

3D *In-Vitro* Platform To Study Diseases

SHREEMOYEE DE



Centre for Biomedical Engineering

INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

JULY 2023

3D *In-Vitro* Platform To Study Diseases

by

SHREEMOYEE DE

(Centre for Biomedical Engineering)

Submitted

In fulfilment of the requirements for the degree of

Doctor of Philosophy

to the



INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

JULY 2023

***Dedicated to
M'mma, Babai, my friends and myself***

CERTIFICATE

This is to certify that the thesis entitled '**3D *in-vitro* platform to study diseases**' being submitted by **Ms. Shreemoyee De** to the Indian Institute of Technology Delhi for the award of degree of **Doctor of Philosophy** is a record of bonafide research work carried out by her. **Ms. Shreemoyee De** has worked under my guidance and supervision and has fulfilled the requirements for the submission of this thesis, which to our knowledge has reached the requisite standard.

The results contained in this thesis are original and have not been submitted, in part or full, to any other University or Institute for the award of any other degree or diploma.

Dr. Neetu Singh
Centre for Biomedical Engineering
Indian Institute of Technology Delhi,
Hauz Khas, New Delhi-110016
India.

ACKNOWLEDGEMENTS

Formal penmanship has never been one of my strong pursuits, as will be agreed by many including my PhD guide. Nevertheless, I will sincerely attempt to express gratitude to all the people who have helped me reach the finish line of this marathon.

The Optimus Prime of my story, my PhD guide Dr. Neetu Singh, I am overtly grateful to her for giving me the opportunity to pursue my PhD under her supervision. I still remember the initial discussions that we had when she said that, 'Though we have proposed the idea we have no clue how to achieve it. But don't worry, that is what will make your journey unique and I will be there to guide me wherever needed'. I thank her for grooming my scientific aptitude, for teaching me to present my work and also manage to train and teach students along with PhD. I thank her for her confidence in me and letting me design my own PhD story.

While the idea for this thesis was nucleated by my supervisor, my doctoral committee members, Prof. Harpal Singh, Dr. Jayanta Bhattacharyya and Prof. Ritu Kulshreshtha, have been very vital in chaperoning and powering the project. They have shown great interest in the prospects of the project right from its inception and continue to provide their constructive insights. Thank You for your valuable time, participation and motivation. I look forward to your guidance beyond this thesis.

It goes without saying that infrastructure and funding are key to research., Department of Biotechnology (DBT) and Ministry of Human Resource and Development (MHRD) are highly acknowledged for ensuring the sufficiency of funds. I am very thankful central research facilities, IIT Delhi, for maintenance of central research facilities. I would also like to thank my supervisor for the well-equipped lab space and provision for accessing best resources.

I take this opportunity to thank Dr. Tiwari, a family friend, who suggested to apply in IIT Delhi, for PhD, when I had faced rejections from many other institutes. I am grateful that he believed that I have the skill and scientific temper to pursue PhD.

During our PhD tenure, we spend significant amount of time in our lab. I am grateful to my seniors and my colleagues for making my stay pleasant. I thank my seniors Dr. Smita, Dr. TJ, Dr. Sahil, Dr. Ritu and Dr. Shweta for helping to learn and understand various techniques. I specifically thank Dr. Smita and Dr. TJ for all the scientific discussions about all the possible directions for my project. Akshay, thank you for helping me with my microfluidics concepts

and studies. Rupal and Supriya, thank you for keeping positive environment in the lab. Manleen, thank you for being so understanding. You always reminded me to not get lost in the failures of the experiments. You always instilled confidence in me, to believe it will work out in the end. I thank you for always having an ear for all the scientific and non-scientific rants we have had over the years. I thank you for always being there and making me smile even in the toughest of failures.

Friends and colleagues from the institute deserve a special token of gratification in completion of my PhD journey. This journey was made much easier due to their constant help and support. Anees, thank you for always being there to help with confocal and coffee breaks (although you would have preferred Chai). Ahana and Anjali thank you for helping in both in the professional or personal level. I was grateful to have a batch of friends during my PhD journey. This batch including the above and Dharmesh, Aayushi, Sagar and Abhishek made sure that we celebrated moments with each other so that we never feel alone in the process. It is good to always be reminded that you have company and they are on the similar path that you are and all of us would make it to the finish line

Dr. Raina and Dr. Preeti, thank you for all your love and support during my training tenure in National Institute of Immunology. The skill, techniques, failures and patience I learned during that phase, have greatly helped in my PhD. It made me more confident, independent and motivated to pursue difficult problems in my doctoral studies.

Friends have always played an important role in my life. Dr. Soumik, Dr. Pallavi and Dr. Namrata, thank you being there always. In any hardship, I faced during my PhD, you were just a phone call away. You, having gone through the process yourself, were able to understand and calm me down during the troughs of my journey. Arnab, I thank you for being patient with all the upheavals of this process.

My family has always been very supportive of my career choices. I am thankful to them for having faith in me and giving me the independence and encouragement to pursue research. M'mma, thank you for your conviction and belief in me, that I will be achieve my goals. Babai, thank you for teaching me to be adaptable, to be tolerant and always trust the process. Thank you for making me laugh in darkest of the moments. I thank my parents, to being the unsaid company in my journey, you never let me feel alone.

With this, this journey come to an END!

Shreemoyee De

ABSTRACT

The first step of understanding the efficacy of any new drug designed are *in-vitro* models. They are also elementary in comprehending or deciphering any new pathway or their components. The most habitually explored methods to understand these processes are flat-surface techniques also known as two-dimensional culture techniques (2D techniques). However, recent reports have suggested more than half of the drugs fail clinical trials, making drug discovery a costly process with low success rates. Reasons for failure being the cells in the monolayer culture are not able to mimic *in-vivo* cellular organization. They are very uniformly spread unlike the *in-vivo* conditions. The receptors on the cell surfaces are exposed only on one side of the cells. These reasons lead to high attrition rates in drug discovery, thus, there is an urgent need to develop new and precise techniques to improve the success rates in drug testing. One of the ways to achieve that is designing of better pre-clinical models, that can better recapitulate the *in-vivo* biology and microenvironmental factors. Animal cell culture techniques have been around since the 20th century. To overcome these limitations of 2D cell-culture techniques, there was the introduction of three-dimensional (3D) culture platforms in the early 21st century. The spheroid like structure mimics the heterogenous and the hypoxic environment of *in-vivo* culture better as compare to monolayer culture. They give us the flexibility to understand cell-cell and cell-matrix interactions better. They also allow compartmentalization of different cells, that permit spatially separated cells in close proximity. Hence, these platforms can be better prescribed as high throughput drug screening platforms as compared to 2D platforms. Conventional bulk hydrogels were observed not to replicate the property of the natural tissue, moreover, single cell-cell interaction was difficult to study in macroscale platform. As an alternative to bulk coculture methods, miniaturization techniques were used to used generate microscale hydrogels having their own microenvironment. Various techniques have been exploited for generation of cell-laden microgels including droplet microfluidics, bioprinting, micromoulding, stop-flow lithography to name a few.

Cancer, still being one of the diseases with high mortality rates have been extensively studied using 3D platforms in the hope of having better pre-clinical models. The key factors for 3D model to be suitable for studying tumor properties are (i) formation of nutrient, oxygen and metabolic waste diffusive gradients (ii) heterogenous layer of cells (iii) control over the hydrogel degradability. The existing platforms lack (i) reproducibility, as most of the microenvironments are cell or tissue derived, (ii) easy read-out and (iii) assay validation, due

to lack of relevant data to be compared with. The goal of this thesis work was to be able to develop a platform that could address some of the limitations present in the field.

Chapter 1, introduces the 3D cell culture, it gives a comparison between 2D and 3D platforms, summarizing the significance of 3D platform. It reviews the existing 3D models in brief and the different materials and techniques used to generate the platform.

Chapter 2 focuses on designing the platform, which can be used as 3D *in-vitro* cell culture. 3D platforms established till date lack control over precise spatial distribution of cells in the 3D scaffold. Alginate-based simple micron sized platform using droplet microfluidics technique that closely mimics the tumor architecture is developed. The real time monitoring strategy using pH-sensitive carbon dot nano-sensors removes the need of additional end-point assays for monitoring cellular growth. This platform gives the flexibility to modulate its properties according to the requirement of the model to be designed. It provides spatial control, generates hypoxia in a short span as well as better the cellular characteristics to yield reliable results in drug screening.

To establish the 3D model developed in Chapter 2 for studying cancer, cells with modulated oncogene expression was studied. One of the major causes for cancer is mutation in oncogenes and tumor-suppressor genes. In **chapter 3**, genetic modification and its effects in the encapsulated cells were studied using the platform developed. The target chosen to demonstrate the application of the developed platform is a deubiquitinating enzyme, Ubiquitin Specific Peptidase 37 (USP37). This is found to be elevated in different cancers and has been reported to play a role in regulation of various processes like cell cycle regulation, oncogenesis and metastasis. Transiently modified cell lines are difficult to study in the existing 3D platforms as they generally take 2-3 weeks to prepare. The platform was utilized to study the difference in the transiently altered cells with growth curve as readout. The difference could be observed by culturing the cells in the 3D platform and simply reading the fluorescence of the carbon nanodot sensors at various time points.

The platform developed in Chapter 2 was further modified to understand another basic cellular process, migration. Migration of cells has a role to play in various conditions, be it an immune response, or response to a stimulus for progression of a disease. **Chapter 4**, explores migration of cancer cells using a collagen-alginate model. Collagen was introduced in the microbead composition to make the system more relatable to the extracellular matrix of cells. To validate that the migration of cells was being observed upregulated MMP9 cells were

encapsulated in the microscaffolds. Increase in the number of ‘cluster of cells’ observed after 48 hours inside the microscaffold as compared to the control cells was the readout indicating the invasiveness of the encapsulated cells.

Developing a platform that can preserve the functional behavior of the cells is of high clinical relevance in the field of tissue engineering. Historically, hepatocytes have been one of the primary cells whose functionality is very difficult to maintain in 2D over longer period of time. Culturing them in 2D is cumbersome as they eventually de-differentiate and lose their morphology and function. An attempt was made to preserve the functionality of primary rat hepatocytes in **Chapter 5**. Using the same droplet microfluidic technique for the generation of microscaffolds but introducing decellularized matrices alongwith collagen and alginate to see which composition supports the survival of hepatocytes. Further, to check if this model can be used for toxicity assays, the microscaffolds were administered with drugs which are known as potent inducers of drug induced liver cytotoxicity. These studies conclude that this model can be a probable liver model for drug toxicity studies. **Chapter 6**, discusses the conclusion and future outlook of the thesis.

सारांश

डिजाइन की गई किसी भी नई दवा की प्रभावकारिता को समझने का पहला चरण इन-विट्रो मॉडल हैं। वे किसी भी नए मार्ग या उनके घटकों को समझने या समझाने में प्राथमिक हैं। इन प्रक्रियाओं को समझने के लिए सबसे आदतन खोजी गई विधियाँ सपाट-सतह तकनीकें हैं जिन्हें द्वि-आयामी कल्चर तकनीक (2डी तकनीक) के रूप में भी जाना जाता है। हालांकि, हाल की रिपोर्टों ने सुझाव दिया है कि आधी से अधिक दवाएं नैदानिक परीक्षणों में विफल होती हैं, जिससे दवा की खोज कम सफलता दर के साथ एक महंगी प्रक्रिया बन जाती है। विफलता के कारण मोनोलेयर कल्चर में कोशिकाएं इन-विवो सेलुलर संगठन की नकल करने में सक्षम नहीं हैं। वे इन-विवो स्थितियों के विपरीत बहुत समान रूप से फैले हुए हैं। कोशिका की सतहों पर रिसेप्टर्स कोशिकाओं के केवल एक तरफ उजागर होते हैं। इन कारणों से दवा की खोज में उच्च दुर्घटना दर होती है, इस प्रकार, दवा परीक्षण में सफलता दर में सुधार के लिए नई और सटीक तकनीक विकसित करने की तत्काल आवश्यकता है। इसे प्राप्त करने के तरीकों में से एक बेहतर प्री-क्लिनिकल मॉडल की डिजाइनिंग है, जो इन-विवो जीव विज्ञान और माइक्रोएन्वायरमेंटल कारकों को बेहतर ढंग से दोहरा सकते हैं। जंतु सेल कल्चर तकनीकें 20वीं सदी के आसपास रही हैं। 2डी सेल-कल्चर तकनीकों की इन सीमाओं को दूर करने के लिए, 21वीं सदी की शुरुआत में त्रि-आयामी (3डी) कल्चर प्लेटफार्मों की शुरुआत हुई थी। गोलाकार जैसी संरचना मोनोलेयर कल्चर की तुलना में इन-विवो कल्चर के विषम और हाइपोक्सिक वातावरण की बेहतर नकल करती है। वे हमें सेल-सेल और सेल-मैट्रिक्स इंटरैक्शन को बेहतर ढंग से समझने की सुविधा देते हैं। वे विभिन्न कोशिकाओं के कंपार्टमेंटलाइज़ेशन की भी अनुमति देते हैं, जो स्थानिक रूप से अलग-अलग कोशिकाओं को निकटता में अनुमति देते हैं। इसलिए, इन प्लेटफार्मों को 2डी प्लेटफॉर्म की तुलना में हाई-थ्रूपुट ड्रग स्क्रीनिंग प्लेटफॉर्म के रूप में बेहतर निर्धारित किया जा सकता है। पारंपरिक बल्क हाइड्रोजेल को प्राकृतिक ऊतक की संपत्ति को दोहराने के लिए नहीं देखा गया, इसके अलावा, मैक्रोस्केल प्लेटफॉर्म में एकल सेल-सेल इंटरैक्शन का अध्ययन करना मुश्किल था। बल्क कोकल्चर विधियों के विकल्प के रूप में, लघुकरण तकनीकों का उपयोग अपने स्वयं के माइक्रोएन्वायरमेंट वाले सूक्ष्म हाइड्रोजेल उत्पन्न करने के लिए किया गया था। ड्रॉपलेट माइक्रोफ्लुइडिक्स, बायोप्रिंटिंग, माइक्रोमोल्लिंग, स्टॉप-प्लो लिथोग्राफी सहित सेल-लेडेन माइक्रोजेल्स के निर्माण के लिए विभिन्न तकनीकों का उपयोग किया गया है।

कैंसर, अभी भी उच्च मृत्यु दर वाली बीमारियों में से एक है, जिसका बेहतर प्री-क्लिनिकल मॉडल होने की उम्मीद में 3डी प्लेटफॉर्म का उपयोग करके बड़े पैमाने पर अध्ययन किया गया है। ट्यूमर के गुणों का अध्ययन करने के लिए 3डी मॉडल के उपयुक्त होने के लिए प्रमुख कारक हैं (i) पोषक तत्व, ऑक्सीजन और चयापचय अपशिष्ट विसारक ग्रेडिएंट्स का निर्माण (ii) कोशिकाओं की विषम परत (iii) हाइड्रोजेल डिग्रेडेबिलिटी पर नियंत्रण। मौजूदा प्लेटफार्मों में (i) पुनरुत्पादन की कमी है, क्योंकि अधिकांश सूक्ष्म वातावरण कोशिका या ऊतक व्युत्पन्न हैं, (ii) आसान रीड-आउट और (iii) परख सत्यापन, प्रासंगिक डेटा की कमी के कारण तुलना की जा सकती है। इस थीसिस कार्य का लक्ष्य एक ऐसा मंच विकसित करने में सक्षम होना था जो क्षेत्र में मौजूद कुछ सीमाओं को संबोधित कर सके।

अध्याय 1, 3डी सेल कल्चर का परिचय देता है, यह 3डी प्लेटफॉर्म के महत्व को सारांशित करते हुए 2डी और 3डी प्लेटफॉर्म के बीच तुलना देता है। यह मौजूदा 3डी मॉडलों की संक्षेप में समीक्षा करता है और मंच तैयार करने के लिए इस्तेमाल की जाने वाली विभिन्न सामग्रियों और तकनीकों की समीक्षा करता है।

अध्याय 2 प्लेटफॉर्म को डिजाइन करने पर केंद्रित है, जिसे 3डी इन-विट्रो सेल कल्चर के रूप में इस्तेमाल किया जा सकता है। आज तक स्थापित 3डी प्लेटफॉर्म में 3डी स्कैफ़ोल्ड में कोशिकाओं के सटीक स्थानिक वितरण पर नियंत्रण की कमी है। ड्रॉपलेट माइक्रोफ्लुइडिक्स तकनीक का उपयोग करके एल्बिनेट-आधारित सरल माइक्रोन

आकार का प्लेटफॉर्म विकसित किया गया है जो ट्यूमर आर्किटेक्चर की बारीकी से नकल करता है। पीएच-सेन्सिटिव कार्बन डॉट नैनो-सेंसर का उपयोग करके वास्तविक समय की निगरानी रणनीति सेलुलर विकास की निगरानी के लिए अतिरिक्त अंत-बिंदु परख की आवश्यकता को दूर करती है। यह प्लेटफॉर्म डिज़ाइन किए जाने वाले मॉडल की आवश्यकता के अनुसार अपने गुणों को संशोधित करने की सुविधा देता है। यह स्थानिक नियंत्रण प्रदान करता है, थोड़े समय में हाइपोक्सिया उत्पन्न करता है और साथ ही ड्रग स्क्रीनिंग में विश्वसनीय परिणाम प्राप्त करने के लिए सेलुलर विशेषताओं को बेहतर बनाता है।

कैंसर का अध्ययन करने के लिए अध्याय 2 में विकसित 3डी मॉडल को स्थापित करने के लिए संशोधित ऑन्कोजीन अभिव्यक्ति वाली कोशिकाओं का अध्ययन किया गया। कैंसर के प्रमुख कारणों में से एक ऑन्कोजीन और ट्यूमर-दबाने वाले जीन में उत्परिवर्तन है। अध्याय 3 में, विकसित मंच का उपयोग करके एन्कैप्सुलेटेड कोशिकाओं में आनुवंशिक संशोधन और इसके प्रभावों का अध्ययन किया गया था। विकसित प्लेटफॉर्म के अनुप्रयोग को प्रदर्शित करने के लिए चुना गया लक्ष्य एक डिबिक्रिटिनेटिंग एंजाइम, यूबिकिटिन स्पेसिफिक पेप्टिडेज 37 (यूएसपी37) है। यह विभिन्न कैंसर में उंचा पाया गया है और सेल चक्र विनियमन, ऑन्कोजेनेसिस और मेटास्टेसिस जैसी विभिन्न प्रक्रियाओं के नियमन में भूमिका निभाने की सूचना दी गई है। मौजूदा 3डी प्लेटफॉर्म में क्षणिक रूप से संशोधित सेल लाइनों का अध्ययन करना मुश्किल है क्योंकि उन्हें तैयार करने में आम तौर पर 2-3 सप्ताह लगते हैं। अंतर का अध्ययन करने के लिए प्लेटफॉर्म का उपयोग किया गया था, जो रीडआउट के रूप में विकास वक्र के साथ क्षणिक रूप से परिवर्तित कोशिकाएं हैं। 3डी प्लेटफॉर्म में कोशिकाओं को कल्चर करके और विभिन्न समय बिंदुओं पर कार्बन नैनोडॉट सेंसर की प्रतिदीप्ति को पढ़कर अंतर देखा जा सकता है।

अध्याय 2 में विकसित मंच को एक और बुनियादी सेलुलर प्रक्रिया, माइग्रेसन को समझने के लिए संशोधित किया गया था। कोशिकाओं के प्रवास की विभिन्न स्थितियों में भूमिका होती है, चाहे वह प्रतिरक्षा प्रतिक्रिया हो, या किसी बीमारी की प्रगति के लिए उत्तेजना की प्रतिक्रिया हो। **अध्याय 4**, कोलेजन-एल्लिनेट मॉडल का उपयोग करके कैंसर कोशिकाओं के प्रवास की पड़ताल करता है। कोशिकाओं के बाह्य मैट्रिक्स से प्रणाली को अधिक संबंधित बनाने के लिए कोलेजन को माइक्रोबीड संरचना में पेश किया गया था। यह स्थापित करने के लिए कि कोशिकाओं के प्रवासन को अपग्रेड किया जा रहा है MMP9 कोशिकाओं को माइक्रोस्कैफोल्ड्स में एंक्पसूलेट किया गया था। नियंत्रण कोशिकाओं की तुलना में माइक्रोस्कैफोल्ड के अंदर 48 घंटों के बाद देखे गए 'कोशिकाओं के समूह' की संख्या में वृद्धि का संकेत देना रीडआउट था।

एक ऐसा मंच विकसित करना जो कोशिकाओं के कार्यात्मक व्यवहार को संरक्षित कर सके, उतक इंजीनियरिंग के क्षेत्र में उच्च नैदानिक प्रासंगिकता है। ऐतिहासिक रूप से, हेपेटोसाइट्स प्राथमिक कोशिकाओं में से एक रहे हैं जिनकी कार्यक्षमता 2डी में लंबे समय तक बनाए रखना बहुत मुश्किल है। उन्हें 2डी में कल्चर करना बोज़िल है क्योंकि वे अंततः डिडिफफ़ेरेन्शिएट हो जाते हैं और अपनी आकृति विज्ञान और कार्य खो देते हैं। **अध्याय 5** में प्राथमिक चूहे हेपेटोसाइट्स की कार्यक्षमता को संरक्षित करने का प्रयास किया गया है। माइक्रोस्कैफोल्ड्स की पीढ़ी के लिए वही ड्रॉपलेट माइक्रोफ्लुइडिक तकनीक का उपयोग करके, कोलेजन और एल्लिनेट के साथ डीसेलुलर मैट्रिसेस को पेश करना यह देखने के लिए कि कौन सी रचना हेपेटोसाइट्स के अस्तित्व का समर्थन करती है। इसके अलावा, यह जांचने के लिए कि क्या इस मॉडल का उपयोग विषाक्तता परख के लिए किया जा सकता है, माइक्रोस्कैफोल्ड्स को दवाओं के साथ प्रशासित किया गया था जो दवा प्रेरित यकृत साइटोटोक्सिसिटी के शक्तिशाली प्रेरक के रूप में जाने जाते हैं। इन अध्ययनों से यह निष्कर्ष निकलता है कि यह मॉडल ड्रग टॉक्सिसिटी अध्ययन के लिए एक संभावित लिवर मॉडल हो सकता है। **अध्याय 6**, थीसिस के निष्कर्ष और भविष्य के दृष्टिकोण पर चर्चा करता है।

সারসংক্ষেপ

নতুন যে কোনও ওষুধের কার্যকারিতা বোঝার প্রথম ধাপ হল ইন-ভিট্রো মডেল। এই প্রক্রিয়াগুলি প্রাথমিকভাবে যে কোনও নতুন পথ বা তাদের উপাদানগুলি বোঝার বা পাঠোদ্ধার করার ক্ষেত্রেও প্রযোজ্য। এই প্রক্রিয়াগুলি বোঝার জন্য সবচেয়ে অভ্যাসগতভাবে অনুসন্ধান করা পদ্ধতিগুলি হইল সমতল-পৃষ্ঠের প্রযুক্তি যথা দ্বি-মাত্রিক অনুশীলন প্রযুক্তি (2 ডি প্রযুক্তি) নামেও পরিচিত। তবে, সাম্প্রতিক প্রতিবেদনে বলা হয়েছে যে অর্ধেকেরও বেশি ওষুধ ক্লিনিকাল ট্রায়ালে ব্যর্থ হয়, যার ফলে ওষুধ আবিষ্কার একটি ব্যয়বহুল প্রক্রিয়া হয়ে ওঠে, যার সাফল্যের হার কমা মনোলেয়ার প্রযুক্তির কোষগুলির ব্যর্থতার কারণগুলি ইন-ভিভো সেলুলার অর্গানাইজেশনের অনুকরণ করতে সক্ষম নয়। এগুলি ইন-ভিভো কন্ডিশনের বিপরীতে খুব অভিন্নভাবে ছড়িয়ে রয়েছে। কোষ পৃষ্ঠের রিসেপ্টরগুলি কেবল কোষগুলির একপাশে উন্মুক্ত হয়। এই কারণগুলি ওষুধ আবিষ্কারে উচ্চ ত্যাগের হারের দিকে পরিচালিত করে, সুতরাং, ওষুধ পরীক্ষার সাফল্যের হার উন্নত করার জন্য নতুন এবং সুনির্দিষ্ট প্রযুক্তিগুলি বিকাশ করা আবশ্যিক। এটি অর্জনের একটি উপায় হল উন্নত প্রাক-ক্লিনিক্যাল মডেলগুলির নকশা তৈরি করা, যা ইন-ভিভো জীববিজ্ঞান এবং মাইক্রোএনভায়রনমেন্টাল ফ্যাক্টরগুলিকে আরও ভালভাবে পুনর্বিবেচনা করতে পারে। প্রাণী কোষের কালচার প্রযুক্তি বিংশ শতাব্দী থেকে চলে আসছে। দ্বি-মাত্রিক কোষ-অনুশীলন প্রযুক্তির এই সীমাবদ্ধতাগুলি কাটিয়ে ওঠার জন্য, একবিংশ শতাব্দীর প্রথম দিকে ত্রিমাত্রিক (3D) অনুশীলন প্ল্যাটফর্মের প্রবর্তন হয়েছিল। স্ফেরয়েডের মতো কাঠামোটি মনোলেয়ার অনুশীলনের তুলনায় ইন-ভিভো অনুশীলনের হেটেরোজেনাস এবং হাইপোক্সিক পরিবেশকে আরও ভালভাবে অনুকরণ করে। এগুলি আমাদের সেল-সেল এবং সেল-ম্যাট্রিক্স পারস্পরিক ক্রিয়া প্রতিক্রিয়াগুলিকে আরও ভালভাবে বুঝতে সাহায্য করে। এগুলি বিভিন্ন কোষের কম্পার্টমেন্টলাইজেশনকেও অনুমতি দেয়, যা স্থানীয়ভাবে বিচ্ছিন্ন কোষগুলিকে কাছাকাছি থাকার অনুমতি দেয়। তাই, এই প্ল্যাটফর্মগুলি 2ডি প্ল্যাটফর্মের তুলনায় উচ্চ মাত্রার ড্রাগ স্ক্রিনিং প্ল্যাটফর্ম হিসাবে আরও ভালভাবে নির্ধারিত হতে পারে। প্রথাগত বাল্ক হাইড্রোজেলগুলি প্রাকৃতিক কলার বৈশিষ্ট্যের পুনরাবৃত্তি না করার জন্য পর্যবেক্ষণ করা হয়েছিল, অধিকন্তু, একক কোষ-কোষ ক্রিয়া প্রতিক্রিয়া ম্যাক্রোস্কেল প্ল্যাটফর্মে অধ্যয়ন করা কঠিন ছিল। বাল্ক কোকালচার পদ্ধতির বিকল্প হিসাবে, ক্ষুদ্রায়ন প্রযুক্তিগুলি মাইক্রোস্কেল হাইড্রোজেল তৈরি করতে ব্যবহার করা হয়েছিল যার নিজস্ব মাইক্রোপরিবেশ রয়েছে। ফোঁটা মাইক্রোফ্লুইডিক্স, বায়োপ্রিন্টিং, মাইক্রোমোল্ডিং, স্টপ-ফ্লো লিথোগ্রাফি ইত্যাদি কয়েকটি পদ্ধতি যথা কোষবাহী মাইক্রোজেল তৈরির জন্য ব্যবহার করা হয়েছে।

ক্যান্সার এখনও উচ্চ মৃত্যুর হারের একটি রোগ হিসাবে উন্নত প্রাক-ক্লিনিক্যাল মডেল থাকার আশায় থ্রিডি প্ল্যাটফর্ম ব্যবহার করে ব্যাপকভাবে অধ্যয়ন করা হয়েছে। থ্রিডি মডেল টিউমারের বৈশিষ্ট্য অধ্যয়ন করার জন্য উপযুক্ত হওয়ার মূল কারণগুলি হল: (i) পুষ্টি, অক্সিজেন এবং বিপাকীয় বর্জ্য বিচ্ছুরিত গ্রেডিয়েন্টস গঠন করা। (ii) কোষের বিষম স্তর। (iii) হাইড্রোজেল অবক্ষয় নিয়ন্ত্রণ করা। বর্তমান প্ল্যাটফর্মগুলিতে কিছু সীমাবদ্ধতা বিদ্যমান যেমন (i) পুনরুৎপাদনশীলতার অভাব রয়েছে, কারণ বেশিরভাগ মাইক্রোএনভায়রনমেন্টগুলি সেল বা টিস্যু থেকে উদ্ভূত, (ii) সহজ বিশ্লেষণ এবং (iii) মূল্যায়ন বৈধতা কারণ এর সাথে তুলনায়োগ্য প্রাসঙ্গিক তথ্যের অভাব। এই থিসিসের কাজের লক্ষ্য ছিল এমন একটি প্ল্যাটফর্ম তৈরি করতে সক্ষম হওয়া যা বর্তমান ক্ষেত্রের উপস্থিত কিছু সীমাবদ্ধতার সমাধান করতে পারে।

প্রথম অধ্যায় : এই অধ্যায়ে থ্রিডি সেল প্রযুক্তির পরিচয় দেওয়া হয়েছে , এটি 2D এবং 3D প্ল্যাটফর্মগুলির মধ্যে একটি তুলনা দেয়, থ্রিডি প্ল্যাটফর্মের তাৎপর্য সংক্ষেপে বিবৃত করে। এটি বিদ্যমান থ্রিডি মডেলগুলি সংক্ষিপ্তভাবে পর্যালোচনা করে এবং প্ল্যাটফর্মটি তৈরি করতে ব্যবহৃত বিভিন্ন উপকরণ এবং কৌশলগুলি পর্যালোচনা করে।

দ্বিতীয় অধ্যায় : এই অধ্যায় প্ল্যাটফর্ম ডিজাইনের উপর জোর দেয়, যা থ্রিডি ইন-ভিট্রো সেল কালচার হিসাবে ব্যবহার করা যেতে পারে। বর্তমান থ্রিডি প্ল্যাটফর্মগুলি এখনও পর্যন্ত থ্রিডি স্ক্যাফোল্ডে কোষগুলির সুনির্দিষ্ট স্থানিক বিতরণের উপর নিয়ন্ত্রণের অভাব রয়েছে। অ্যালজিনেট-ভিত্তিক সহজ মাইক্রোন আকারের প্ল্যাটফর্মটি ড্রপলেট মাইক্রোফ্লুইডিক্স প্রযুক্তি ব্যবহার করে যা টিউমার আর্কিটেকচারকে ঘনিষ্ঠভাবে অনুকরণ করে। pH-সংবেদনশীল কার্বন ডট ন্যানো-সেন্সর ব্যবহার করে রিয়েল টাইম মনিটরিং স্ট্র্যাটেজি সেলুলার বৃদ্ধি পর্যবেক্ষণের জন্য অতিরিক্ত এন্ড-পয়েন্ট

অ্যাসেসের প্রয়োজনীয়তা দূর করে। এই প্রযুক্তি পরিকল্পিত মডেলের প্রয়োজনীয়তা অনুযায়ী তার বৈশিষ্ট্যগুলি মডিউলেট করার নমনীয়তা দেয়া এটি স্থানীয় নিয়ন্ত্রণ প্রদান করে, স্বল্প সময়ের মধ্যে হাইপোক্সিয়া উত্পন্ন করে এবং ওষুধের স্ক্রিনিংয়ে নির্ভরযোগ্য ফলাফল অর্জনের জন্য সেলুলার বৈশিষ্ট্যগুলি আরও গ্রহণযোগ্য করে।

তৃতীয় অধ্যায় : ক্যাম্পার গবেষণার জন্য দ্বিতীয় অধ্যায়ে উদ্ভাবিত থ্রিডি মডেলটি প্রতিষ্ঠা করার জন্য, মডিউলেটেড অনকোজিন এক্সপ্রেসনযুক্ত কোষগুলি অধ্যয়ন করা হয়েছিল। ক্যাম্পারের অন্যতম প্রধান কারণ হলো অনকোজিন ও টিউমার-সাপ্রেসর জিনে মিউটেশন। তৃতীয় অধ্যায়ে, জিনগত পরিবর্তন এবং এনক্যাপসুলেটেড কোষগুলিতে এর প্রভাবগুলি উন্নত প্ল্যাটফর্ম ব্যবহার করে অধ্যয়ন করা হয়েছে। উন্নত প্ল্যাটফর্মের প্রয়োগ প্রদর্শনের জন্য যে লক্ষ্যটি বেছে নেওয়া হয়েছে তা হল একটি ডিউবিবিকুইটিনেটিং এনজাইম, ইউবিবিকুইটিন স্পেসিফিক পেপ্টিডেজ 37 (ইউএসপি 37)। এটি বিভিন্ন ক্যাম্পারে উন্নত বলে জানা যায় এবং কোষ চক্র নিয়ন্ত্রণ, অনকোজেনেসিস এবং মেটাস্ট্যাসিসের মতো বিভিন্ন প্রক্রিয়া নিয়ন্ত্রণের ক্ষেত্রে ভূমিকা পালন করে বলে জানা গেছে। অস্থায়ীভাবে পরিবর্তিত সেল লাইনগুলি বিদ্যমান থ্রিডি প্ল্যাটফর্মগুলিতে অধ্যয়ন করা কঠিন কারণ তারা সাধারণত প্রস্তুতি নিতে 2-3 সপ্তাহ সময় নেয়। প্ল্যাটফর্মটি ক্ষণস্থায়ী পরিবর্তিত কোষগুলির বৃদ্ধির বক্ররেখার পার্থক্যটি অধ্যয়ন করার জন্য ব্যবহার করা হয়েছিল। থ্রিডি প্ল্যাটফর্মে কোষগুলিকে কালচার করে এবং বিভিন্ন সময়ে কার্বন ন্যানোডট সেন্সরগুলির ফ্লুরোসেন্স পড়ে পার্থক্যটি পর্যবেক্ষণ করা যেতে পারে।

চতুর্থ অধ্যায় : দ্বিতীয় অধ্যায়ে বিকশিত প্রক্রিয়াটি মাইগ্রেশন (আরেকটি মৌলিক কোষীয় প্রক্রিয়া) বোঝার জন্য আরও সংশোধন করা হয়েছিল। কোষের স্থানান্তর বিভিন্ন পরিস্থিতিতে একটি ভূমিকা পালন করে, তা ইমিউন রেসপন্স হতে পারে, বা কোনও রোগের অগ্রগতির জন্য উদ্দীপকের প্রতিক্রিয়া হতে পারে। চতুর্থ অধ্যায়ে একটি কোলাজেন-অ্যালজিনেট মডেল ব্যবহার করে ক্যাম্পার কোষের স্থানান্তরের অনুসন্ধান করা হয়েছে। কোষের বহির্কোষীয় ম্যাট্রিক্সের সাথে সিস্টেমকে আরও সম্পর্কিত করার জন্য মাইক্রোবিড কম্পোজিশনের মধ্যে কোলাজেনের প্রবর্তন করা হয়েছিল। মাইক্রোস্ক্যাফোল্ডের মধ্যে নিয়ন্ত্রিত এমএমপিও কোষের স্থানান্তর পর্যবেক্ষণ করা হয়েছিল তা যাচাই করার জন্য নিয়ন্ত্রণ কোষের তুলনায় মাইক্রোস্ক্যাফোল্ডের অভ্যন্তরে 48 ঘণ্টা পর পর্যবেক্ষণ করা 'কোষের সমষ্টির সংখ্যা বৃদ্ধি' ছিল এনক্যাপসুলেটেড কোষের আক্রমণাত্মকতার ইঙ্গিত দেয়।

পঞ্চম অধ্যায় : টিস্যু ইঞ্জিনিয়ারিংয়ের ক্ষেত্রে কোষগুলির কার্যকরী আচরণ সংরক্ষণ করতে পারে এমন একটি প্ল্যাটফর্ম তৈরি করা উচ্চ ক্লিনিকাল প্রাসঙ্গিকতা রয়েছে। ঐতিহাসিকভাবে, হেপাটোসাইটগুলি প্রাথমিক কোষগুলির মধ্যে একটি যার কার্যকারিতা দীর্ঘ সময় ধরে 2 ডিতে বজায় রাখা খুব কঠিন। এদেরকে 2ডি-তে কালচার করা কঠিন, কারণ শেষ পর্যন্ত এরা ডি-ডিফারেন্টিয়েট করে এবং তাদের অঙ্গসংস্থান ও কর্মক্ষমতা হারিয়ে ফেলে। পঞ্চম অধ্যায়ে প্রাথমিক হুঁদুরের হেপাটোসাইটের কার্যকারিতা সংরক্ষণের চেষ্টা করা হয়েছে। মাইক্রোস্ক্যাফোল্ডের উৎপাদনের জন্য অনুরূপ ড্রপলেট মাইক্রোস্ফুইডিক কৌশল ব্যবহার করা হয় কিন্তু কোলাজেন এবং অ্যালজিনেটের সাথে ডিসেলুলারাইজড ম্যাট্রিক্স প্রবর্তন করে এটি দেখার জন্য যে কোন কম্পোজিশন হেপাটোসাইটের বেঁচে থাকাকে সমর্থন করে। এছাড়াও, এই মডেলটি বিষাক্ততা পরীক্ষা করার জন্য ব্যবহার করা যেতে পারে কিনা তা পরীক্ষা করার জন্য, মাইক্রোস্ক্যাফোল্ডগুলি ওষুধ দিয়ে পরিচালিত করা হয়েছিল যা ড্রাগ প্রেরিত লিভার সাইটোটক্সিসিটির শক্তিশালী প্রেরক হিসাবে পরিচিত। এই গবেষণাগুলি এই সিদ্ধান্তে পৌঁছেছে যে এই মডেলটি ড্রাগ টক্সিসিটি গবেষণার জন্য একটি সম্ভাব্য লিভার মডেল হতে পারে।

ষষ্ঠ অধ্যায়ে: থিসিসের উপসংহার ও ভবিষ্যৎ দৃষ্টিভঙ্গি নিয়ে আলোচনা করা হয়েছে।

Table of Contents

Acknowledgements	i
Abstract	iii
List of Figures	xvii
List of Tables	xxv
List of Schemes	xxvii
List of Abbreviations	xxix

Chapter 1: Introduction and Literature Review

1.1. History and Background	3
1.2. Motivation for the study	4
1.3. Classification	5
1.3.1. Non-Scaffold techniques.....	5
1.3.1.1. Spheroids.....	6
1.3.1.2. Organoids	8
1.3.2. Scaffold-based techniques	9
1.3.2.1. Synthetic Hydrogels.....	10
1.3.2.2. Natural Hydrogels	10
1.3.2.3. Microscaffolds/Microfluidic devices/Bioprinting	11
1.4. Application of 3D Platforms.....	15
1.4.1. Co-culture in 3D	15
1.4.2. Other applications	16
1.5. Challenges and current commercial status.....	18
1.5.1. Unmet challenges.....	18
1.5.2. Commercially available 3D platforms	19

1.6. Conclusion and future outlook.....	20
1.7. Objectives of the study	20
1.8. Outline of the Thesis.....	21
References.....	22

Chapter 2: Developing the platform to study basic cellular processes like cell growth and proliferation

2.1. Introduction.....	35
2.2. Materials and Methods.....	38
2.2.1. Materials.....	38
2.2.2. Coaxial electrospray of core-shell microscaffolds	38
2.2.3. Synthesis of carbon dots.....	38
2.2.4. Cell encapsulation in microscaffolds	39
2.2.5. Scanning electron microscopy	39
2.2.6. Live dead staining assay	39
2.2.7. Cell proliferation studies	40
2.2.7.1. Alamar Blue Assay	40
2.2.7.2. Monitoring the change in pH	40
2.2.8. Gene expression study.....	41
2.2.9. Albumin assay	42
2.2.10. Hypoxia Assay.....	42
2.2.11. Drug uptake and toxicity study	42
2.3. Results.....	43
2.3.1. Designing and characterization of core-shell microscaffolds	43
2.3.2. Cell viability in microgels	47
2.3.3. Hypoxic core formation	51
2.3.4. Genetic expression and functionality of encapsulated cells.....	52
2.3.5. Drug uptake	53
2.4. Discussion.....	56
2.5. Conclusion	59

References.....	60
-----------------	----

Chapter 3: Application of the developed platform for studying modulation of oncogene expression and its effects

3.1. Introduction.....	65
3.2. Materials and methods	69
3.2.1. Cell lines.....	69
3.2.2. Reagents and materials.....	69
3.2.3. RNA-isolation and qPCR.....	69
3.2.4. Transfections and treatments.....	70
3.2.5. Immunoblotting.....	70
3.2.6. Scratch assay	71
3.2.7. Colony formation assay.....	71
3.2.8. Cell proliferation studies	71
3.2.8.1. Live dead staining assay	71
3.2.8.2. Alamar blue assay	72
3.2.8.3. Growth curve by monitoring the change in pH	72
3.2.9. Gene expression study	72
3.2.10. Immunofluorescence staining.....	73
3.3. Results.....	74
3.3.1. USP37 levels are elevated in different cancers correlate with poor prognosis in gynaecological cancers.....	74
3.3.2. Elevated expression of USP37 might be responsible for transformation of different cells.	75
3.3.3. Inhibition of USP37 results in the reduced survival of ovarian cancer cells ...	76
3.3.4. Inhibition of USP37 results in reduced migration of ovarian cancer cells.....	76
3.3.5. Inhibition of USP37 and its effects on different EMT markers.	77
3.3.6. Cell proliferation and genetic expression study of USP37 depletion using 3D cell culture system.....	78
3.3.7. Immunofluorescence and genetic expression study of USP37 depletion	80
3.4. Discussion.....	82
3.5. Conclusion	84

References.....	85
-----------------	----

Chapter 4: Application of the platform to study cellular migration and metastatic potential of cancer cells

4.1. Introduction.....	91
4.2. Materials and methods	95
4.2.1. Materials	95
4.2.2. Electrospray of alginate-collagen microscaffolds	95
4.2.3. Cell encapsulation in microscaffolds.....	95
4.2.4. Scanning electron microscopy	96
4.2.5. Sirius red staining	96
4.2.6. Gelatin zymography	96
4.2.7. Immunofluorescence staining.....	96
4.2.8. Flowcytometry study	97
4.2.9. Gene expression study	97
4.3. Results.....	99
4.3.1. Characterization of the platform.....	99
4.3.2. Observing the effect of PMA on migration of cells by 2D scratch assay.....	101
4.3.3. Quantification of MMP9 upregulation by gelatin zymography and immunolabelling.....	102
4.3.4. Clustering of cells inside 3D microscaffolds.....	103
4.3.5. Gene expression profile of the EMT markers in the encapsulated cells	105
4.4. Discussion.....	108
4.5. Conclusion	111
References.....	112

Chapter 5: Modification of the platform for culturing primary cells

5.1. Introduction.....	119
5.2. Materials and methods	123
5.2.1. Materials	123

5.2.2. Electrospray of alginate-collagen microscaffolds	123
5.2.3. Isolation of primary rat hepatocytes	123
5.2.4. Preparation of decellularized ECM	124
5.2.5. DNA content assay	124
5.2.6. Cell encapsulation in microscaffolds.....	124
5.2.7. Scanning electron microscopy.....	125
5.2.8. Uniaxial compressive strength of scaffolds.....	125
5.2.9. Alamar blue assay.....	125
5.2.10. Immunofluorescence staining.....	125
5.2.11. Gene expression study	126
5.2.12. Drug toxicity assay	127
5.3. Results.....	128
5.3.1. Development and characterization of microscaffolds	128
5.3.2. Observing the growth and functionality of the encapsulated HuH7 cells in the microscaffolds	132
5.3.3. Observing the growth and functionality of the encapsulated HuH7 cells in the microscaffolds	133
5.3.4. Drug toxicity assay	138
5.4. Discussion.....	139
5.5. Conclusion	141
References.....	142

Chapter 6: Conclusions and Future Outlook

6.1. Conclusions.....	149
6.2. Future outlook.....	151
Publications	153
Curriculum vitae.....	155

List of Figures

Figure Number	Figure Title	Page No.
Chapter 1		
Figure 1.1.	Diagrammatic representation of the most commonly used techniques for generation of 3D cell culture platforms	9
Figure 1.2.	Pictorial representation of gradual transition in the field for monolayer 2D co-culture platform to 3D microfluidic organs-on-chip	18
Chapter 2		
Figure 2.1	Schematic illustration of coaxial electrospray system for generating microcapsule with various compositions of core and shell in single step using two aqueous fluids.	43
Figure 2.2	A. Microgels showing similar number of encapsulated cells B. Brightfield microscope image showing uniform size microgels of approximately 400 μm - 500 μm .	44
Figure 2.3	A. FTIR spectra for core and shell of the microscaffold. B. SEM micrographs for core-shell system showing pores at 1000x magnification. C. The core and shell shown by brightfield and fluorescent imaging of microscaffold developed with a green fluorescent acrylate dye in the core. D. SEM micrographs showing the pore size variation with varying crosslinking density (PEGDA: 3% and 8% in shell). (Scale bar for SEM images: 20 μm)	45
Figure 2.4	Microscopic fluorescent imaging of the encapsulated dye-labeled cells (MG63) at 2.5x magnification; (a)-(c) show the spatial arrangement of the cells in the microsphere (Cellular dyes used, Green- CMFDA dye; Red- CM-Dil)	46
Figure 2.5	Fluorescent micrographs of live-cell assay using calcein-AM dye. A. Brightfield and fluorescence micrographs of cell-encapsulated core at 4x magnification. B. Brightfield and fluorescent micrographs of cell encapsulated in shell at 4x magnification.	47
Figure 2.6	Growth curves. The change in pH was plotted as a ratio of emission intensities at 450nm (blue) and 550nm (green) for the various cell lines for five days. In addition, Alamar blue fluorescence intensity reading was recorded and plotted for various cell lines over 5 days.	48
Figure 2.7	Cellular growth curves. The change in pH was plotted as a ratio of emission intensities at 450nm (blue) and 550nm (green) for the MG-63 cell line for five days. In addition, cellular growth was also	49

- monitored by Alamar blue fluorescence intensity and plotted. (a) The growth curve of MG-63 cell line encapsulated in alginate-gelatin micro scaffold containing 3% PEGDA in the shell solution and (b) when encapsulated in alginate-gelatin micro scaffold containing 8% PEGDA in the shell solution. The growth curves (a) and (b) plot are an average of 2 biological replicate having 3 technical replicate each.
- Figure 2.8 Cellular growth curves. The change in pH was plotted as a ratio of emission intensities at 450nm (blue) and 550nm (green) for the MG-63 cell line for five days. In addition, cellular growth was also monitored by Alamar blue fluorescence intensity and plotted. (a) The growth curve of MG-63 cell line encapsulated in alginate-gelatin micro scaffold containing 3% PEGDA in the shell solution and (b) when encapsulated in alginate-gelatin micro scaffold containing 8% PEGDA in the shell solution. The growth curves (a) and (b) plot are an average of 2 biological replicate having 3 technical replicate each. 50
- Figure 2.9 Growth curves. The growth curves for osteosarcoma cell lines were compared using pH sensitive carbon dots. 50
- Figure 2.10 Green fluorescence observed due to the fluorogenic dye, Hypoxia-IT, due to hypoxic regions in the micro scaffold (imaged by bright field) at A. 48 hours and B. 96 hours at 4x magnification. Green fluorescent intensity line graphs were generated for the respective time points. 51
- Figure 2.11 A. Albumin production by culture of Huh-7 cells in tissue culture plates (2D) and encapsulated in alginate micro scaffolds (3D) B. Gene expression analysis of markers for hepatic progenitor cells using qPCR C. The genotypic expression of EMT markers in osteosarcoma cells (MG-63) using qPCR. The graphs plot are an average of 3 biological replicate with 3 technical replicate each. (Significant difference, One way ANOVA, * $p < 0.05$) 53
- Figure 2.12 A. Doxorubicin (Dox) diffusion and its effect on encapsulated cells in the 3D micro scaffolds. After 30 minutes of Dox exposure, the encapsulated cells were stained with Calcein AM (live cell stain) to observe the toxicity effect of Dox across the depth of the micro scaffold by confocal laser scanning microscopy. The presence of doxorubicin was confirmed by its red fluorescence. B. Alamar blue assay for micro scaffolds and tissue culture plates on MG-63 cells. Images are captured at 10x magnification. The graph plot is an average of 2 biological replicate and 3 technical replicate each. Scale bar: 200 μm ; (One way ANOVA, * $p < 0.05$) 54
- Figure 2.13 Alamar blue assay for MG-63 cells grown in micro scaffolds and on tissue culture plates. The graph shows that after treatment with doxorubicin the viability in tissue culture plate is the lowest. In comparison, the same concentration results in least decrease in cell viability for cells encapsulated in core-shell architecture 55

microscaffolds. This states the fact that slightly higher drug concentration is required to achieve effective cell death in 3D condition and a concentration achieved by 2D culture may not result in similar effects. The graph plot is an average of 2 biological replicates

Chapter 3

Figure 3.1	A. Comparative expression analysis of USP37 in different cancer. Red boxplot indicates the tumor group. Grey boxplot indicates the normal group. Source: (TCGA) And GTEx data. B. Survival analysis of patients with respect to USP37 expression in different gynecological cancers (CESC, and OV)	74
Figure 3.2	A. Comparative expression of USP37 in various cell lines. Relative mRNA expression of USP37 in Ovarian Cancer cell lines (IGROV-1 and PA-1) as compared to non-transformed cell line (MCF-10A). B. Relative protein expression of USP37 in ovarian cancer cell lines (IGROV-1 and PA-1) as compared to non-transformed cell line (MCF-10A). C. Graphical representation of western blot analysis between non transformed (MCF10A) and ovarian cancer cell lines.	75
Figure 3.3	A. Representative image of colony formation capability after knockdown of USP37 using SiRNA in PA-1 cell line. B. Quantification of number of colonies formed in untreated control and cells with downregulated USP37	76
Figure 3.4	A. Brightfield microscopic image showing the scratch assay in untreated control cells and cells with downregulated USP37 gene in A. PA-1 and B. IGROV-1 cell line.	77
Figure 3.5	A-B. Fluorescence micrographs of the cells grown in tissue culture plates (2D) for USP37 (red), N-cadherin (green), E-cadherin (yellow) and DAPI (blue). The images were captured at 20x magnification and were pseudo coloured using ImageJ software. A-B. Fluorescence micrographs of the cells grown in tissue culture plates (2D) for USP37 (red), N-cadherin (green), E-cadherin (yellow) and DAPI (blue). The images were captured at 20x magnification and were pseudo coloured using ImageJ software	77
Figure 3.6	A. Emission spectra of carbon dots at λ_{ex} 365 and 500 nm. Fluorescence emission at 450 nm when excited at 365 nm showing no variation in intensity with changing pH. When excited at 500 nm the emission intensity at 550 nm showing increase with decrease in pH. (b) SEM micrographs for the microscaffold system. (c) SEM micrographs showing pores at 1000x magnification. (Scale bar for SEM images: 20 μ m)	79
Figure 3.7	A. Cellular growth curves. The change in pH was plotted as a ratio of emission intensities at 450nm (blue) and 550nm (green) for various	80

cell lines over five days. For comparison cell growth was also quantified by Alamar blue fluorescence intensity and plotted for various cell lines over 5 days. The growth curves for ovarian cancer cell line PA I under two conditions, control and downregulated USP37 were compared using pH sensitive carbon dots and alamar blue assay. B. Fluorescent micrographs for the encapsulated PA I cells under two conditions, control and downregulated USP37 over a period of 5 days. (Scale bar for fluorescent micrographs: 100µm)

- Figure 3.8 A-B. Fluorescence micrographs of the cells encapsulated in the 3D microgels observed on Day 1 and Day 5 for USP37 (red), N-cadherin (green), E-cadherin (yellow) and DAPI (blue). The images were captured at 20x magnification and were pseudo coloured using ImageJ software. C. The fluorescence intensities were quantified for each image using ImageJ software, normalized with respective DAPI and plotted using GraphPad software. D. Genetic expression of EMT markers (Snail, Twist, E-cadherin and N-cadherin) and USP37 in ovarian cancer cell line (PA I) respectively. The graphs plotted are an average of 2 biological replicates and 3 technical replicates. Scale bar for fluorescent micrographs: 100µm 81

Chapter 4

- Figure 4.1 A. Brightfield microscope images of microgels showing cell spreading observed under 4x objective for optimization of alginate concentration to be used per volume of the solution. B. Fluorescent micrographs showing DAPI and actin staining in untreated and treated cells MG63 cells encapsulated in 0.4% alginate observed at 20x magnification in an epifluorescence microscope. 99
- Figure 4.2 A. Sirius red staining of collagen-alginate microgels captured by GelDoc-It2 Imager. B. Quantification of the intensity profile using ImageJ2 software. 100
- Figure 4.3 A-F. SEM micrographs for the micro-scaffolds with varying concentration of collagen. Changing the collagen concentrations effects the porosity of the micro-scaffold. 101
- Figure 4.4 A. Scratch assay in 6-well culture dishes, with and without PMA treatment, observed in brightfield at 4x magnification (Scale bar: 200 µm). B. Quantification of the decrease in scratch area with and without PMA treatment. 101
- Figure 4.5 A. Gelatin zymography image observed after Coomassie Brilliant Blue staining to observe the levels of MMPs in various cell line supernatant with (Treated) and without (UT) size of 800-900 µm. treatment of PMA after 24 hours. B. Quantification of the MMP9 bands observed by Coomassie staining. 102

Figure 4.6	A. Fluorescent micrographs showing MMP9 staining in untreated and treated cells HT1080 cells observed at 40X magnification in a confocal microscope (Scale bar: 50µm). B. MMP9 antibody staining observed through flowcytometry in U2OS cell line, shows a considerable shift as compared to the unstained cells. (Flow cytometry graphs are normalized to unit area for better representation)	103
Figure 4.7	A. Fluorescence micrographs captured in 10x objective showing the spheroids formed under treated and untreated condition in different cell lines after 24 hours. The nuclei are labelled with DAPI (blue) and actin filaments is labelled with TRITC-Phalloidin (Red). The images were captured in a z-stack format, and then the maximum intensity projection has been shown of each condition (Scale bar: 200µm). B. Number of clusters in each condition is quantified in the box plot. The experiment was done in two biological replicates with three technical replicates in each experiment.	104
Figure 4.8	A(i) Fluorescence micrographs captured in 10x objective showing the spheroids formed under treated and untreated condition in different cell lines after 48 hours. The nuclei are labelled with DAPI (blue) and actin filaments is labelled with TRITC-Phalloidin (Red). The images were captured in a z-stack format, and then the maximum intensity projection has been shown of each condition (Scale bar: 200µm). A(ii) Confocal images of one set of treated and untreated condition of HT1080 cells, captured in a 40x objective (Scale bar: 50µm). B. Number of spheroids in each condition is quantified in the box plot. The experiment was done in two biological replicates with three technical replicates in each experiment.	105
Figure 4.9	(A)-(D) qPCR studies for MMP9 and other EMT markers, like Twist, N-cadherin and E-cadherin. Internal control was GAPDH. The relative fold change was plot for both 24 hours and 48 hours after the treated cells were encapsulated in the collagen microgels. The graphs are an average of 2 biological replicates and 3 technical replicates. (Significant difference, one way ANOVA, *p<0.05)	107

Chapter 5

Figure 5.1	A. Schematic representation of the generation of cells encapsulated in the microscaffold. B. SEM micrograph showing cells encapsulated in the microscaffold.	126
Figure 5.2	A. SEM micrographs for the micro-scaffolds with varying concentration of collagen. Changing the collagen concentrations effects the porosity of the microscaffold.	127
Figure 5.3	A. H&E staining of decellularized skin scaffold. B. DNA content of the native skin versus the decellularized skin scaffolds (P < 0.001). C.	128

	H&E staining of decellularized liver scaffold. D. DNA content of the native liver versus the decellularized liver scaffolds.	
Figure 5.4	A. Cells encapsulated in the microscaffold. B-D. SEM of microscaffolds with different decellularized matrix compositions, Skin (B), Liver (C) and Collagen (D). E-G. SEM micrographs of the matrix structure of Skin (E), Liver (F) and Collagen (G). H-M. Immunofluorescence images of collagen I and fibronectin of the different decellularized matrices observed under 10x objective. (Scale bar: 200µm)	129
Figure 5.5	A. Representative image of the instrument used for compressive test. B. Graph showing mechanical properties of scaffolds (stress vs strain plots) under compressive loading.	130
Figure 5.6	A. Calcein/PI staining of the encapsulated HuH7 cells in different scaffolds observed under 2.5x objective (Scale bar: 500 µm). B. Growth curve of HuH7 encapsulated in microscaffolds observed with alamar blue assay for a period of 6 days. C. Albumin expression observed with qPCR technique of the HuH7 cells extracted from the microscaffolds with different matrix compositions.	131
Figure 5.7	A. Proliferation study. a-e. Brightfield images of the hepatocytes encapsulate in the microscaffold with different matrix composition observed under 2.5x objective (Scale bar: 500 µm). f-j. Immunofluorescence images of the primary hepatocytes encapsulated in different microscaffolds taken on day 2 after encapsulation (Blue: DAPI; Green: EdU staining). k-o. Immunofluorescence images of the primary hepatocytes encapsulated in different microscaffolds taken on day 6 after encapsulation (Blue: DAPI; Green: EdU staining). (Scale bar: 200 µm)	132
Figure 5.8	Growth curve of primary hepatocytes encapsulated in microscaffolds observed with alamar blue assay for a period of 14 days	133
Figure 5.9	A. Immunofluorescence images of albumin expression in primary hepatocytes encapsulated in different microscaffolds taken on day 2 after encapsulation (Blue: DAPI; Red: Albumin staining) observed under 10x objective. B. Immunofluorescence images of albumin expression in primary hepatocytes encapsulated in different microscaffolds taken on day 14 after encapsulation (Blue: DAPI; Red: Albumin staining) observed under 10x objective. (Scale bar: 200 µm)	134
Figure 5.10	A. Albumin expression observed with qPCR technique of the primary hepatocytes extracted from the microscaffolds with different matrix compositions. B. Immunofluorescence of cells encapsulated in collagen with liver dECM microscaffold for CK-18 (primary 1:100, anti-rabbit secondary antibody 1:100) and albumin (primary 1:100,	135

anti-mouse secondary antibody 1:100), observed under 40x objective of microscope. (Scale bar: 50 μ m)

Figure 5.11 A. Schematic of the hepatotoxicity study performed B. qPCR analysis of Albumin and CYP1A1 expression in the extracted hepatocytes after 6 days of drug treatment while encapsulated in the micro scaffold containing collagen with liver dECM (Alg MS_{Col/dLiver}. C. qPCR analysis of Albumin and CYP1A1 expression in the extracted hepatocytes after 6 days of drug treatment while encapsulated in the micro scaffold containing collagen (Alg MS_{Col}). 138

List of Tables

Table Number	Table Title	Page Number
Chapter 1		
Table 1.1	Most commonly used both naturally and synthetically derived scaffolds used to develop 3D platforms	13
Chapter 2		
Table 2.1	Primer sequences used for real time PCR	41
Table 2.2	Combinations of alginate and gelatin used for getting proper core-shell architecture	44
Chapter 3		
Table 3.1	Primer sequences used for real time PCR	69
Chapter 4		
Table 4.1	Primer sequences used for real time PCR	98
Chapter 5		
Table 5.1	Primer sequences used for real time PCR	125

List of Schemes

Scheme Number	Scheme Title	Page Number
Chapter 2		
Scheme 2.1	Schematic representation of the <i>in-vitro</i> platform and its applications	58
Chapter 3		
Scheme 3.1	Schematic representation to demonstrate the advantage of 3D cell culture platform over traditional 2D platform for identification of oncogenic potential of USP37 in ovarian cancer cells.	83
Chapter 4		
Scheme 4.1	Schematic representation of the in-vivo migration model that can be used to study the invasive potential of the encapsulated cells in a short span of time and also used for drug screening studies for migratory inhibitor molecules	110

List of Abbreviations

°C	Degrees Celsius
µg	Microgram
µL	Microliter
µm	Micrometer
2D	Two-dimensional
3D	Three-dimesional
Alg MS	Alginate microscaffold
BSA	Bovine Serum Albumin
Calcein-AM	Calcein acetoxymethyl ester
CBB	Coomassie Brilliant Blue
cDNA	Complementary DNA
DAPI	4',6-diamino-2-phenyindole
dECM	Decellularized Extracellular Matrix
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
ECM	Extracellular matrix
EdU	5-Ethynyl-2'-deoxyuridine
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMT	Epithelial mesenchymal transition
FACS	Fluorescence associated cell sorting
FBS	Foetal Bovine Serum
FDA	Food and drug Administration
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HBSS	Hank's Balanced Buffer Solution
H&E	Hematoxylin and Eosin
kDa	kiloDalton
mg	Milligram
mL	Mililiter
MMP	Matrix metalloproteinase

nM	Nanomolar
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylene glycol
PFA	Paraformaldehyde
PI	Propium Iodide
RNA	Ribonucleic Acid
Rpm	Rotations per minute
RT-PCR	Real time PCR
RUNX2	Runt related transcription factor 2
SEM	Scanning Electron Microscopy
TCP	Tissue culture plates
UV	Ultraviolet
VIS	Visible Spectroscopy