

DISS. ETH NO. 19749

ENGINEERED 3D MODELS TO STUDY THE CANCER  
MICROENVIRONMENT AS A DETERMINANT OF DRUG  
RESPONSE

A dissertation submitted to  
ETH ZURICH

for the degree of  
Doctor of Sciences

presented by

MARIA HÅKANSON

M.Sc. Biology Engineering, Linköping University, Sweden  
Born on January 30, 1980

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Marcus Textor, examiner

Dr. Mirren Charnley, co-examiner

Prof. Dr. Viola Vogel, co-examiner

Prof. Dr. Matthias Lütolf, external co-examiner

Prof. Dr. Edna Cukierman, external co-examiner

2011

# Abstract

---

One of the major obstacles in cancer treatment is the failure of the initial therapy. One reason for cancer cell survival after the initial treatment is that the cells find sanctuary in their microenvironment. Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) is defined as the signaling from the adhesive microenvironment that reduces the efficiency of therapy. CAM-DR is a transient effect, which is not linked to changes on the transcriptional level. Therefore the effect of CAM-DR is typically immediate and the extent of the effect is completely dependent on the cancer cell – microenvironment interaction. These effects are mediated both by adhesion to the extracellular matrix and to other cells and can be explained by signaling regulating both the apoptotic pathway and the cell cycle. It can be foreseen that the involvement of multiple signaling pathways leads to complex processes. Hence, while the promise of drugs targeting the microenvironment to improve the outcome of therapy is high, we are currently lacking in our understanding of the intricacies that lead to CAM-DR.

The aim of this thesis was to investigate the use of controlled *in vitro* culture models to study the role of extrinsic parameters on cell behaviour. Protein-coated microwell array platforms are advantageous compared to standard culture substrates such as the Petri dish as they allow for 3D culture, with a higher relevance for *in vivo*, but with a similarly high control of extrinsic parameters as can be obtained in 2D culture. Therefore, these platforms offer a unique opportunity for the independent interrogation of the role of different extrinsic parameters on cell behaviour. For this work we used two different platforms.

## ***The PDMS microwell platform: surface functionalization improvement for long-term single cell studies***

A PDMS-based microwell array was previously developed in our lab by M. Dusseiller and M. Ochsner in collaboration with the group of V. Vogel. With this platform we aimed at testing the concept of using microwells to study the role of extrinsic parameters on drug response.

Some cell assays studying, for example, differentiation, protein expression and drug response require long culture times of up to at least one week. To meet this demand we developed a new single-cell platform for long-term cell culture by optimizing the coating procedure of the previously developed PDMS microwell array. The original

protocol for fabrication of this microwell array used microfabrication/replication in PDMS and a surface modification protocol to provide a cell-adhesive protein coating exclusively inside the microwells (wall and floor). The microwell plateau areas were rendered non-adhesive for proteins and cells by a PLL-g-PEG coating. This surface functionalization strategy proved insufficient to constrain mesenchymal stem cells (MSCs) as single cells in the microwells for more than 2 days. Stability of patterned substrates for cell culture is a general issue, dependent on the type of substrate, the non-adhesive coating, as well as the cells that are cultured on the patterns.

In the new coating procedure we took advantage of the stable adsorption of the well-characterized amphiphilic triblock co-polymer PEG-PPO-PEG, Pluronic, onto the surface of native, hydrophobic PDMS. In addition to developing a printing-based protocol for functionalization of the array with proteins in the microwells and non-adhesive coating on the plateau, we used microfluidic patterning to create multiple patterns per array. The novel platform showed suitable for culturing mesenchymal stem cells inside the microwells for up to a week. These results were obtained in a collaborative project together with M. Rottmar in the group of K. Maniura at Empa St. Gallen, aimed at the application of the microwell array technology to study mesenchymal stem cell differentiation.

### ***PEG hydrogel microwell platform: creating arrays of 3D cancer models and enabling analysis by high content information***

In the second part of this thesis, we adapted the use of a microwell array prepared in a PEG hydrogel for cancer cell cluster formation and drug response studies. This work was aimed at creating a more *in vivo* relevant breast cancer model. The PEG-hydrogel microwell array was previously developed in the lab of M. Lütolf at EPF Lausanne to study the differentiation of isolated, single stem cells. The material characteristics of the PEG hydrogel made it very interesting for our approach. Firstly, the PEG polymer network has a high water content and a low and variable rigidity, approaching that of the tumour tissue, an important aspect given the central role of substrate stiffness for cell function. Secondly, the intrinsically inert nature of the hydrogel allowed for reproducible long-term cell culture and the formation of homogenous 3D cell clusters.

This platform was further development to meet the requirements on an *in vivo* relevant 3D culture model. This included the evaluation of the well bottom coating with proteins of importance to different stages of cancer progression; laminin, collagen I and fibronectin as well as the successful establishment of protocols that resulted in cell cluster formation with a relevant cell line, MCF-7. Furthermore, an imaging strategy based on confocal fluorescence microscopy and the use of fluorescent markers for proliferation and apoptosis enabled the analysis of cell behaviour throughout the 3D cluster. Thereby the signals from cells in contact with the matrix and cells in locations with only cell-cell adhesion could be separated. The

high-resolution imaging enabled sub-cellular resolution. Thereby high-content analysis protocols could be used to obtain a more precise determination of response.

### ***Applying microwell platforms for the detailed study of drug response in 3D cancer cell clusters***

A key part of this thesis involved the application of these models for the study of the microenvironment as a determinant of drug response. Taxol was used as a model drug for all experiments, as it is a chemotherapeutic that is commonly used in the treatment of breast cancer. MCF-7 cells are tumorigenic but not metastatic and express high levels of E-cadherin and were therefore used to model early stages of cancer.

Fundamental studies of the role of different extrinsic parameters and their interrelationship were performed on the PDMS platform, with the overall complexity kept to a minimum. Here, we compared drug response in relation to the type of matrix coating, dimensionality and presence/absence of cell-cell contacts by comparing the behaviour of single cells and pairs of cells located in the microwells of dimension 34  $\mu\text{m}$  (diameter) and 10  $\mu\text{m}$  (depth). A striking result was that small cell colonies of one to six cells cultured in the microwells showed a reduced drug response in comparison to cells cultured on flat (2D) substrates. Hence, in this reductionist 3D model with small cell clusters, we were able to mimic the dimensionality effect reported in the literature. These results were explained by differences in cell shape, which may indirectly also affect the extent of cell-cell adhesion. Specifically, we showed that cells forming cell-cell contacts were less susceptible to Taxol treatment than single cells. This parameter is a well-known determinant of drug response. However, we could demonstrate for the first time that this effect is experienced already in cells with only one cell-cell contact.

The *in vitro* models created on the PEG-hydrogel platform, represents a more *in vivo* relevant approach with larger cell clusters of dimension 90  $\mu\text{m}$  (diameter) and 60  $\mu\text{m}$  (depth). It was therefore interesting to explore again the mechanisms leading to CAM-DR and compare it to the results obtained in the PDMS microwell arrays. In an attempt to reveal the signaling pathways leading to CAM-DR in these models, we further measured proliferation in parallel to drug response. Initially, culture models for both the primary and the more progressed cancer environment were prepared by the use of laminin and collagen I coatings, respectively. With these models we found that matrix-induced drug resistance plays an important role also for cells in 3D cell clusters. Furthermore it was revealed that collagen I, present at more progressed stages of cancer progression, showed the strongest effect. Within this controlled model system it was easily confirmed that the matrix effects did not correlate to other extrinsic factors, such as cell morphology and density. Therefore we concluded that

the altered drug response with matrix-adhesion was a direct result of the signalling from the matrix.

Nevertheless, cell density was shown to be another important determinate of drug response. Crosstalk between these two effects was observed in 3D at high cell density where drug response was indifferent on different matrix coatings. To separate cell density from other extrinsic parameters, we cultured the cells at different cell densities on 2D collagen patterns ( $\varnothing = 200 \mu\text{m}$ ). It was found that the cells at high cell density were less responsive to Taxol treatment in comparison to cell cultured at low density. This trend correlated with a reduction in proliferation. Furthermore, knocking down the expression of E-cadherin in the cancer cells inhibited the effect of density on proliferation. In summary, we could conclude that increased E-cadherin signaling at high cell density was a major factor in this model, completely explaining the effect of 3D culture on drug response.

Finally we compared the relationship between drug response and proliferation in the different experiments. Interestingly, while there was a direct relationship between drug response and proliferation with cell density changes, this was not observed for matrix-dependent changes of drug response. This result indicates that both cell-cycle regulation and anti-apoptosis signaling was involved in determining the drug response of the 3D cell clusters in this early cancer cell model. The final conclusions chapter of this thesis holds a comparison of the findings from the two platforms and a discussion on how these results may be generalized.

In summary, we developed and characterized two novel *in vitro* culture platforms. These reductionist platforms allowed the dissection of microenvironmental effects, in particular cell-matrix and cell-cell interaction in the context of drug response to Taxol. In the future, these controlled 3D models may not only be useful for further fundamental research, e.g. to evaluate additional microenvironmental parameters such as substrate mechanical properties. They could as well become important as drug discovery and screening platforms, as the controlled culture conditions ensures more reproducible and unequivocal results. Particularly the combination with multiplexing would make these platforms useful for example in the development of new concepts for combination therapy targeting the microenvironment.

# Zusammenfassung

---

Eines der größten Hindernisse in der Krebstherapie ist das Versagen der Ersttherapie. Einer der Gründe für das Überleben von Krebszellen nach der ersten Behandlung ist, dass die Zellen durch ihre Mikroumgebung geschützt sind. Die Zelladhäsion-vermittelte Medikamenten-Resistenz (CAM-DR) ist durch Signale aus der Mikroumgebung der Zelle bedingt, welche die Effizienz der Therapie reduzieren. CAM-DR ist ein transienter Effekt, der nicht mit Veränderungen auf transkriptioneller Ebene verbunden ist. Daher tritt die Wirkung von CAM-DR in der Regel sofort ein. Das Ausmaß des Effekts ist dabei abhängig von der Interaktion zwischen der Krebszelle und ihrer Mikroumgebung. Er wird sowohl durch Adhäsion an die extrazelluläre Matrix und wie auch die Interaktion mit anderen Zellen vermittelt und kann dadurch Signalwege erklärt werden, die sowohl die Apoptose als auch den Zellzyklus regulieren. Die dabei ablaufenden Prozesse sind durch die Beteiligung mehrerer Signalwege sehr komplex. Während Medikamente sehr vielversprechend sind, welche die Mikroumgebung zugunsten eines besseren Therapieerfolgs beeinflussen, fehlt uns derzeit noch das Verständnis der Grundlagen der Zelladhäsion-vermittelten Medikamenten-Resistenz.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Anwendung von kontrollierte *in vitro* Modellen zu untersuchen. Vor allem für das Testen von den Einfluss extrazelluläre Parameter auf dem Zellverhalten. Dafür bieten sich ein Array mit Protein-beschichteten 3D Mikrostrukturen an, weil sie im Gegensatz zu konventionellen Zellkultursubstraten für die 3D-Kultur geeignet sind. Deren Relevanz für die *in vivo* Umgebung ist höher als die von 2D-Kulturen, gleichzeitig lassen sich aber auch die extrinsischen Parameter ähnlich gut kontrollieren. Daher bieten diese Plattformen die einmalige Gelegenheit, die Rolle verschiedener extrinsischer Parameter auf das Verhalten der Zelle unabhängig voneinander zu untersuchen. Für diese Arbeit benutzten wir zwei verschiedene Plattformen.

### ***Die PDMS Plattform: Verbesserung der Oberflächenfunktionalisierung für Langzeit-Zellstudien***

Mikrostrukturierte PDMS Substrate wurden zuvor in unserem Labor von M. Ochsner und M. Dusseiller in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Viola Vogel entwickelt und für biologische Fragestellungen eingesetzt. In dieser Arbeit sollte gezeigt werden, inwieweit solche Mikrostrukturierten Plattformen geeignet sind, um die Rolle der extrinsischen Parameter auf die Medikamentenwirkung zu untersuchen.

Einige Zellassays, mit denen beispielsweise Zelldifferenzierung, Proteinexpression oder die Wirkung von Medikamenten untersucht werden, erfordern sehr lange Kulturzeiten von bis zu einer Woche. Um dieser Anforderung gerecht zu werden, wurde eine neue Einzel-Zell-Plattform entwickelt, die längere Zellkulturzeiten zulässt. Dies wurde durch Weiterentwicklung der zuvor entwickelten mikrostrukturierten PDMS Kultursubstrate erreicht. Das ursprüngliche Protokoll für die Herstellung dieses Microwell Array verwendet Mikrofabrikation in PDMS und ein Oberflächenmodifizierungs-Protokoll, das die Proteinbeschichtung ausschliesslich auf die Innenseite der Vertiefungen beschränkt. Die erhabenen Bereiche der Microwells wurden mittels Beschichtung mit PLL-g-PEG so modifiziert, dass sie nicht mehr adhäsiv für Proteine und Zellen waren. Diese Strategie der Oberflächen-Funktionalisierung erwies sich jedoch als unzureichend, um mesenchymale Stammzellen (MSCs) als einzelne Zellen in den Vertiefungen für mehr als 2 Tage wachsen zu lassen. Die Stabilität von strukturierten Substraten für die Zellkultur ist immer ein problematischer Aspekt. Sie ist abhängig von dem jeweiligen Substrat, der Antihafbeschichtung sowie dem kultivierten Zelltyp.

In einem neuen Beschichtungsverfahren nutzten wir die stabile Adsorption eines gut charakterisierten Block-Co-polymers, Pluronic, auf der Oberfläche des nativen, hydrophoben PDMS. Für das neue Verfahren wurde eine Stempelmethode zur Funktionalisierung des Arrays mit Proteinen in den Vertiefungen und einer Antihafbeschichtung auf der Oberseite entwickelt. Die Biofunktionalisierung durch Mikrofluidik, erlaubte es, einen einzelnen Array mit multiplen Proteinbeschichtungen zu erzeugen. Mit dieser neuartigen Plattform gelang es, mesenchymale Stammzellen bis zu einer Woche lang zu kultivieren. Diese Ergebnisse wurden in einem gemeinsamen Projekt zusammen mit K. Maniura und M. Rottmar an der Empa St. Gallen erzielt, bei dem die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen untersucht werden sollte.

### ***Die PEG Hydrogel Plattform: Herstellung von Arrays mit 3D Krebsmodellen und „High-Content-Information“ Analyse der Zellkolonien***

In einem nächsten Schritt nutzten wir ein Array mit einem mikrostrukturierten PEG-Hydrogel, wie er ursprünglich im Labor von M. Lütolf an der EPF Lausanne entwickelt wurde. Dieser Array wurde weiterentwickelt zu einer Plattform für

Krebszellenstudien. Das Ziel dabei war, ein Brustkrebs-Modell mit verbesserter *in vivo* Relevanz zu schaffen und so neue Einblicke in die Beziehungen zwischen verschiedenen CAM-DR Signalwegen zu gewinnen. Um diesem Ziel nachzugehen, wurde in dieser Studie Zellwachstum parallel zur Medikamentenantwort bestimmt. Diese Plattform wurde ursprünglich entwickelt, um die Differenzierung von isolierten, einzelnen Stammzellen zu untersuchen. Wir wählten diese Plattform, da die Materialeigenschaften der PEG Hydrogele die Möglichkeit boten, Krebszellen mit hoher *in vivo* Relevanz zu züchten. Das Polymer-Netzwerk von Hydrogelen hat eine geringe Steifigkeit, die der von Tumorgewebe ähnlich ist. Zudem erlaubt das inerte Material, reproduzierbare Langzeit-Zellkultur-Experimente durchzuführen und die Bildung von homogenen 3D Zellkolonien zu erreichen.

Die Entwicklung der Plattform hin zu einem relevanten *in vivo* 3D-Modell beinhaltete die Beschichtung mit Proteinen aus verschiedenen Stadien der Tumorprogression. Dazu gehörten Laminin, Kollagen I und Fibronectin. Mit Hilfe von konfokaler Mikroskopie und für Zellwachstum und Apoptose spezifischen Fluoreszenzmarkern gelang es, das Verhalten der Zellen innerhalb der 3D-Cluster zu beobachten. Dabei konnten die Signale von Zellen, die nur Kontakt mit anderen Zellen hatten, von solchen zu unterscheiden werden, die zusätzlich Kontakt zur Matrix hatten. Hochauflösende Bildgebung ermöglichte die subzelluläre Auflösung und die Verwendung von High-Content-Screening-Protokollen zur genaueren Bestimmung der Zellantwort.

### ***Die Anwendung von mikrostrukturierten Plattformen für detaillierte Studien der Antwort auf Medikamente in den 3D Krebszellen Kolonien***

In dieser Arbeit wurden die beschriebenen Modelle eingesetzt, um den Einfluss der Mikroumgebung auf die Medikamentenantwort von Zellen zu bestimmen. Für alle Experimente verwendeten wir als Modellmedikament Taxol, da es ein bekanntes Chemotherapeutikum ist, das üblicherweise zur Behandlung von Brustkrebs eingesetzt wird. MCF-7 Zellen haben Tumorzelleigenschaften, metastasieren jedoch nicht und exprimieren grosse Mengen E-Cadherin. Sie werden deshalb dazu eingesetzt, frühe Krebsstadien zu untersuchen.

Es wurden grundlegende Untersuchungen der verschiedenen extrinsischen Parameter und deren Wechselwirkungen mit der PDMS-Plattform durchgeführt, wobei die Komplexität auf ein Minimum beschränkt wurde. In diesem Setup konnte nachfolgend der Einfluss von extrazellulärer Matrix-Beschichtung, Dimensionalität und Zell-Zell Kontakte auf die Medikamentenantwort untersucht werden. Ziemlich unterwartet konnten wir feststellen, dass auch bei kleineren Zellkolonien von lediglich ein bis sechs Zellen die Dimensionalität der Zellkultursubstrate eine signifikante Auswirkung hat. Zellen, die innerhalb der 3D-Mikrostrukturen kultiviert wurden, haben weniger stark auf Taxol geantwortet als Zellen auf flachen (2D) Substraten.

Dabei konnte mit dieser 3D Plattform das in der Literatur beobachtete Benehmen von Zellen in 3D Umgebungen nachgestellt werden.

Wir nehmen an, dass unsere Resultate vor allem durch Zellform-Veränderungen erklärt werden können, die vermutlich auch indirekt eine Auswirkung auf die Zell-Zell Adhäsion haben. In einem weiteren Experiment wurde gezeigt, dass Zellen, die Zell-Zell Kontakte gebildet haben, weniger stark als einzelne Zellen auf die Taxol Behandlung reagierten. Dieser Parameter ist zwar bekannt für seine Auswirkungen auf die Medikamentenantwort. Es war jedoch interessant zu sehen und neu, dass dieser Effekt bereits für Zellen gilt, welche lediglich einen einzelnen Zell-Kontakt ausgebildet haben.

Die PEG-Hydrogel Plattform repräsentiert ein *in vitro* Modell mit höherer Relevanz für die *in vivo* Situation. Mit dieser Plattform haben wir das Verhalten von Zellen in größeren Zell-Clustern untersucht. Eine Zielsetzung mit diesen weiteren Experimenten war es, die Mechanismen von CAM-DR näher anzugehen. In ersten Experimenten haben wir Modelle für die ganz frühe sowie die teils fortgeschrittene Phase der Krebsentwicklung genutzt. Diese wurden dadurch verwirklicht, dass wir verschiedene adhäsive ECM Proteine verwendeten, welche zu den respektiven Krebs-Phasen gehören, nämlich Laminin und Kollagen I. Mit diesem Modellsystem fanden wir, dass die Adhäsion zu Matrixproteinen eine wichtige Rolle spielt bezüglich Medikamentenantwort, auch dann wenn Zellen in grösseren Kolonien vorliegen. Im weiteren wurde festgestellt, dass die Interaktion zu Kollagen I (entsprechend der fortgeschritteneren Krebsphase) die grösste Auswirkung auf die Zellen hatte. Mit diesem kontrollierten Modellsystem wurde weiterhin bestätigt, dass dieser Effekt nicht von anderen Parametern wie Zellenmorphologie und Zelldichte erklärt werden kann. Andererseits konnten wir auch zeigen, dass die Dichte, mit der die Zellen wachsen, ein wichtiger Parameter für die Antwort auf die Medikamente war. Wenn Zellen in hoher Dichte kultiviert wurden, wurde ein Crosstalk zwischen diesen beiden Effekte festgestellt. An dieser Stelle war nämlich der Unterschied, den wir vorher bei unterschiedlichen Matrixproteinen beobachtet hatten, nicht mehr vorhanden.

In einem weiteren Schritt haben wir den Einfluss der Zelldichte genauer untersucht, in dem wir Zellen in unterschiedlichen Dichten auf 2D Kollagenmustern ( $\varnothing = 200 \mu\text{m}$ ) wachsen liessen. In diesem Experiment konnten wir zeigen, dass Zellen, die in höherer Dichte wuchsen, weniger stark auf die Behandlung mit Taxol antworteten. In diesem Modell konnten wir daher feststellen, dass die Zelldichte den Einfluss der 3D-Zellkultur auf die Medikamentenantwort komplett erklärt.

Schliesslich haben wir das Verhältnis zwischen Zellwachstumsrate und Medikamentenantwort genauer untersucht. Das Verhältnis zwischen der Auswirkung der Zelldichte auf Zellwachstum und der Medikamentenantwort war proportional. Allerdings war dies nicht der Fall für den Einfluss der Matrixadhäsion. Diese

Resultate deuten darauf hin, dass sowohl Zell-Zyklus-regulierende Proteine als auch Anti-Apoptosis Signalwege für die Medikamentenantwort in diesem 3D Krebsmodell involviert sind. In der Schlussdiskussion dieser Dissertation werden die Resultate der beiden Zellkulturplattformen verglichen und mögliche Generalisierungen dieser Schlussfolgerungen diskutiert.

Die *in vitro* Modelle, die innerhalb dieser Dissertation entwickelt wurden, könnten sich daher als nutzbare Plattformen in der Krebsforschung erweisen, vor allem in Bezug auf die Erforschung der Bedeutung der extrazellulären Umgebung für die Medikamentenantwort. In Zukunft sollten Plattformen, wie die hier präsentierte, nicht nur in der Grundlagenforschung einsetzbar sein, sondern könnten auch Anwendung in der Pharmaindustrie finden, zum Beispiel bezüglich Entwicklung neuer Konzepte für Kombinationstherapien, welche die Mikroumgebung der Zellen als Target haben.