsen J., Puustinen M.C., Cheng F., Sistonen L. & Nees M. (2016) Heat-shock factor 2 is a suppressor of prostate cancer invasion. *Oncogene* 35: 1770-1784.
- Breslin S. & O'Driscoll L. (2016) The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensivity and resistance. *Oncotarget* 7: 45745-45756.

- Cailleau R., Young R., Olivé M. & Reeves Jr. W.J. (1974) Breast Tumor Cell Lines From Pleural Effusions. *J. Natl. Cancer Inst.* 53: 661-674.
- Casares N., Rudilla F., Arribillaga L., Llopiz D., Riezu-Boj J.I., López-Sagaseta J., Guembe L., Sarobe P., Prieto J., Borrás-Cuesta F. & Lasarte J.J. A peptide inhibitor of FOXP3 impairs regulatory T cell activity and improves vaccine efficacy in mice. *J. Immunol.* 185: 5150-5159.
- Chen D.S. & Mellman I. (2013) Oncology meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity* 39: 1-10.
- Chen F., Zhuang X., Lin L., Yu P., Wang Y., Shi Y., Hu G. & Sun Y. (2015) New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. *BMC Med.* 5: 13-45.
- Dijkstra K.K., Cattaneo C.M., Weeber F., Chalabi M., van de Haar J., Fanchi L.F., Slagter M., van der Velden D.L., Kaing S., Kelderman S., van Rooij N., van Leerdan M.E., Depla A., Smit E.F., Hartemink K.J., de Groot R., Wolkers M.C., Sachs N., Snaebjornsson P., Monkhorts K., Haanen J., Clevers H., Schumacher T.N. & Voest E.E. (2018) Generation of Tumor-Reactive T Cells by Co-culture of Peripheral Blood Lymphocytes and Tumor Organoids. *Cell* 174: 1586-1598.
- Fang M., Yuan J., Peng C. & Li Y. (2014) Collagen as a double-edged sword in tumor progression. *Tumour Biol.* 35: 2871-2882.
- Fennema E., Rivron N., Rouwkema J., van Blitterswijk C. & De Boer J. (2013) Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues, *Trends Biotechnol.* 31: 108-115.
- Foley J.F. (2011) T<sub>regs</sub> Promote Metastasis. *Sci. Signal.* 4: 162.
- Ghebeh H., Mohammed S., Al-Omair A., Qattan A., Lehe C., Al-Qudaihi G., Elkum N., Alshabanah M., Bin Amer S., Tulbah A., Ajarim D., Al-Tweigeri T. & Dermime S. (2006) The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia* 8: 190–198.



- Halvorsen E.C., Mahmoud S.M. & Bennewith K.L. (2014) Emerging roles of regulatory T cells in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 33: 1025-1041.
- Hamanishi J., Mandai M., Iwasaki M., Okazaki T., Tanaka Y., Yamaguchi K., Higuchi T., Yagi H., Takakura K., Minato N., Honojo T. & Fujii S. (2007) Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup>T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 3360–3365.
- Han C., Takayama S. & Park J. (2015) Formation and manipulation of cell spheroids using a density adjusted PEG/DEX aqueous two phase system. *Sci. Rep.* 5: 11891.
- Hoarau-Véchet J., Rafii A., Touboul C. & Pasquier J. (2018) Halfway between 2D and Animal models: Are 3D Cultures the Ideal Too, to Study Cancer Microenvironment Interactions? *Int. J. Mol. Sci.* 19: 181.
- Horoszewicz J.S., Leong S.S., Kawinski E., Karr J.P., Rosenthal H., Chu T.M., Mirand E.A. & Murphy G.P. (1983) LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.* 43: 1809-1818.
- Housman G., Byler S., Heerboth S., Lapinska K., Longacre M., Snyder N. & Sarkar S. (2014) Drug Resistance in Cancer: An Overview. *Cancers* 6: 1769-1792.
- Hu S., Li L., Yeh S., Cui Y., Li X., Chang H.C., Jin J. & Chang C. (2015) Infiltrating T cells promote prostate cancer metastasis *via* modulation of FGF!! → miRNA-541 → androgen receptor (AR) → MMP9 signaling. *Mol. Oncol.* 9: 44-57.
- Huang J., Li H. & Ren G. (2015) Epithelial-mesenchymal transition and drug resistance in breast cancer (Review). *Int. J. Oncol.* 47: 840-848.
- Hughes C.S., Postovit L.M. & Lajoie G.A. (2010) Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics* 10: 1886-1890.
- Härmä V., Virtanen J., Mäkelä R., Happonen A., Mpindi J.P., Knuutila M., Kohonen P., Lötjönen J., Kallioniemi O. & Nees M. (2010) A Comprehensive Panel of Three-Dimensional Models for Studies of Prostate Cancer Growth, Invasion and Drug Responses. *PLoS ONE* 5: e10431.

- Härmä V., Schukov H.P., Happonen A., Ahonen I., Virtanen J., Siitala H., Åkerfelt M., Lötjönen J. & Nees M. (2014) Quantification of Dynamic Morphological Drug Response in 3D Organotypic Cell Cultures by Automated Image Analysis. *PLoS ONE* 9: e96426.
- Ilic D., Neuberger M.M., Djulbegovic M. & Dahm P. (2013) Screening for prostate cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* 1:CD004720.
- Janiczek M., Szyllberg L., Kasperska A., Kowalewski A., Parol M., Antosik P., Radecka B. & Marszalek A. (2017) Immunotherapy as a Promising Treatment for Prostate Cancer: A Systematic Review. *J. Immunol. Res.* 4861570.
- Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E. & Forman D. (2011) Global cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* 61: 69-90.
- Kashima H., Momose F., Umehara H., Miyoshi N., Ogo N., Muraoka D., Shiku H., Harada N. & Asai A. (2016) Epirubicin, Identified Using a Novel Luciferase Reporter Assay for Foxp3 Inhibitors, Inhibits Regulatory T Cell Activity. *PLoS One* 11: e0156643.
- Kikuchi K., Li X., Zheng Y. & Takano Y. (2011) Invasion of breast cancer cells into collagen matrix requires TGF- $\alpha$  and Cdc42 signaling. *FEBS Lett.* 585: 286-290.
- Kim J.Y., Kim H.J., Hurt E.M., Chen X., Howard O.M. & Farrar W.L. (2007) Functional and genomic analyses of FOXP3-transduced Jurkat-T cells as regulatory T (Treg)-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362: 44-50.
- Kim S., Lee A., Park S., Cho M.S., Koo H., Moon B.I. & Sung S.H. (2014) Zonal Difference and Prognostic Significance of Foxp3 Regulatory T Cell Infiltration in Breast Cancer. *J. Breast Cancer* 17: 8-17.
- Kiniwa Y., Miyahara Y. & Wang H.Y. (2007) CD8<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells Mediate Immunosuppression in Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* 13: 6947-6958.
- Kobold S., Krackhardt A., Schlösser H. & Wolf D. (2018) Immuno-oncology: A Brief Overview. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 143: 1006-1013.

- Kondělková K., Vokurková D., Krejsek J., Borská L., Fiala Z. & Andrýs C. (2010) Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders. *Acta Medica* 53: 73-77.
- Luqmani Y.A. (2005) Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Med. Princ. Pract.* 1: 35-48.
- Marshall H.T. & Djamgoz M.B.A. (2018) Immune-Oncology: Emerging Targets and Combination Therapies. *Front. Oncol.* 8: 315-344.
- Martinez-Marin D., Jarvis C., Nelius T., de Riese W., Volpert O.V. & Filleir S. (2017) PEDF increases the tumoricidal activity of macrophages towards prostate cancer cells in vitro. *PLoS One* 12: e0174968.
- Miller A.M., Lundberg K., Özenci V., Banham A.H., Hellström M., Egevad L. & Pisa P. (2006) CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> T Cells Are Enriched in the Tumor and Peripheral Blood of Prostate Cancer Patients. *J. Immunol.* 177: 7398-7405.
- Najafi M., Farhood B. & Mortezaee K. (2018) Contribution of regulatory T cells to cancer: A review. *J. Cell. Physiol.* 10.1002/jcp.27553
- Oeste C.L. & Alarcón B. (2016) T lymphocytes: Activation. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Ozdemir B.C., Pentcheva-Hoang T., Carstens J.L., Zheng X., Wu C.C., Simpson T.R., Laklai H., Sugimoto H., Kahlert C., Novitskiy S.V., De Jesus-Acosta A., Sharma P., Heidari P., Mahmood U., Chin L., Weaver V.M., Maitra A., Allison J.P., LeBleu V.S. & Kalluri R. (2014) Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell* 25: 719-734.
- Packer J.R. & Maitland N.J. (2016) The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1863: 1238-1260.
- Paddock S.W. (2000) Principles and practices of laser scanning confocal microscopy. *Mol. Biotechnol.* 16: 127-149.

- Paraic A.K., Genee Y.L., Myers C.A., Neve R.M., Jeremy R.S., Spellman P.T., Lorenz K., Lee E.H., Barcellos-Hoff M.H., Petersen O.W., Gray J.W. & Bissell M.J. (2007) The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assay correlate with their profiles of gene expression. *Mol. Oncol.* 1: 84-96.
- Pattabiraman D.R. & Weinberg R.A. (2014) Tracking the cancer stem cells – what challenges do they pose? *Nat. Rev. Drug Discov.* 13: 497-512.
- Pullar B. & Shah N. (2016) Prostate cancer. *Surgery (Oxford)* 34: 505-511.
- Ramsdell F. & Ziegler S.F. (2014) FOXP3 and scrufty: how it all began. *Nat. Rev. Immunol.* 14: 343-349.
- Rhim A.D., Oberstein P.E., Thomas D.H., Mirek E.T., Palermo C.F., Sastra S.A., Dekleva E.N., Sanders T., Becerra C.P., Tattersall I.W., Westphalen C.B., Kitajewski J., Fernandez-Barrena M.G., Fernandez-Zapico M.E., Iacobuzio Donahue C., Olive K.P. & Stanger B.Z. (2014) Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 25: 735-747.
- Ribas A. (2012) Tumor immunotherapy directed at PD-1. *N. Engl. J. Med.* 366: 2517-2529.
- Sadava, Hills, Heller & Berenbaum (2013) *Life The Science of Biology*, 10<sup>th</sup> edition: 100.
- Saglam-Metiner P., Gulce-Iz S. & Biray-Avci C. (2018) Bioengineering-inspired three-dimensional culture systems: Organoids to create tumor microenvironment. *Gene* 686: 203-212.
- Satelli A. & Li S. (2011) Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell. Mol. Life Sci.* 68: 3033-3046.
- Sawe R.T., Kerper M., Badve S., Li J., Sandoval-Cooper M., Xie J., Shi Z., Patel K., Chumba D., Ofulla A., Prospero J., Taylor K., Stack M.S., Mining S. & Littlepage L.E. (2016) Aggressive breast cancer in western Kenya has early onset, high proliferation, and immune cell infiltration. *BMC Cancer* 16: 204-219.

- Sharma P. & Allison J.P. (2015) Immune Checkpoint Targeting Cancer Therapy: Towards Combination Strategies with Curativa Potential. *Cell* 161: 205-214.
- Sharpe M. & Mount N. (2015) Genetically modified T cells in cancer therapy: opportunities and challenges. *Dis. Model. Mech.* 8: 337-350.
- Solinas C., Gombos A., Latifyan S., Piccart-Gebhart M., Kok M. & Buisseret L. (2017) Targeting immune checkpoints in breast cancer: an update of early results. *ESMO Open* 2: e000255.
- Syed Khaja A.S., Toor S.M., El Salhat H., Faour I., Ul Haq N., Ali B.R. & Elkord E. (2017) Preferential accumulation of regulatory T-cells with highly immunosuppressive characteristics in breast tumor microenvironment. *Oncotarget* 8: 33159- 33171.
- Tang Q. & Bluestone J.A. (2008) The Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat. Immunol.* 9: 239-244.
- Weingelt B., Peterse J.L. & van't Veer L.J. (2005) Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat. Rev. Cancer* 5: 591-602.
- Zheng Y., Josefowicz S.Z., Kas A., Chu T.T., Gavin M.A. & Rudensky A.Y. (2007) Genome-wide analysis of FoxP3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 445: 936-940.
- Åkerfelt M., Bayramoglu N., Robinson S., Toriseva M., Schukov H.P., Härmä V., Virtanen J., Sormunen R., Kaakinen M., Kannala J., Eklund L., Heikkilä J. & Nees M. (2015) Automated tracking of tumor-stroma morphology in microtissues identifies functional targets within the tumor microenvironment for therapeutic intervention. *Oncotarget* 6: 30035-300056.
- Åkerfelt M., Härmä V. & Nees M. (2011) Advanced models for target validation and drug discovery in prostate cancer. *Prostate Cancer/Book 1*, ISBN 978-953-308 80-6.

## 8.2 Webbsidor

16.12.2018 [http://www.who.int/cancer/country-profiles/fin\\_en.pdf?ua=1](http://www.who.int/cancer/country-profiles/fin_en.pdf?ua=1)

16.12.2018 <https://www.who.int/cancer/en/>

16.12.2018 <https://imagej.net/Welcome>

## **BILAGA 1: RECEPT**

### **Matrigel 8 mg/ml 750 µl**

594 µl Matrigel 10,1 mg/ml

156 µl RPMI-medium

### **Kollagen I 3 mg/ml (300 µl)**

240 µl kollagen I 3,8 mg/ml

30 µl 10\*RPMI

30 µl buffert: 12 µl HEPES 1M

9 µl sodim bikarbonat 7,5 %

4,8 µl NaOH 1M

4,2 µl sterilt H<sub>2</sub>O

### **Undre gel (för 30 brunnar) - 50 % Matrigel**

175 µl Matrigel 8 mg/ml

175 µl RPMI-medium

### **Undre gel (för 30 brunnar) - 60 % Matrigel och 40 % kollagen I**

210 µl Matrigel 8 mg/ml

140 µl kollagen I 3 mg/ml

### **Övre gel (för fem brunnar) 25 % - Matrigel**

30 µl Matrigel 8 mg/ml

60 µl medium med celler

30 µl medium

### **Övre gel (för fem brunnar) 25 % - 60 % Matrigel, 40 % kollagen I**

36 µl Matrigel 8 mg/ml

24 µl kollagen I 3 mg/ml

60 µl medium med celler

**Paraformaldehyd 4 %**

120  $\mu$ l PFA

2880  $\mu$ l PBS

**Block och permeabiliserings lösning för immunofluorescensfärgning**

15  $\mu$ l Triton X

600  $\mu$ l hästserum

2385  $\mu$ l PBS

**Calcein AM 1,5  $\mu$ M**

3  $\mu$ l Calcein AM

1997  $\mu$ l RPMI-medium