

Aus der Klinik für Urologie
der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Peter Albers

**Die morphologische Charakterisierung drei-dimensionaler
Zellaggregate aus Ko-Kulturen von Keimzelltumor- und
Mikromilieuzellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Gillian Florentine Wulfers-Ludwig

2026

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Daniel Nettersheim

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Feride Kröpil

Der Sinn des Lebens besteht nicht darin, ein erfolgreicher Mensch zu sein, sondern ein wertvoller.

– Albert Einstein

Publikationen

Mit dieser Dissertation assoziierte Publikationen

Skowron MA*, Eul K*, Stephan A*, Ludwig GF*, Wakileh GA*, Bister A, Söhngen C, Raba K, Petzsch P, Poschmann G, Kuffour EO, Degrandi D, Ali S, Wiek C, Hanenberg H, Münk C, Stühler K, Köhrer K, Mass E, Nettersheim D.

Profiling the 3D interaction between germ cell tumors and microenvironmental cells at the transcriptome and secretome level.

Mol Oncol. 2022 Sep;16(17):3107-3127.

Zitierfähige Konferenzbeiträge

Skowron MA, Stephan A, Eul K, Wakileh G, Ludwig GF, Söhngen C, Bister A, Raba K, Petzsch P, Poschmann G, Wiek C, Hanenberg H, Stühler K, Köhrer K, Albers P, Nettersheim D.

Die Interaktion zwischen Tumorzellen und deren Mikromilieu beeinflusst die Cisplatin-Sensitivität von Keimzelltumoren. Mündlicher Vortrag von Skowron MA, 13th Symposium Urologische Forschung, 'Deutsche Gesellschaft für Urologie e.V.' (AUF), 17-19th November 2022, Erlangen, Deutschland; *Urologie* 2023. 62 (Suppl 1):4–20.

Skowron MA, Eul K, Stephan A, Wakileh GA, Ludwig GF, Söhngen C, Bister A, Raba K, Petzsch P, Poschmann G, Stühler K, Köhrer K, Albers P, Nettersheim D.

Studying the interaction of germ cell tumors with the microenvironment reveals novel factors involved in cisplatin resistance. Mündlicher Vortrag von Skowron MA, 37th Annual EAU Congress, 01-04th July 2022, Amsterdam, Niederlande. *European Urology*. 81 (Suppl 1): S833-S834.

Skowron MA, Eul K, Ludwig GF, Wakileh GA, Stephan A, Söhngen C, Bister A, Raba K, Petzsch P, Poschmann G, Stühler K, Köhrer K, Albers P, Nettersheim D.

Die Untersuchungen zum Einfluss des Tumor-Mikromilieus auf Keimzelltumoren entschlüsseln neue bona fide Faktoren der Cisplatin-Resistenz. Mündlicher Vortrag von Skowron MA, 67. Kongress der Nordrhein-Westfälischen Gesellschaft für Urologie (NRWGU), 07-08th April, 2022, Münster, Deutschland. *German Medical Science GMS Publishing House*; 2022

Skowron MA, Ludwig G, Eul K, Petzsch P, Raba K, Poschmann G, Stephan A, Wakileh GA, Stühler K, Köhrer K, Albers P, Nettersheim D.

Der Einfluss des Tumormikromilieus auf die Cisplatin-Sensitivität und das Transkriptom von Keimzelltumoren in vitro. Mündlicher Vortrag von Skowron MA, 73th Kongress ‚Deutsche Gesellschaft für Urologie e.V.‘ (DGU), 15th – 18th September 2021, Stuttgart, Deutschland *Der Urologe 2021.60 (Suppl 1):S6–S114*

I. Zusammenfassung

Keimzelltumoren (KZT) sind die häufigste solide maligne Erkrankung des Mannes im Alter von 20 bis 44 Jahren. Sie können histologisch in Seminome (SE) und Nicht-SE unterteilt werden. Mit einer relativen 5 Jahres Überlebensrate von 97 % haben sie unter den malignen Tumorerkrankungen eine gute Prognose. Allerdings ist die relative Überlebenswahrscheinlichkeit im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung deutlich reduziert. Derzeit gibt es kaum Behandlungsalternativen für Cisplatin-resistente KZT, so dass 10 – 15 % der Patienten mit einem fortgeschrittenen KZT und 3 – 5 % aller Patienten mit einem KZT versterben. Tumoren stellen eine komplexe Struktur aus Tumorzellen, nicht-tumoralen Zellen (Fibroblasten, Immunzellen, Endothelzellen, u.a.) und Makromolekülen dar, dem sogenannten Tumormikromileu (TMM). Inzwischen ist es allgemein anerkannt, dass das TMM das Fortschreiten, die Metastasierung und das therapeutische Ansprechen von Tumoren beeinflusst und dies nicht nur von autonomen Prozessen der Tumorzellen abhängt. Allerdings ist das TMM in KZT noch unzureichend beschrieben. Deswegen war das Ziel dieser *in vitro* Arbeit eine umfängliche Charakterisierung des dreidimensionalen Wachstums von KZT-Zellen in Abhängigkeit von der Anwesenheit von TMM-Zellen durchzuführen. Hierfür wurden die häufigsten KZT-Subtypen (SE, Embryonalkarzinom (EK) und Chorionkarzinom (CK)) mit TMM-Zellen (Fibroblasten, Lymphozyten, Endothelzellen und Makrophagen) in der *Hanging Drop* Zellkulturtechnik ko-kultiviert und mikroskopisch untersucht. Um die KZT-Zellen mikroskopisch von den TMM-Zellen unterscheiden zu können, wurden die KZT-Zelllinien mit einem GFP-Plasmid und die TMM-Zelllinien mit einem mCherry-Plasmid transduziert. Die EK-Zelllinien (NCCIT, 2102EP) und SE-Zelllinie (TCam-2) wiesen ein stabiles Wachstum auf. Sie waren sowohl in der Mono- als auch den unterschiedlichen Ko-Kulturen in der Lage ein kugelförmiges Sphäroid zu bilden. Im Gegensatz dazu wuchsen die CK-Zelllinien (JAR, JEG-3) flach und planar. Die Ko-Kultivierung mit Lymphozyten (JURKAT) und Fibroblasten (MPAF) führte jedoch ebenfalls zur Ausbildung eines kugelförmigen Sphäroids der CK-Zellen. Gleichzeitig zeigte sich eine verminderte Ausprägung der Lymphozyten in diesen Ko-Kulturen. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern neue Hinweise auf die Interaktion von KZT-Zelllinien und TMM-Zelllinien in der 3D-Zellkultur. Insbesondere die CK-Zelllinien scheinen eine ausgeprägte immunsuppressive Wirkung auf Lymphozyten auszuüben, was mit der geringen Effektivität von Immuncheckpointinhibitoren bei dieser Tumorentität einhergehen könnte. Die Beobachtung, dass Fibroblasten (MPAF) und Endothelzellen (HUVEC) in Ko-Kulturen mit KZT-Zelllinien ein besonders stabiles Wachstum zeigten, legt nahe, dass diese Zelltypen eine zentrale Rolle im TMM spielen. Insbesondere bei therapieresistenten CK könnten sie potenzielle Zielstrukturen für neue Behandlungsstrategien darstellen.

II. Abstract

Germ cell tumors (GCT) are the most common solid malignant disease in men aged 20 to 44. They can be divided histologically into seminomas (SE) and non-SE. With a relative 5-year survival rate of 97 %, they have a good prognosis among malignant tumor diseases. However, the relative probability of survival is significantly reduced compared to the general population. Currently, there are few treatment alternatives for cisplatin-resistant GCT, meaning that 10–15 % of patients with advanced GCT and 3–5 % of all patients with GCT die.

Tumors are complex structures consisting of tumor cells, non-tumor cells (fibroblasts, immune cells, endothelial cells, etc.) and macromolecules, known as the tumor microenvironment (TMM). It is now widely accepted that the TMM influences the progression, metastasis, and therapeutic response of tumors and that this does not depend solely on autonomous processes of the tumor cells. However, the TMM in GCTs has not yet been adequately described. Therefore, the aim of this *in vitro* study was to comprehensively characterize the three-dimensional growth of GCT cells depending on the presence of TMM cells.

For this purpose, the most common GCT subtypes (SE, embryonal carcinoma (EC), and choriocarcinoma (CC)) were co-cultured with TMM cells (fibroblasts, lymphocytes, endothelial cells, and macrophages) using the hanging drop cell culture technique and examined microscopically. In order to distinguish the GCT cells from the TMM cells microscopically, the GCT cell lines were transduced with a GFP plasmid and the TMM cell lines with a mCherry plasmid.

The EC cell lines (NCCIT, 2102EP) and SE cell line (TCam-2) showed stable growth. They were able to form spherical spheroids in both mono- and different co-cultures. In contrast, the choriocarcinoma cell lines (JAR, JEG-3) grew flat and planar. However, co-cultivation with lymphocytes (JURKAT) and fibroblasts (MPAF) also led to the formation of a spherical spheroid of CC cells. At the same time, there was a reduced expression of lymphocytes in these co-cultures.

The results of this study provide new insights into the interaction of GCT cell lines and TMM cell lines in 3D cell culture. CC cell lines in particular appear to exert a pronounced immunosuppressive effect on lymphocytes, which could be associated with the low effectiveness of immune checkpoint inhibitors in this tumor entity. The observation that fibroblasts (MPAF) and endothelial cells (HUVEC) showed particularly stable growth in co-cultures with GCT cell lines suggests that these cell types play a central role in TMM. They could represent potential target structures for new treatment strategies, particularly in therapy-resistant CC.

III. Abkürzungsverzeichnis

5-Jahres-PFÜ	5-Jahres-progressionsfreie Überlebensrate
5JÜR	5 Jahres-Überlebensrate
BSA	Bovine Serum Albumin
CC	<i>choriocarcinoma</i>
CK	Chorionkarzinom
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DAPI	Diamidino-phenylindol-dihydrochlorid
Diff.	differenziert
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
EC	<i>Embryonal carcinoma</i>
EK	Embryonalkarzinom
EZM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendinitrioltetraessigsäure
FBS	Fetales Kälberserum
GCNIS	Germ cell neoplasia in situ
GCT	Germ cell tumor
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
IGCCCG	<i>International Germ Cell Cancer Collaborative Group</i>
IL	Interleukin
KAF	Krebs-assoziierte Fibroblasten, <i>cancer associated fibroblasts</i>
KZT	Keimzelltumor
LDH	Laktatdehydrogenase
LK	Lymphknoten
LSM	Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
NEAA	Nicht essenzielle Aminosäuren
P/S	Penicillin/ Streptomycin
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEI	polyethylenimine
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
PGC	Primordial germ cell, Primordiale Keimzelle
PMA	<i>Phorbol 12 myristate 13-acetate</i>

qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
RKI	Robert Koch Institut
RLA	retroperitoneale Lymphadenektomie
RNA	Ribonukleinsäure
SDF-1	<i>Stromal-Cell-derived-factor-1</i>
SE	Seminom, <i>seminoma</i>
TAM	Tumorassoziierte Makrophagen
TEC	<i>Tumor endothelial cell</i>
TMM	Tumormikromilieu
TME	Tumor microenvironment
VEGF	<i>Vaskular endothelial growth factor</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
wt	<i>wildtype</i> , Wildtyp

IV. Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Keimzelltumoren des Mannes.....	1
1.1.1	Definition und Einteilung von Keimzelltumoren.....	1
1.1.2	Epidemiologie	2
1.1.3	Prognose.....	3
1.1.4	Relevanz der Forschung	3
1.2	Das Tumormikromileu	5
1.2.1	Definition, Aufbau und Funktion	5
1.2.2	Fibroblasten	6
1.2.3	Makrophagen	6
1.2.4	T-Lymphozyten	7
1.2.5	Endothelzellen	8
1.3	Ziel der Arbeit	10
2	Material und Methoden.....	11
2.1	Versuchsplan.....	11
2.2	Verwendete Zelllinien.....	11
2.3	Verwendete Materialien und Geräte für die Zellkultur	12
2.4	Kultivierung von humanen Zelllinien	13
2.5	THP-1 Differenzierung.....	15
2.5.1	RNA-Isolation	15
2.5.2	cDNA-Synthese.....	15
2.5.3	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion	16
2.6	Herstellung der GFP- und mCherry-exprimierender KZT- und TMM-Zellen	18
2.7	Dreidimensionale Kultivierung der Zellen im „Hanging Drop“-Modell	20
2.7.1	Ko-Kultivierung von KZT-Zelllinien und Zelllinien des TMM	21
2.7.2	Fixierung der Zellaggregate	21
2.7.3	Überführen der Zellaggregate auf eine „96-well“-Platte	22
2.7.4	Permeabilisieren der Zellaggregate	22
2.7.5	Zellkernfärbung	22
2.7.6	Immunhistochemische Färbung mit CD44	22
2.7.7	Materialien für die DAPI- und CD44-Antikörper-Färbungen	23

2.8	Mikroskopie	24
2.8.1	Durchlicht - /Phasenkontrastmikroskopie.....	24
2.8.2	Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (LSM).....	24
2.8.3	Verwendete Mikroskope	25
2.9	Auswertung via ImageJ ®	26
2.9.1	Verwendete Softwares und Programme	27
3	Ergebnisse	28
3.1	Morphologie der gewachsenen Zellaggregate in den Weitfeldaufnahmen	28
3.2	Größe der gewachsenen Zellaggregate	30
3.3	Morphologie der Zellaggregate in den Fluoreszenz-Aufnahmen	32
3.3.1	TCam-2-Ko-Kulturen	32
3.3.2	2102EP-Ko-Kulturen	40
3.3.3	NCCIT-Ko-Kulturen	48
3.3.4	JAR-Ko-Kulturen	56
3.3.5	JEG-3-Ko-Kulturen.....	64
4	Diskussion	72
4.1	Einfluss der Pluripotenz auf das Wachstum von KZT-Zellen im „Hanging Drop“	72
4.2	Einfluss der TMM-Zellen auf die Organisation der KZT-Zellen im 3D-Modell..	74
4.3	Veränderte Ausprägung der Immunzellen in den Ko-Kulturen.....	76
4.4	Schlussfolgerung	79
5	Literaturverzeichnis	80
6	Abbildungsverzeichnis	86
7	Tabellenverzeichnis	90
8	Anhang	91
9	Danksagung.....	IX

1 Einleitung

1.1 Keimzelltumoren des Mannes

1.1.1 Definition und Einteilung von Keimzelltumoren

Keimzelltumoren (KZT) sind eine heterogene Gruppe von Tumoren, die bei beiden Geschlechtern in allen Altersgruppen gonadal (Hoden und Eierstöcken) und extragonadal (retroperitoneal, mediastinal, zerebral) auftreten können (1, 2). Sie entstehen durch eine fehlerhafte Reifung der primordialen Keimzelle mit daraus resultierender ungehemmter Zellteilung (3). Dieser Ursprung kann durch die Expression des keimbahnspezifischen Proteins VASA und das Muster der genomischen Prägung nachgewiesen werden (1, 4). Anhand ihres Chromosomensatzes und ihres Differenzierungsgrades können KZT in fünf verschiedene Typen eingeteilt werden, von denen drei im Hoden vorkommen (**Tabelle 1**). Im Vergleich zu den KZT vom Typ II und III gehen KZT Typ I von einer unreiferen Keimzelle aus (1). Sie treten vor der Pubertät auf und beinhalten unreife Teratome und Dottersacktumore (5). KZT vom Typ II sind vorwiegend in den Gonaden lokalisiert und treten nur in 5 % der Fälle extragonadal auf. Sie entstehen aus einer Keimzellneoplasie in situ (GCNIS; engl.: „germ cell neoplasia in situ“) und treten in der postpubertären Altersgruppe auf (5). KZT vom Typ II können histologisch weiter in Seminome (SE) und Nicht-SE unterteilt werden (6). Dabei ist das SE mit 61 % der häufigste Typ (7). Die Nicht-SE können noch weiter unterteilt werden in das Embryonalkarzinom (EK), welches als Stammzellpopulation gilt und sich weiter in den Dottersacktumor vom postpubertären Typ, das Teratom vom postpubertären Typ, das Teratom mit maligner somatischer Transformation sowie in das Chorionkarzinom (CK) differenzieren kann und gemischte KZT (6). KZT vom Typ III treten ebenfalls erst postpubertär auf, jedoch typischerweise im höheren Lebensalter (>50 Jahre). Zu dieser Gruppe gehört ausschließlich das spermatozystische SE, welches nur im Hoden auftritt und i.d.R. gutartig ist (5).

Da 98 % aller Hodentumoren den KZT vom Typ II zugeordnet werden, befasst sich diese Arbeit nur mit KZT vom Typ II. Dabei liegt der Schwerpunkt auf den am häufigsten auftretenden Subtypen, dem SE und EK. Des weiteren wurde als weiterer nicht-seminomatöser KZT Subtyp das CK verwendet. Zum Zeitpunkt der praktischen Arbeit stand keine etablierte humane Zelllinie für den Dottersacktumor zur Verfügung, daher konnte dieser Subtyp in dieser in-vitro Arbeit nicht eingeschlossen werden.

Die fünf Typen der KZT				
Typ	Lokalisation	Phänotyp	Alter	Ursprungszelle
I	Hoden/ Ovar/	(unreifes)	Neugeborene/	Frühe PGC/
	Sakralregion/	Teratom/	Kinder	Gonozyten
	Retroperitoneal/	Dottersacktumor		
	mediastinal/ Hals/			
	Mittellinie/ Gehirn/ andere seltene Lokalisationen			
II	Hoden	SE/ nicht-SE	>15 Jahre (Median 35 und 25 Jahre)	PGC/ Gonozyten
	Ovar	Dysgerminom/ Nicht-semi- matös	>4 Jahre	PGC/ Gonozyten
	Dysgenetische Gonaden	Dysgerminom/ nicht-SE	Kongenital	PGC/ Gonozyten
	Vorderes Mediastinum	SE/ nicht-SE	Adoleszente	PGC/ Gonozyten
	Gehirn (Mittellinie)	Germinom/ nicht- SE	Kinder (Median 13 Jahre)	PGC/ Gonozyten
III	Hoden	Spermatozy- stisches SE	>50 Jahre	Spermatogonien/ Spermatozyten
IV	Ovar	Dermoidzyste	Kinder/	Oogonien/
			Erwachsene	Oozyten
V	Plazenta/ Uterus	Hydatiforme Mole	Repro-duk-tions- phase	Leere Eizelle/ Spermatozoen

Tabelle 1: Unterteilung der KZT in fünf unterschiedliche Typen; PGC: primordial germ cell, primordiale Keimzelle; (übernommen aus Greimelmaier K. et al (2) und modifiziert nach Oosterhuis JW et al (1))

1.1.2 Epidemiologie

Die häufigste Form des Hodentumors ist der KZT Typ II (8). Mit einem Anteil von 25 % ist der KZT Typ II die häufigste solide maligne Erkrankung des Mannes im Alter von 20 bis 44 Jahren (9). Dabei werden 80 % der Diagnosen vor dem 50. Lebensjahr gestellt (10). In Deutschland erkrankten im Jahr 2019 4.162 Männer an Hodenkrebs, dies entspricht einer standardisierten Erkrankungsrate von 10,4 pro 100.000 Einwohner (RKI 2022) (7). Insgesamt machen Hodentumore 1 % aller Neoplasien im Erwachsenenalter und 5 % aller urologischen Tumore aus (11).

1.1.3 Prognose

Mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 97 % haben KZT die zweitbeste Prognose unter den malignen Tumorerkrankungen (RKI 2019) (7). Die Überlebenswahrscheinlichkeit hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie beispielsweise der Histologie, dem Stadium, dem Alter, den Begleiterkrankungen und der Qualität der Versorgung (9, 12). Unter leitliniengerechter Therapie liegt die 5-Jahres-Überlebensrate Stadien unabhängig für SE bei 97,9 % und für Nicht-SE bei 94,9 % (9, 10). Allerdings sinkt die Überlebenswahrscheinlichkeit wie bei den meisten malignen Tumorerkrankungen ab dem Zeitpunkt der Metastasierung. Für die Vorhersage des weiteren Krankheitsverlaufs, der Prognose und der Anzahl an Chemotherapiezyklen unterteilt die International Germ Cell Cancer Collaborative Group (IGCCCG) die metastasierten KZT anhand bestimmter Kriterien in unterschiedliche Prognosegruppen. Dabei liegt die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit für Patienten aus einer guten Prognosegruppe mit einem metastasierten KZT immer noch bei 86 - 95 %, bei Patienten aus einer schlechten Prognosegruppe sinkt sie auf 48 - 64 % (13, 14).

Auch wenn KZT im Vergleich zu anderen Tumorerkrankungen sogar im metastasierten Stadium eine gute Prognose haben, haben die Patienten, die an einem KZT erkranken, eine geringere relative Überlebenswahrscheinlichkeit im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung. Nach 10 Jahren leben noch 81,8 - 95,2 % der Patienten, nach 30 Jahren sind es noch 62,4 - 89,4 %. Dies ist nicht nur auf die tumorbedingte Mortalität, sondern auch auf die Langzeitfolgen der Chemo- und Strahlentherapie zurückzuführen. (10)

1.1.4 Relevanz der Forschung

Mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 97 % zählen KZT zu den günstigen bösartigen Neubildungen (RKI 2022) (**Kapitel 1.1.3**). Die gute Prognose ist unter anderem auf die Einführung und Therapie mit Cisplatin zurückzuführen, da KZT zu den Cisplatin-sensibelsten Tumoren zählen (15). 70 - 80 % der Patienten mit einem metastasierten KZT können mit der Cisplatin-basierten Chemotherapie trotzdem geheilt werden (16, 17). Eine große Herausforderung ist allerdings die Behandlung der Patienten mit einem Cisplatin-resistenten KZT (16, 18). Für dieses Patientenkollektiv gibt es derzeit kaum alternative Behandlungsmöglichkeiten (15). Das hat zur Folge, dass 10 - 15 % der Patienten mit einem fortgeschrittenen KZT und 3 - 5 % aller Patienten mit einem KZT versterben (17).

Problematisch ist außerdem das geringe Erkrankungsalter der Patienten, da Langzeitkomplikationen sowohl nach Bestrahlung als auch nach einer Chemotherapie auftreten können. Diese Komplikationen können auch erst Jahre oder Jahrzehnte später auftreten. Nach einer Bestrahlung besteht in 30 % der Fälle das Risiko für einen Hypogonadismus und es erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für Zweittumore im

Bestrahlungsfeld. In 10 - 30 % kommt es nach einer Chemotherapie ebenfalls zu einem Hypogonadismus. Zudem besteht ein erhöhtes Risiko für solide Tumoren und Leukämien. Chemotherapien können auch kardiotoxisch und nephrotoxisch sein und damit das kardiovaskuläre Risiko erhöhen und die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) vermindern. Die im Falle eines Rezidivs durchgeführte retroperitoneale Lymphadenektomie (RLA) ist aufgrund der fibrotischen Veränderungen nach einer Chemotherapie oder Bestrahlung eine schwierige Operation, die mit einer hohen Morbidität verbunden ist. (3)

Obwohl bereits gute Therapieoptionen vorhanden sind, ist es wichtig, diese weiter zu verbessern, um jungen Männern eine gute Lebensqualität mit wenigen Langzeitfolgen zu ermöglichen. Ein weiterer Aspekt ist die hohe Morbidität und Mortalität bei Patienten mit einem Cisplatin-resistenten KZT, daher ist es wichtig, zielgerichtete Therapien für jene zu entwickeln. Außerdem verändert sich die Prognose des Patienten ab dem Zeitpunkt der Metastasierung. Es sollte daher ein weiterer Bestandteil der aktuellen Forschung sein, dies zu berücksichtigen.

1.2 Das Tumormikromilieu

1.2.1 Definition, Aufbau und Funktion

Tumoren setzen sich nicht ausschließlich aus Tumorzellen zusammen, sondern stellen eine komplexe Struktur aus Tumorzellen, nicht-tumoralen Zellen und Makromolekülen dar, das sogenannte Tumormikromilieu (TMM) (**Abb. 1**). Das Mikromilieu beschreibt die Tumorumgebung, in der die verschiedenen Zelltypen und Makromoleküle wechselwirken (19). Dieses besteht aus residierenden oder infiltrierenden tumorassoziierten Fibroblasten und diversen Immunzellen (Bspw. Makrophagen und Lymphozyten), sowie Endothelzellen der neugebildeten Gefäße und zahlreiche weitere Zelltypen. Der nicht-zelluläre Anteil aus Makromolekülen wie z. B. Faserproteine wie Kollagen wird extrazelluläre Matrix (EZM) genannt. Je nach Tumorart, Tumorstadium und Patient variiert die zelluläre Zusammensetzung und Funktion des TMMs. Deswegen kann jede Tumorerkrankung als individuelles und komplexes Ökosystem betrachtet werden (20).

Stephan Paget hat bereits 1889 die sog. „Seed and Soil“ Hypothese aufgestellt (21). Diese besagt, dass zur Entstehung von Tumoren (Samen) eine unterstützende Mikroumgebung (Boden) notwendig ist (21). Inzwischen ist es allgemein anerkannt, dass das TMM das Fortschreiten, die Metastasierung und das therapeutische Ansprechen von Tumoren mit beeinflusst und dies nicht nur von autonomen Prozessen der Tumorzellen abhängt (20, 22-26). Zudem rekrutieren Tumorzellen aktiv die Stromazellen und erzeugen dadurch ein Milieu, welches das Tumorwachstum aktiv fördert (27).

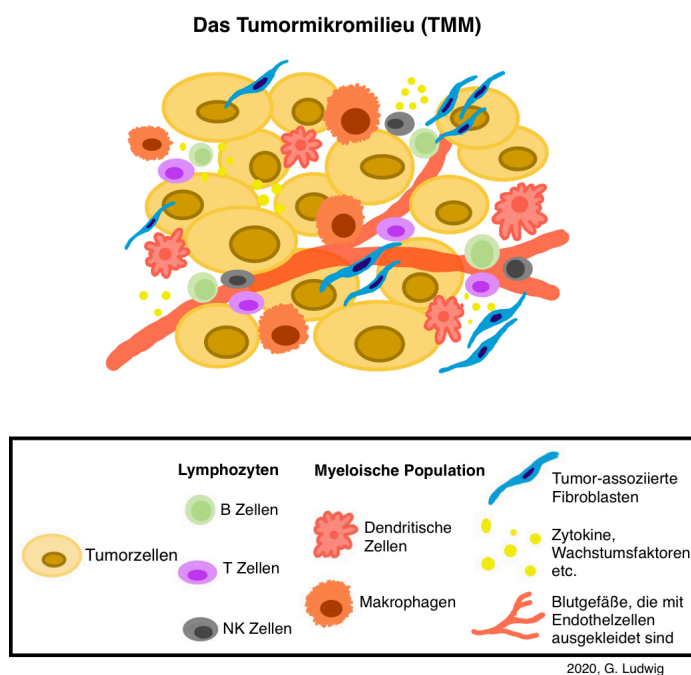


Abb. 1: Schematische Darstellung des TMM.

1.2.2 Fibroblasten

Fibroblasten sind die am häufigsten vorkommenden Zellen des Bindegewebes und für das Gleichgewicht zwischen Gewebefestigkeit und -elastizität verantwortlich (28, 29). Hierfür produzieren sie Proteine der EZM insbesondere Kollagen und Elastin (28, 29). Außerdem spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Wundheilung und sind für regenerative Prozesse mitverantwortlich (28). Bei starker oder andauernder Verletzung sowie Inflammation können Fibroblasten überaktiviert werden, sodass es bspw. zu einer Versteifung von Gewebe oder Ausbildung einer Narbe kommt (28).

Durch die Interaktion mit Tumorzellen können Fibroblasten ebenfalls über- oder daueraktiviert werden. Fibroblasten, die im Zusammenhang mit Tumoren stehen, werden als krebsassoziierte Fibroblasten, kurz KAF bezeichnet (22, 26, 30, 31). Sie stellen 80 % der Tumormasse dar und spielen eine entscheidende Rolle bei der Bildung der EZM sowie bei metabolischen und immunologischen Prozessen des TMMs (22, 26, 30, 31). KAF unterstützen durch die Produktion von Wachstumsfaktoren die Tumorprogression (22, 26, 27, 30, 32). Zusätzlich induzieren sie eine epitheliale-mesenchymale Transition, die die Tumordinvasion und Metastasierung fördert (22). Durch die Produktion von SDF-1 (Stromal-Cell-derived-factor-1) fördern sie die Rekrutierung von Endothelzellen aus dem Knochenmark und die Tumorangiogenese (22, 27). Zudem sind KAF Schlüsselakteure bei der Bildung von Arzneimittelresistenzen (22, 30). Dies ist unter anderem bedingt durch die Adhäsion von Tumorzellen an Fibroblasten sowie einer erschwerten Penetration von Arzneimitteln in den Tumor selbst (22). Fibroblasten sind sehr widerstandsfähig und spielen vermutlich eine Rolle bei der Entstehung von Tumorrezidiven. Bereits bei Darmkrebspatienten wurde gezeigt, dass eine Anhäufung von KAF mit einer schlechteren Prognose und einem erhöhten Risiko für ein Rezidiv einhergeht (30).

1.2.3 Makrophagen

Makrophagen sind wesentlicher Bestandteil des angeborenen Immunsystems und entwickeln sich aus peripheren Monozyten, die im Blut zirkulieren (33). Sie erfüllen verschiedene Funktionen bei der Abwehr von Infektionen, der Wundheilung und der Aufrechterhaltung der Gewebemöostase und sind deshalb in nahezu allen Organen vorhanden (33-35). Makrophagen sind funktionell plastisch und können ihren Polarisationszustand an unterschiedliche Bedingungen anzupassen (25). Durch Chemotaxis werden sie zum jeweiligen Organ oder Infektionsherd angezogen und vor Ort durch die sekretierten Zytokine polarisiert (33). Dabei können basierend auf *in vitro* Versuchen zwei Arten von Makrophagen unterschieden werden. M1 Makrophagen, die vor allem durch die Sekretion von

proinflammatorischen Zytokinen und Endotoxinen gebildet werden, sind proinflammatorische Makrophagen und fördern eine entzündliche Reaktion gegen Krankheitserreger und Tumorzellen (25, 34, 35). M2 Makrophagen sind antiinflammatorisch und werden vor allem nach Kontakt zu IL-4 gebildet (25, 34, 35). Sie besitzen entzündungshemmende Eigenschaften, was eine überschießende Immunreaktion verhindert. Dies ist essenziell für die Wundheilung nach erfolgreicher Abwehr einer Infektion. Außerdem haben M2 Makrophagen tumorfördernde Funktionen (25, 34, 35). *In vivo* weisen Makrophagen jedoch Merkmale beider Zustände gleichzeitig auf. Außerdem ist die Polarisierung dynamisch und kein rein statistischer Prozess, sodass es kaum möglich ist, Makrophagen *in vivo* in M1 und M2 Makrophagen zu unterteilen (36).

Ähnlich wie bei KAF werden auch Tumor-assoziierte M2 Makrophagen als TAM bezeichnet (20, 33-35). Sie sind die häufigsten Immunzellen im TMM und können in einigen Neoplasien bis zu 50 % der Tumormasse ausmachen (34, 37). TAM sind an der Tumorprogression beteiligt (20, 34, 38). Sie stimulieren die Tumorangiogenese und unterdrücken die antitumorale Immunität, indem sie die zytotoxische Aktivität von CD8⁺-T-Zellen hemmen und ein immunsuppressives TMM schaffen (33, 34, 38). Außerdem fördern sie die Invasion, Extravasation, Migration, Intravasation, das Überleben und die Kolonisation von Tumorzellen und sind somit wesentlicher Bestandteil bei der Metastasierung von Tumoren (20, 26, 34, 38). Durch eine verstärkte Ablagerung von Kollagen beeinflussen sie auch die veränderte EZM im TMM (34, 38). Zudem fördern TAM die Therapieresistenz (20, 35, 37, 38). Bei Schilddrüsen-, Lungen- und Leberzellkarzinomen konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Makrophagendichte mit einer schlechteren Überlebensrate einhergeht (35, 38).

1.2.4 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten sind eine Untergruppe der Leukozyten und dienen der allgemeinen Abwehr von Infektionserregern, indem sie fremde Zellen und Oberflächenmoleküle erkennen. Sie werden im Knochenmark gebildet und reifen im Thymus aus. Durch die Expression ihres Korezeptormoleküls können T-Lymphozyten in zwei Gruppen eingeteilt werden (33). T-Helferzellen exprimieren CD4 und sind an der zellulären und humoralen Immunantwort beteiligt. Durch die Produktion spezifischer Zytokine aktivieren und rekrutieren sie andere Immunzellen, was zu einer Immunreaktion gegen verschiedene Krankheitserreger führt (39). Zytotoxische T-Zellen hingegen exprimieren CD8. Diese Zellen sind für die Eliminierung von Bakterien, Viren, Parasiten und Tumorzellen verantwortlich, indem sie die Zielzelle direkt abtöten (39).

T-Zellen sind nach dem TAM der zweitgrößte Immunzelltyp im TMM (33) und spielen eine zentrale Rolle bei der Kontrolle des Tumorwachstums (40). Je nach Art und Stadium des Tumors sowie Zytokin-Expressionsprofils des TMM, können T-Lymphozyten die Tumorinitiation und -progression hemmen oder fördern (33). Die normale Funktion von CD4⁺-Zellen ist innerhalb von Tumoren eingeschränkt und sie können sogar selbst die Immunreaktion gegen Tumorzellen unterdrücken (41, 42). CD8⁺-Zellen innerhalb von Tumoren sind nicht nur dysfunktional, sondern besitzen auch einen veränderten Phänotyp (20, 41). Sie weisen eine verminderte Zytokinproduktion und Zytotoxizität auf (41). Diese T-Zell-Erschöpfung ist nicht nur auf einen veränderten Tumorstoffwechsel, sondern auch durch Stoffwechselmerkmale des TMMs zurückzuführen (43). In experimentellen Modellen konnte gezeigt werden, dass die Tumorsuppression und das Langzeitüberleben vom Zusammenspiel von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen abhängt (40).

1.2.5 Endothelzellen

Endothelzellen kleiden die Innenseite von Blutgefäßen aus und trennen so zirkulierendes Blut von anderem Gewebe. Je nach Gewebe ist die gebildete Barriere unterschiedlich dicht, um z. B. die Einwanderung von zirkulierenden Immunzellen zu ermöglichen. Außerdem spielen Endothelzellen eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase, dem Transport von Immunzellen und der Aktivierung von angeborenem und erworbenem Immunsystem (30).

Endothelzellen, die die Gefäßwände von Gefäßen in Tumoren auskleiden, werden als TEC (engl.: „tumor endothelial cell“) bezeichnet (30). Sie zeigen einen veränderten Phänotyp und weisen somatische sowie chromosomale Anomalien auf (26). Darüber hinaus besitzen TECs eine diskontinuierliche oder fehlende Basalmembran (30, 44). TECs können auch verstärkte Fenestrationsen und erweiterte interzelluläre Verbindungen sowie eine erhöhte Proliferationsrate aufweisen (30). Nicht nur die TECs unterscheiden sich von normalen Endothelzellen, auch die Gefäße selbst und ihre Gefäßarchitektur innerhalb von Tumoren sind strukturell und funktional abnormal (44, 45). Die Gefäßstruktur ist stark desorganisiert, gewunden und erweitert, was zu einem chaotischen Flussmuster führt (30, 44, 45). Zudem ist die Permeabilität erhöht und die Gefäße weisen eine geringere Stabilität auf (30, 44, 45). Folkmann hat 1971 erstmals die Hypothese aufgestellt, dass das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren von der Angiogenese abhängig ist und die Blockierung der Angiogenese eine mögliche Therapieoption darstellt (46). Mittlerweile ist nachgewiesen worden, dass Tumore ohne Blutgefäße nicht wachsen, überleben oder metastasieren können (26, 30, 44). Die abnormen Blutgefäße führen zur Intravasation von Tumorzellen und fördern damit die Metastasierung (26, 30). Zudem sezernieren TECs Biglykan, welches ebenfalls die

Metastasierung fördert (26, 30). Wie bereits in 1.2.2 beschrieben, rekrutieren KAF Endothelzellen aus dem Knochenmark und fördern durch die Sekretion von IL-8 die Neovaskularisation (30). Durch die endotheliale mesenchymale Transition stellen TECs außerdem eine der Hauptquellen für KAF (30).

1.3 Ziel der Arbeit

KZT sind die häufigste solide maligne Erkrankung des jungen Mannes. Auch wenn KZT mit einer relativen 5 Jahres Überlebensrate von 97 % die zweitbeste Prognose unter den malignen Tumorerkrankungen haben, ist die relative Überlebenswahrscheinlichkeit im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung deutlich reduziert. Zudem gibt es derzeit kaum Behandlungsalternativen für Cisplatin-resistente KZT, so dass 10 - 15 % der Patienten mit einem fortgeschrittenen KZT und 3 - 5 % aller Patienten mit einem KZT versterben.

Die Eigenschaften des TMM und der einzelnen zellulären Komponenten sind von der jeweiligen Tumorart abhängig. Es konnte bereits gezeigt werden, dass es essenziell an dem Fortschreiten, der Metastasierung und dem therapeutischen Ansprechen von Tumorzellen beteiligt ist. Die Eigenschaften des TMM und der einzelnen zellulären Komponenten sind jedoch von der jeweiligen Tumorart abhängig und bislang unzureichend in KZT erforscht.

Ziel dieser *in vitro* Arbeit ist die morphologische Charakterisierung von 3D-mono- und ko-kultivierten KZT- und TMM-Zelllinien. Hierbei sollte zunächst das Wachstums- bzw. Formierungsverhalten der Zellaggregate sowie die räumliche Größe dieser in Einzel- und Ko-Kulturen mikroskopisch analysiert werden. Diese Analyse soll klären, inwiefern sich die KZT-Zelllinien untereinander in ihrem 3D-Formierungsverhalten unterscheiden und ob die TMM-Zelllinien dieses beeinflussen.

Im zweiten Schritt wird mittels fluoreszenzmikroskopischer Darstellung die tatsächliche Organisation der 3D-Ko-Kultivierungen aufgeschlüsselt, um die Verteilung der KZT- und TMM-Zellen im 3D-Zellaggregat zu analysieren. Damit können mögliche Infiltrationen und unterschiedliche Ausprägungen der TMM-Zellen nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen so dazu bei, die komplexen Mechanismen des Wachstums von KZT-Zelllinien in Abhängigkeit von TMM-Zelllinien im experimentellen Modell besser zu verstehen und so potenziell neue Erkenntnisse für die Entwicklung zielgerichteter Therapien zu erlangen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsplan

Um ein besseres Verständnis für die Interaktion von KZT und dem TMM zu bekommen, wurde das dreidimensionale Wachstum in verschiedenen Ko-Kulturen untersucht und mikroskopisch erfasst.

Dafür wurden verschiedene Zelllinien als Modell für die unterschiedlichen Zelltypen (**Tabelle 2**) inkludiert. Als Modell für das SE dient die Zelllinie TCam-2, für das EK dienen 2102EP und NCCIT und für das CK dienen JAR und JEG-3. Als Rekonstruktion des TMMs wurden primäre Zellen oder Zelllinien von Fibroblasten (MPAF), THP-1-differenzierten (-diff.) M2 Makrophagen, Lymphozyten (JURKAT) und Endothelzellen (HUVEC) verwendet.

Die „Hanging Drop“-Zellkulturtechnik erlaubt hierbei die dreidimensionale Kultivierung der Zellen / Ko-Kulturen. Um die KZT-Zellen und TMM-Zellen mikroskopisch voneinander zu unterscheiden, wurden den Zellen unterschiedliche Plasmide transfiziert. Die KZT-Zellen translatieren durch ein GFP Plasmid ein grün fluoreszierendes Protein, wohingegen die TMM-Zellen durch ein mCherry Plasmid ein rot fluoreszierendes Protein produzieren (**Tabelle 10**).

Für die Aufnahmen wurde ein konfokales Mikroskop genutzt und mittels aufgenommener Z-Stapel wurde eine pseudo-3D-Projektion erstellt.

2.2 Verwendete Zelllinien

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten humanen Zelllinien

		Zelllinie	Ursprung	Geschlecht
SE	KZT	TCam-2	SE des linken Hodens	männlich
EK		2102EP	Primäres humanes testikuläres Teratokazinom	männlich
		NCCIT	Anteriorer mediastinaler gemischter KZT	männlich
CK		JAR	Menschliche Plazenta	männlich
		JEG-3	Menschliche Plazenta	männlich
Fibroblasten	TMM	MPAF	Adulte Fibroblasten	männlich
Monozyten		THP-1	Peripheres Blut	männlich
Endothelzellen		HUVEC	Nabelvene	-
T-Lymphozyten (CD4 ⁺ /CD8 ⁻)		JURKAT	Peripheres Blut	männlich

2.3 Verwendete Materialien und Geräte für die Zellkultur

Tabelle 3: Verwendete Materialien und Geräte für die Zellkultur

Material	Hersteller	Hauptsitz
Automatischer Zellzähler TC20TM	BioRad	Feldkirchen, Deutschland
C1000 Touch Thermal Cycler CFX384™ Real-Time System	BioRad	Feldkirchen, Deutschland
CO2-Inkubator HeraCell 150i	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
DMEM (1X) + GlutaMAX™-I	Gibco	Schwerte, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Endothelial Cell Growth Medium 2	PromoCell	Heidelberg, Deutschland
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom GmbH	Berlin, Deutschland
Feinwaage AG285	Mettler Toledo	Gießen, Deutschland
FrameStar® 384 well Skrited PCR Plate	4titude	Berlin, Deutschland
Glas-Pasteur-Pipetten	Brand	Wertheim, Deutschland
IL-13	R&D Systems	Wiesbaden, Deutschland
IL-4	R&D Systems	Wiesbaden, Deutschland
Kühlzentrifuge Allegra 2IR Centrifuge	Beckman Coulter	Brea, CA, USA
L-Glutamin (100X)	Gibco	Schwerte, Deutschland
NanoDrop™ 2000 Mikrovolumen-Spektralphotometer	ThermoFisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Nicht-essenzielle Aminosäuren (MEM NEAA (100X))	Gibco	Schwerte, Deutschland
P/S (Penicillin Streptomycin)	Gibco	Schwerte, Deutschland
Phorbol 12 myristate 13-acetate (PMA)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Pipette 8-Kanal 100 µl	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

Material	Hersteller	Hauptsitz
Pipetten Einkanal 2,5 µl/ 10µl/ 100 µl/ 1000 µl	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 10, 100, 1250	Nerbe plus GmbH	Winsen, Deutschland
Reagenzienreservoir 50 ml	Corning Incorporated	Kaiserslautern, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5 ml/ 2,0 ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Röhrchen 15 ml/50 ml	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
RPMI Medium 1640 (1X)	Gibco	Schwerte, Deutschland
S1000™ Thermal Cycler	BioRad	Feldkirchen, Deutschland
T-75 Zellkultur-Flaschen	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
Tischzentrifuge Mini Spin	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Trypsin-EDTA (1X) 0,05 % Phenolrot	Gibco	Schwerte, Deutschland
Vortex Mixer	Scientific Industries	Lemgo, Deutschland
Zählkammern	BioRad	Feldkirchen, Deutschland
Zellkulturschalen 100mm	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Zentrifuge 5810	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

2.4 Kultivierung von humanen Zelllinien

Sowohl die humanen KZT-Zelllinien als auch die Zelllinien des TMM wurden in T75-Zellkultur-Flaschen in entsprechenden Zellkulturmedien (**Tabelle 4**) kultiviert. Dabei wurden diese je nach Bedürfnissen der Zelllinie mit Supplementen ergänzt. Bei jedem Medium wurde 10 % FBS und 1 % P/S hinzugegeben. Zelllinienabhängig wurde zudem L-Glutamin und / oder NEAA hinzugefügt. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert und sämtliche Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Reinraumwerkbank durchgeführt.

In Abhängigkeit von der jeweiligen Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 70 - 90 % i. d. R. zweimal pro Woche passagiert. Hierfür wurde das bestehende Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Um die adhärent wachsenden Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen, wurde 0,05 % Trypsin EDTA für 3 - 5 min bei 37 °C hinzugefügt. Das Trypsinieren wurde mit der Zugabe von FBS-haltigem Medium gestoppt. Im Anschluss wurde ein Teil der dabei entstandenen Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt. Da die Zelllinien THP-1 und JURKAT nicht

adhärent wachsen, konnte hier direkt ein Teil der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt werden.

Für die Zellzählung wurden 0,4 % Trypanblau mit der jeweiligen Zellsuspension in gleichen Teilen vermischt und in eine Zählkammer überführt. Der automatische Zellzähler von Biorad (**Tabelle 3**) hat die Zellzahl pro ml und den Anteil an vitalen Zellen bestimmt.

Tabelle 4: Übersicht der Zelllinienabhängige Zellkulturmedien mit entsprechenden Supplementen

Zelllinie	Medium	Supplemente
TCam-2 NCCIT THP-1 JURKAT	RPMI Medium 1640 (1X)	10 % FBS 1 % P/S 1 % L-Glutamin
2102EP JAR JEG-3	DMEM (1X) + GlutaMAX™-I	10 % FBS 1 % P/S 1 % L-Glutamin
MPAF	DMEM (1X) + GlutaMAX™-I	10 % FBS 1 % P/S 1 % L-Glutamin 1 % NEAA
HUVEC	Endothelial Cell Growth Medium 2	Endothelial Cell Growth Medium Supplement Mix 10 % FBS

2.5 THP-1 Differenzierung

Bei der Zelllinie THP-1 handelt es sich um Monozyten. Für den weiteren Versuchsplan wurden diese zu M2 Makrophagen differenziert (47). Dafür wurden die Zellen durch die Zugabe von Phorbol 12 myristate 13-acetate (PMA) mit einem Stock von 150 nM zum Zellkulturmedium zu M0 Makrophagen differenziert (47). Nach 24 Stunden Kultivierung sind die Zellen durch die erfolgreiche Differenzierung zu M0 Makrophagen adhärent geworden. Anschließend wurde das Zellkulturmedium durch RPMI-Medium ersetzt und weitere 24 Stunden inkubiert. Um die M0 Makrophagen zu M2 Makrophagen zu polarisieren, wurde diesen 20 ng / ml der Interleukine (IL) 4 und 13 für 72 Stunden hinzugefügt (47). Um die erfolgreiche Differenzierung zu M2 Makrophagen zu bestätigen, wurde die Expression von M2 Makrophagen-spezifische Markern (**Tabelle 7**) mittels quantitativer Echtzeit- (qRT-) Polymerasekettenreaktion (PCR) (**Kapitel 2.5.3**) überprüft

2.5.1 RNA-Isolation

Für die Ribonukleinsäure (RNA)-Isolierung wurde das RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen gemäß Herstellerprotokoll verwendet (**Tabelle 5**). Die RNA-Konzentration wurde mit dem NanoDrop-Photospektrometer gemessen (260 / 280 nm; 260 / 230 nm).

Tabelle 5: Zusätzliche Materialien für die RNA-Isolation

Material	Hersteller	Hauptsitz
2-Mercaptoethanol	MERCK	Darmstadt, Deutschland
Ethanol	VWR Chemicals	Langenfeld, Deutschland
RNeasy Mini Kit (250)	Qiagen	Hilden, Deutschland

2.5.2 cDNA-Synthese

Die Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) ist ein DNA-Strang, der mittels Reverser Transkriptase komplementär zur RNA synthetisiert wird. Dabei binden Primer, sog. Oligo-dT-Nukleotide, spezifisch an die mRNA. Es wurden 250 bis 1000 µg der zuvor isolierten RNA für die cDNA-Synthese verwendet und in ein PCR-Röhrchen überführt. Das PCR-Röhrchen wurde dann mit RNase freiem Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 12,5 µl aufgefüllt. Danach wurden 1 µl dNTP (Desoxynukleotide)-Mix (10 mM), 1 µl Oligo(dT)₁₈ -primer (0.5 µg/µl), 4 µl RT-Puffer, 1 µl „Maxima H Minus reverse transcriptase“ (200 U/µl) und 1 µl „RiboLock RNase inhibitor“ (40 U / µl) hinzugefügt. Daraufhin wurde das PCR-Röhrchen kurz zentrifugiert und in einen PCR-„Cycler“ überführt. Die PCR ist in zwei verschiedene Phasen unterteilt. Die Primer-Annealing- und DNA Polymerisationsphase läuft für 30 min bei 65°C. Die zweite Phase, in der die Enzymdeaktivierung stattfindet, läuft für 5 min bei 85°C. Zum Schluss

wurde die cDNA 1:17 mit RNase-freiem Wasser auf eine finale Konzentration von 50 ng / μ l verdünnt.

Tabelle 6: zusätzlich verwendete Materialien für die cDNA-Synthese

Material	Hersteller	Hauptsitz
dNTP Mix	ThermoFisher Scientific	Oberhausen, Deutschland
Maxima H Minus Reverse Transkriptase	ThermoFisher Scientific	Oberhausen, Deutschland
Oligo(dT) ₁₈ Primer	ThermoFisher Scientific	Oberhausen, Deutschland
RiboLock RNase Inhibitor	ThermoFisher Scientific	Oberhausen, Deutschland
RT Buffer	ThermoFisher Scientific	Oberhausen, Deutschland

Tabelle 7: verwendete Primer für die cDNA-Synthese

Primer	Primerdesign	Sequenz 5'-3'
GAPDH	Forward	TGCCAAATATGATGACATCAAGAA
	Reverse	GAGTGGGTGTCGCTGTTG
ACTB	Forward	CCATCATGAAGTGTGACGTGG
	Reverse	GTCCGCCTAGAAGCATTTCGCG
CD206	Forward	CTACAAGGGATCGGGTTTATGGA
	Reverse	TTGGCATTGCCTAGTAGCGTA
CD163	Forward	TTTGTCAACTTGAGTCCCTTCAC
	Reverse	TCCCGCTACACTTGTTTTTCAC
FN1	Forward	CGGTGGCTGTCAGTCAAAG
	Reverse	AAACCTCGGCTTCCTCCATAA
CD36	Forward	CTTTGGCTTAATGAGACTGGGAC
	Reverse	GCAACAAACATCACCACACCA
CD14	Forward	ACGCCAGAACCTTGTGAGC
	Reverse	GCATGGATCTCCACCTCTACTG
CCL22	Forward	ATCGCCTACAGACTGCACTC
	Reverse	GACGGTAACGGACGTAATCAC

2.5.3 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der qRT-PCR wurde die cDNA vervielfältigt und die Expressionsrate der zu untersuchenden Gene mittels Fluoreszenz-Messung quantifiziert. Dafür wurden zwei „Master Mixe“ hergestellt. Der erste bestand aus 0,5 μ l cDNA (1000 ng / 20 μ l) und 8 μ l Wasser und der zweite bestand aus 7,5 μ l „LUNA qPCR Master Mix“ (**Tabelle 8**), 0,5 μ l „Forward“ (10 μ M)- und 0,5 μ l „Reverse-Primer“ (10 μ M). Nach Herstellung dieser beiden „Master Mixe“ wurden

diese zusammengeführt und jeweils 5 µl der Mischung in drei Vertiefungen einer „384-well“-Platte gegeben. Nachdem alle Proben auf die „384-well“-Platte übertragen wurden, wurde diese mit einer selbstklebenden Plastikfolie abgedeckt und kurz zentrifugiert. Die „384-well“-Platte wurde auf einen „CFX384 Touch Thermal Cycler“ übertragen und die qRT-PCR gestartet (**Tabelle 9**). Zur Genexpressionsanalyse wurden die gemessenen Zyklusschwellenwerte (C_T -Werte) der typischen M2 Genmarkern (*CD14*, *CD36*, *CD68*, *CD163*, *CD206* und *FN1*) (48) zunächst gegen die C_T -Werte der Haushaltsgene *ACTB* und *GAPDH* normalisiert, um die relativen Expressionswerte (ΔC_T -Werte) zu bestimmen. Für die Bestimmung der differentiellen Genexpression wurden die normalisierten Werte der behandelten Proben zusätzlich mit denen der unbehandelten Kontrollproben verglichen ($\Delta\Delta C_T$ -Methode). Auf dieser Grundlage wurde der relative Expressionsunterschied („Fold Change“) berechnet.

Tabelle 8: zusätzlich verwendete Materialien für die qRT-PCR

Material	Hersteller	Hauptsitz
Luna® Universal qPCR Master Mix	New England BioLabs®	Ipswich, MA, USA

Tabelle 9: qRT-PCR-Zyklen

	95°C	2 min
39x	95°C	10 sek
	60°C	30 sek
		Ablesen der Platte
	95°C	30 sek
Schmelzkurve	95°C – 65°C in 9,5°C Schritten	5 sek
		Ablesen der Platte

2.6 Herstellung der GFP- und mCherry-exprimierender KZT- und TMM-Zellen

Um die Tumorzellen mikroskopisch von den TMM-Zellen unterscheiden zu können, wurden die KZT-Zelllinien im Forschungslabor der Hals-Nasen-Ohrenklinik (Leitung Prof. Dr. M. Wagenmann) durch Arthur Bister mit einem GFP-Plasmid und die TMM-Zelllinien mit einem mCherry-Plasmid transduziert. Da für das Einbringen der Plasmide sowohl eukaryotische Expressionsvektoren als auch lentivirale Vektoren verwendet wurden, handelt es sich bei diesem Verfahren um eine Kombination aus Transfektion und Transduktion.

Hierfür wurde ein Tag vor der Transfektion 293T-Zellen auf 10 cm Zellkulturschalen ausgesät. Für die Transduktion selbst wurde zu Supplement freiem DMEM-Medium 6 µg pczVSV-G wt Plasmid (49), 6 µg pCD/NL-BHΔ1 Plasmid (50) und 6 µg puc2CL6EGIP (51) oder 6 µg pLV-mCherry Plasmid hinzugegeben und dieses inkubiert (48). Zusätzlich wurde ein zweites Supplement-freies DMEM-Medium mit 45 µg / µl PEI (polyethylenimine) angesetzt. Diese beiden Ansätze wurden miteinander vermengt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie dann zu den 293T-Zellen gegeben wurden. Am nächsten Tag wurden 1×10^5 KZT-Zellen (für die GFP-Transduktion) oder TMM-Zellen (für die mCherry-Transduktion) auf eine „6-well“-Platte ausgesät. 48 Stunden nach der Transfektion wurde der zu Beginn erstellte Ansatz mit Virus durch einen 0.45 µm Filter gefiltert. Als nächstes wurden 500 µl des Virus in jedes ausgesäte „well“ übertragen und für 24 Stunden inkubiert. Danach wurde ein Mediumwechsel mit Standardzellkulturmedium durchgeführt und die Zellen weitere 48 Stunden inkubiert.

Anschließend wurden die GFP-positiven KZT-Zellen 10 bis 14 Tage lang auf Puromycin (1 µg / ml) selektiert. Um die Reinheit zu erhöhen, wurden die GFP+ (TCam-2, 2102EP, NCCIT, JAR, JEG-3) und mCherry+ (HUVEC, JURKAT oder THP-1) Zellpopulationen durch eine Durchflusszytometrie sortiert (48, 52). Dies wurde durch Priv. Doz. Dr. rer. nat. Margaretha Skowron durchgeführt.

Tabelle 10: verwendete Plasmide

Plasmid	Addgene-ID
pczVSV-G-wt Plasmid	(49)
pCD/NL-BH Δ 1-Plasmid	41791
puc2CL6EGIP	(51)
pLV-mCherry-Plasmid	36084

Tabelle 11: zusätzlich verwendete Materialien zur Herstellung der GFP- und mCherry-exprimierenden Zellen

Material	Hersteller	Hauptsitz
Puromycin	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Polyethylenimine (PEI)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland

2.7 Dreidimensionale Kultivierung der Zellen im „Hanging Drop“-

Modell

Im Vergleich zur herkömmlichen zweidimensionalen Zellkultur ermöglicht das „Hanging Drop“-Modell eine gute Möglichkeit das dreidimensionale Wachstum zu untersuchen, da die natürlichen direkten Zell-Zell- und Zell-EZM-Interaktion wie *in vivo* erhalten bleibt (53). So kann diese Art der Zellkultur als ein Zwischenschritt zwischen *in vitro*- und *in vivo*- Experimenten gesehen werden (54). In den nach unten hängenden Tropfen können sich die Zellen durch Gravitation auf natürlicher Weise bilden und anordnen. So können Zellaggregate aus bereits etablierten Zellsuspensionen erstellt werden. Diese Technik ermöglicht die Bildung von Sphäroiden einheitlicher Größe sowohl in der Mono- als auch in der Ko-Kultur (53).

Die zuvor herkömmlich kultivierten Zellen wurden, wie in **Kapitel 2.4** beschrieben, vorbereitet. Das dort entstandene Zellgemisch wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt und die Zellen wurden gezählt. Pro Zellkulturschale (10 cm) wurden maximal 96 „Hanging Drops“ mit 40 µl / 3×10^3 Zellen / Drop ausgebracht. Mittels einer Multikanalpipette (40 µl) wurden die Drops in einem Raster von 12 x 8 Reihen auf den umgedrehten inversen Deckel der Zellkulturschale gesetzt (**Abb. 2**). In die Unterseite der Zellkulturschale wurden 10 ml PBS gegeben, um das austrocknen der Zellen zu verhindern. Der Deckel wurde zurückgedreht, sodass sich hängende Drops bilden konnten (**Abb. 3**). Im Anschluss erfolgte die Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit vom 97 %. Die verwendeten Materialien sind in (**Tabelle 3**) aufgelistet.



Abb. 2: Zellkultivierung in der "Hanging Drop" Technik: 1. Aufnehmen der Zellsuspension mit einer Multikanalpipette 2. Aufsetzen der Pipette auf den Deckel der Zellkulturschale, absetzen der Zellsuspension 3. langsames anheben der Pipette, Zellsuspension sitzt als Tropfen auf dem inversen Deckel.

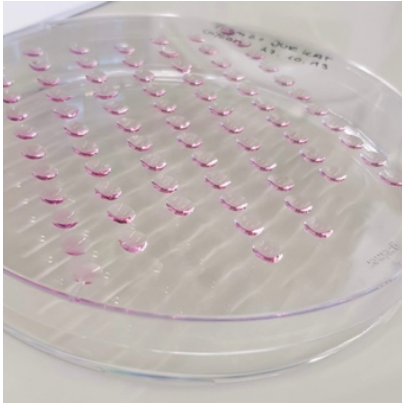


Abb. 3: Zellkulturschale mit "Hanging Drops": Der Deckel wurde wieder zurückgedreht und zurück auf den Boden der Zellkulturschale gesetzt. Die Tropfen mit Zellsuspension hängen nun nach unten.

2.7.1 Ko-Kultivierung von KZT-Zelllinien und Zelllinien des TMM

Jede KZT-Zelllinie wurde mit jeder TMM-Zelllinie ko-kultiviert (**Abb. 4**). Dafür wurde eine Zellsuspension erstellt, die zu 70 % aus der jeweiligen Tumorzelllinie (2.100 Zellen pro Drop) und zu 30 % aus der jeweiligen TMM-Zelllinie (900 Zellen pro Drop) bestand. Anschließend wurden die Zellen wie unter 2.7 beschrieben in der Hanging Drop Technik kultiviert.

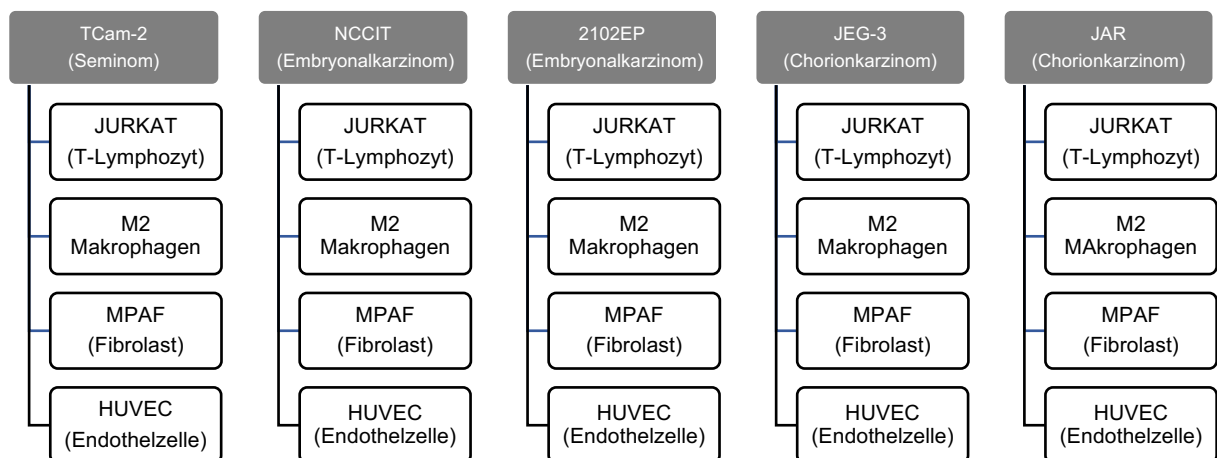


Abb. 4: Schematische Darstellung der erzeugten Ko-Kulturen.

2.7.2 Fixierung der Zellaggregate

Nach 72 Stunden wurden die im „Hanging Drop“ entstandenen Zellaggregate mit Hilfe von 3,7 % Paraformaldehyd fixiert. Dafür wurde das Medium jedes einzelnen „Hanging Drops“ auf dem umgedrehten inversen Deckel abgesaugt, ohne das Zellaggregat mit aufzusaugen. Anschließend wurden die Zellaggregate sorgsam zweimal mit PBS für jeweils 5 min gewaschen. Hierfür wurde 50 µl in den Bereich gesetzt, in dem sich vorher das Medium

befunden hat, sodass sich wieder ein Flüssigkeitstropfen gebildet hat. Der Zellkulturschalendeckel wurde ab diesem Zeitpunkt nicht erneut zurückgedreht. Nachdem die Zellaggregate gewaschen wurden, wurde das PBS wieder entfernt und 50 µl 3,7 % Paraformaldehyd wurde ebenfalls in Form eines Flüssigkeitstropfens hinzugefügt. Die Zellaggregate wurden für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur fixiert.

2.7.3 Überführen der Zellaggregate auf eine „96-well“-Platte

Im Anschluss an die Fixierung wurden die Zellaggregate auf eine „96-well“-Platte überführt. Hierbei wurden 150 µl PBS pro „well“ vorgelegt und das Paraformaldehyd, in dem sich die Zellaggregate noch befinden haben, schonend abpipettiert. Darauffolgend wurde ein Zellaggregat pro „well“ übertragen. Hierfür wurde das Zellaggregat lediglich mit einer 1000-µl-Pipettenspitze (ohne Pipette) mittels Kapillarkraft aufgenommen und in das vorgelegte PBS gegeben. Zur Vorbereitung für die weiteren Schritte wurden die Zellaggregate weitere zweimal für jeweils 5 min mit 150 µl PBS gewaschen und bis zur weiteren Verarbeitung in PBS bei 4 °C gelagert.

2.7.4 Permeabilisieren der Zellaggregate

Als Vorbereitung für die Diamidino-phenylindol-dihydrochlorid- (DAPI-) Färbung und Immunfluoreszenz wurden die Zellaggregate permeabilisiert. Hierfür wurden 150 µl 0,5 % Triton X100 für 10 min hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 150 µl PBS für jeweils 5 min gewaschen und bis zur weiteren Verarbeitung in PBS bei 4 °C gelagert.

2.7.5 Zellkernfärbung

DAPI ist einen fluoreszierenden Kernfarbstoff, welcher die DNA an AT reichen Regionen bindet. Er fluoresziert bei ultraviolettem Licht blau, wobei sein Absorptionsmaximum 358 nm und sein Emissionsmaximum bei 461 nm liegt. Für den DAPI-Ansatz wurden 0,5 mg DAPI-Pulver in 1 ml Wasser gelöst. Bei jedem Experiment wurde dann die DAPI-Lösung in einem Verhältnis von 1 : 1000 in PBS angesetzt. Nach Entfernung des PBS wurden 150 µl der DAPI-Lösung für 7 min zu den Zellen hinzugegeben. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit 150 µl PBS gewaschen und bis zur weiteren Verarbeitung in PBS bei 4°C und unter Lichtausschluss gelagert.

2.7.6 Immunhistochemische Färbung mit CD44

In die Fibroblasten MPAF konnte kein mCherry-Plasmid eingebracht werden. Daher wurden diese Zelllinien mittels direkter Immunfluoreszenz gefärbt. Hierfür wurde ein CD44-Antikörper

benutzt, der an das CD44-Antigen bindet und bereits ein Fluorchrom gebunden hat. CD44 ist ein Adhäsionsmolekül und ist unter anderem an der Entstehung von Zell-Zell-Kontakten beteiligt und kann als Marker für das TMM verwendet werden (48).

Nachdem die Zellaggregate fixiert und permeabilisiert wurden, wurde 150 µl 1,5 % BSA in PBS als Blockierungslösung für 1 Stunde hinzugegeben. Nachdem die Blockierungslösung wieder abgenommen wurde, wurden 150 µl der Antikörperlösung (1 : 100 CD44-PE in Blockierungslösung) zu den Zellaggregaten hinzugefügt und die Platte unter Lichtausschluss über Nacht bei 4 °C gelagert. Anschließend wurde dreimal mit PBS gewaschen und wie in **Kapitel 2.7.5** beschrieben die DAPI-Färbung durchgeführt.

2.7.7 Materialien für die DAPI- und CD44-Antikörper-Färbungen

Tabelle 12: zusätzlich verwendete Materialien für die DAPI- und CD44-Antikörper-Färbungen

Material	Hersteller	Hauptsitz
Bovine Serum Albumin (BSA)	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Formaldehydlösung 37 %	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Triton X 100	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
µ - Plate 96 well black	Ibidi	Gräfelfing, Deutschland

Tabelle 13: verwendete Antikörper

Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Klon	Bestell-Nr.	Hersteller
CD44 Antikörper, anti-human, PE	Maus	1 : 50	DB105	130-113-335	Miltenyi Biotec B.V. & Co.KG
Diamidino-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)				10 236 276 001	Roche Diagnostics GmbH

2.8 Mikroskopie

2.8.1 Durchlicht - / Phasenkontrastmikroskopie

Mit dem „Eclipse Ts2“-Inverses-Routinemikroskop von Nikon wurden alle Zellen in Kultur kontrolliert. Die Zellaggregate, die in der „Hanging Drop“-Zellkulturtechnik entstanden sind, wurden nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubation mit dem „Eclipse TE2000-S“-Mikroskop von Nikon aufgenommen. Für die Weitfeldaufnahmen wurde ein „Plan Fluor 10x/0.30“-Objektiv mit einem Phasenkontrast von Ph1 verwendet.

2.8.2 Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (LSM)

Für diese Arbeit wurde das Zeiss LSM 710 als konfokales Laser-Scanning-Mikroskop genutzt. Dieses hat verschiedene Vorteile wie eine sehr gute Auflösung, die Möglichkeit der dreidimensionalen Analyse über Z-Stapel und die simultane Aufnahme von unterschiedlichen Farbstoffen auf mehreren Kanälen.

Ein konfokales LSM besteht aus unterschiedlichen Komponenten. Der Laserstrahl, der auf einen Punkt im Präparat trifft, ist monochromatisches Licht mit hoher Intensität. Er scannt die Probe Punkt für Punkt, um so ein Bild zu erstellen. Die Lochblende bestimmt dabei das Streulicht um die Fokusebene herum. Diese befindet sich konfokal zum Lichtstrahl. Außerdem besitzt ein konfokales LSM ein sog. „Scan Head“. In diesem befinden sich Strahlteiler, „Pinhole“, „Scan“-System und die Fluoreszenz-Detektoren. Die von den Detektoren aufgefangenen Signale werden dann an einen Computer weitergeleitet. Durch den Scanvorgang in x-, y- und z-Richtung besteht im Gegensatz zur normalen Fluoreszenzmikroskopie die Möglichkeit der dreidimensionalen Analyse. Dieser kann beliebig oft wiederholt werden, wodurch die Qualität erhöht und das elektronische Rauschen herausgefiltert werden kann (Average). Die Signale, die von den Detektoren aufgefangen und an den Computer weitergeleitet werden, konnten mit Hilfe der ZEN („Zeiss Efficient Navigation“) Software weiterverarbeitet werden.

Für alle Aufnahmen wurde ein 10xair/NA0.45-Objektiv verwendet. Die „Pinhole“-Einstellung lag ungefähr bei einer „Airy Units“. Für einen guten Kompromiss zwischen Bildqualität und Ausbleichen wurde ein Average Wert von 4 gewählt. In **Tabelle 14** sind die verwendeten Laser mit entsprechend eingestelltem Emissionsfilter dargestellt. Die Bildgröße der aufgenommenen Bilder beträgt 1024 x 1024 oder 2048 x 2048 Pixel.

Tabelle 14: verwendete Laser und Filtereinstellungen für das LSM 710 von Zeiss

Fluorchrom	Laser (Wellenlänge)	Emissionsspektrum/ -filter
DAPI	UV-Laserdiode (405 nm)	430 - 481 nm
GFP	Multi-line-Argonlaser (488 nm)	491 - 539 nm
mCherry, PE	HeNe-Laser (543 nm)	559 - 704 nm

2.8.3 Verwendete Mikroskope

Tabelle 15: Übersicht über die verwendeten Mikroskope

Mikroskop	Hersteller	Hauptsitz
Eclipse Ts2 Inverses Routinemikroskop	Nikon	Tokio, Japan
Eclipse TE2000-S	Nikon	Tokio, Japan
Konfokales Laser Scanning Mikroskop 710	Zeiss	Oberkochen, Deutschland

2.9 Auswertung via ImageJ ®

Zur Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurde das Bildanalyseprogramm ImageJ in der Version 2.0.0 verwendet. Die Weitfeldaufnahmen wurden für Größenbestimmung verwendet. Dafür wurde den Aufnahmen ein Maßstab eingefügt und die Zellaggregate mit der Funktion „*Freehand selections*“ in ihrem Außenumfang gemessen (**Abb. 5**). Diese Werte wurden in Microsoft Excel (Version von 2019) übertragen und ein Mittelwert ermittelt.

Die Immunfluoreszenzaufnahmen wurden durch die Funktion „*Split Channels*“ in die einzelnen Farbkanäle (Kernfärbung, Färbung der KZT-Zellen, Färbung der TMM-Zellen) getrennt. Jeder Kanal wurde manuell in Helligkeit, Kontrast und Farbe bearbeitet, um mögliches Hintergrundrauschen zu minimieren und eine bestmögliche Darstellung zu erzielen. Danach wurden die Farbkanäle der KZT-Zellen und der TMM-Zellen durch die Funktion „*Merge Channels*“ wieder zusammengefügt und ein Maßstab eingefügt. Außerdem wurde ein separater „Merge“ mit allen Farbkanälen erstellt.

Um die z-Stapel einzeln darzustellen wurden die Farbkanäle ebenfalls wie oben beschrieben getrennt und separat in Helligkeit, Kontrast und Farbe bearbeitet. Anschließend wurden die Stapel, in denen keine Zellen zu sehen waren, gelöscht. Durch die Funktion „*Make Montage*“ wurden die Stapel automatisch getrennt und in einer Übersicht dargestellt. Es wurde jeweils ein „Merge“ mit den KZT-Zellen und TMM-Zellen und allen Farbkanälen erstellt.

Für die dreidimensionale Rekonstruktion der z-Stapel wurde die Funktion „*Z Project*“ verwendet.

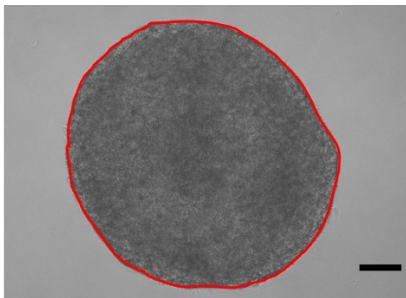


Abb. 5: Größenbestimmung der Zellaggregat: Die Zellaggregate wurden in ihrem Außenumfang gemessen; Maßstab 100 μm .

2.9.1 Verwendete Softwares und Programme

Tabelle 16: Übersicht der verwendeten Softwares zur Bildverarbeitung und -bearbeitung

Software/ Programm	Hersteller	Hauptsitz
ImageJ/ FIJI	Open Source	https://imagej.net/software/fiji/
Microsoft Excel	Microsoft Corporation	Washington, USA
NanoDrop 2000	ThermoFisher Scientific	Schwerte, Deutschland
NIS Elements Software	Nikon	Tokio, Japan
ZEN - Zeiss Efficient Navigation	Zeiss	Oberkochen, Deutschland

3 Ergebnisse

3.1 Morphologie der gewachsenen Zellaggregate in den Weitfeldaufnahmen

Die KZT-Zelllinien 2102EP und NCCIT (EK) und die KZT-Zelllinie TCam-2 (SE) wuchsen in der Monokultur im „Hanging Drop“ in Form eines kugelförmigen Sphäroids (**Abb. 6**). Die CK-Zelllinien JAR und JEG-3 wuchsen zwar ebenfalls in einem Zellverbund, allerdings mit kleinen abgerundeten Ausläufern, die visuell Pseudopodien ähneln (**Abb. 6**). Unter den TMM-Zelllinien waren nur die Fibroblasten MPAF in der Lage in Form eines Sphäroids zu wachsen (**Abb. 6**). Die THP-1-diff. M2 Makrophagen, JURKAT- und HUVEC-Zelllinien bildeten nur einen losen Zellverbund ohne scharfe Ränder (**Abb. 6**). Die Fähigkeit als kugelförmiges Sphäroid zu wachsen, änderte sich in den verschiedenen Ko-Kulturen (**Abb. 6**).

TCam-2 (SE) wuchs in der Ko-Kultur mit den Fibroblasten MPAF weiterhin in Form eines Sphäroids (**Abb. 6**). Auch in der Ko-Kultur mit JURKAT wuchs TCam-2 in Form eines Sphäroids, wobei hier und in der Ko-Kultur mit den THP-1-diff. M2 Makrophagen sich lose Zellen an die Außenmatrix des Zellaggregates lagerten (**Abb. 6**). In der Ko-Kultur mit HUVEC schien die SE-Zelllinie TCam-2 ihr Wachstumsverhalten nicht zu ändern (**Abb. 6**).

2102EP (EK) wuchs nur in der Ko-Kultur mit JURKAT weiterhin als Sphäroid (**Abb. 6**). In den Ko-Kulturen mit den THP-1-diff. M2 Makrophagen und HUVEC wuchsen die Zellen der 2102EP Zelllinie zwar immer noch in einem engen Zellverbund ähnlich einem Sphäroid, allerdings lagerten sich hier einige Zellen außen an das Zellaggregat an (**Abb. 6**). Am auffälligsten war dieses Phänomen in der Ko-Kultur mit den Fibroblasten MPAF zu beobachten. Hier erschien das Zellaggregat am losesten mit vielen weiten Zellausläufern (**Abb. 6**).

NCCIT (EK) war in fast allen Ko-Kulturen weiterhin in der Lage als kugelförmiges Sphäroid zu wachsen (**Abb. 6**). In der Ko-Kultur mit MPAF erschien das Zellaggregat weniger kompakt mit großen Zellausläufern (**Abb. 6**).

In der Ko-Kultur mit MPAF war JAR (CK) in der Lage als kugelförmiges Sphäroid zu wachsen (**Abb. 6**). JAR und JURKAT in der Ko-Kultur bildeten ein ähnliches Zellaggregat aus einem losen Zellverbund wie JAR in der Monokultur (**Abb. 6**). Besonders hervorzuheben sind die Ko-Kulturen zwischen JAR und den THP-1-diff. M2 Makrophagen sowie der Endothelzelllinie HUVEC. Hier veränderte sich das Wachstumsmuster komplett und ließ sich mit keiner anderen Ko-Kultur vergleichen (**Abb. 6**). Die Zellen waren hier nicht mehr in der Lage einen einheitlichen, wenn auch losen Zellverbund zu bilden. Sie wuchsen stattdessen geflechtartig.

JEG-3 (CK) wuchs in der Ko-Kultur mit MPAF und JURKAT als kugelförmiges Sphäroid (**Abb. 6**). In der Ko-Kultur mit den THP-1-diff. M2 Makrophagen und HUVEC bildeten sie ein losen annähernd runden Zellverbund (**Abb. 6**).

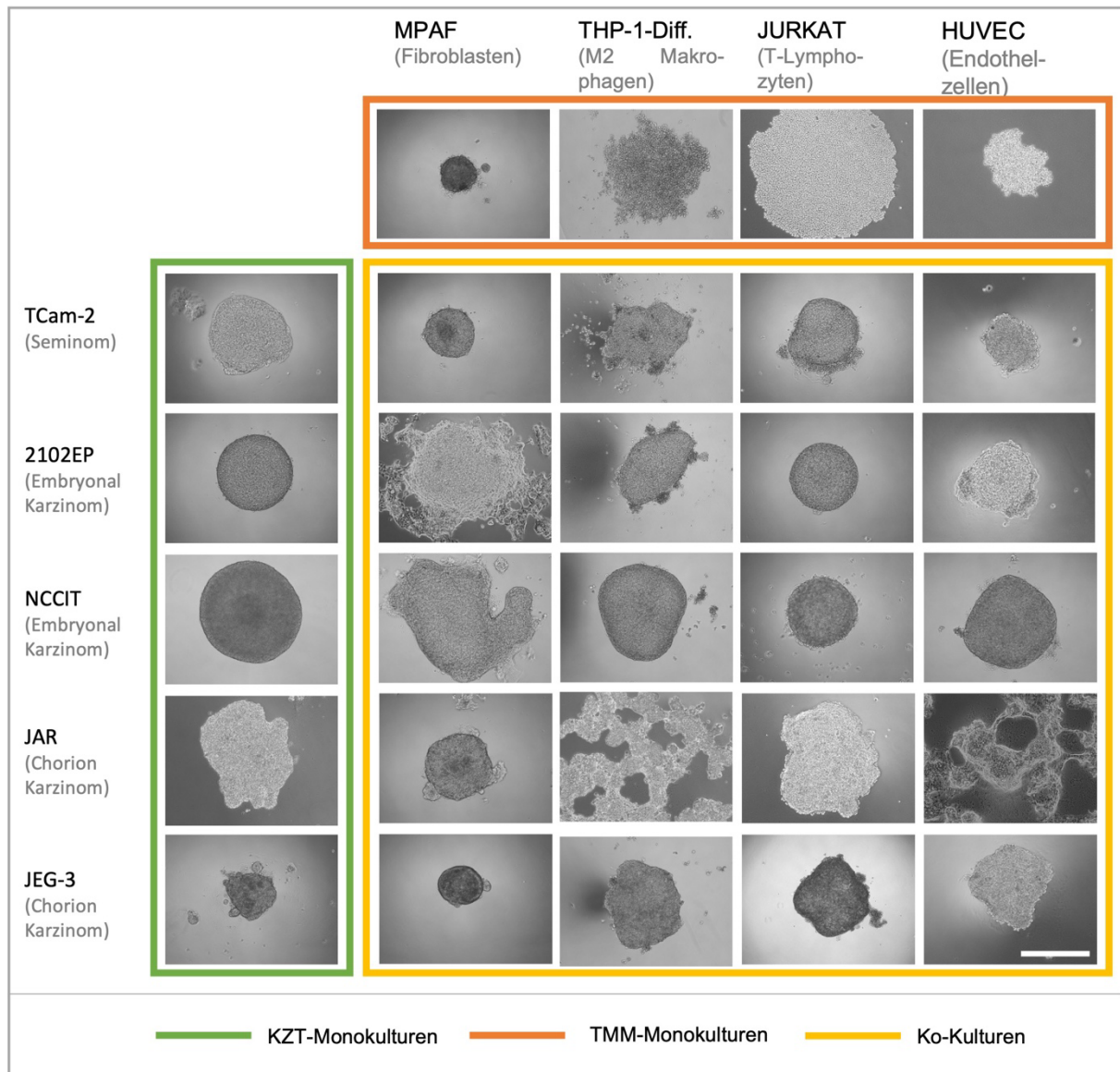


Abb. 6: Weitfeldaufnahmen der unterschiedlichen KZT- und TMM-Zelllinien im „Hanging-Drop“ Modell. Dargestellt sind sowohl die einzelnen KZT- (TCam-2, NCCIT, 2102EP, JAR, JEG-3) (grün) und TMM-Monokulturen (MPAF, THP-1-diff. M2 Makrophagen, JURKAT, HUVEC) (orange) als auch die daraus resultierenden Ko-Kulturen (Gelb) nach 72h Kultivierung im „Hanging Drop“. Die Aufnahmen wurden mit einem „Plan Fluor 10x/0.30“-Objektiv und einem Phasenkontrast von Ph1 aufgenommen. Der Maßstab entspricht 250 µm.

3.2 Größe der gewachsenen Zellaggregate

Unter den KZT-Zelllinien wies NCCIT (EK) nach 72 h im „Hanging Drop“ den größten durchschnittlichen Flächeninhalt mit $0,33 \text{ mm}^2$ auf (**Abb. 7**). Der Flächeninhalt der CK-Zelllinie JAR war mit $0,32 \text{ mm}^2$ beinahe genauso groß (**Abb. 7**). Den kleinsten Flächeninhalt unter den KZT-Zelllinien zeigte JEG-3 (CK) (**Abb. 7**).

Wie die zuvor dargestellten lichtmikroskopischen Aufnahmen bereits vermuten ließen, hatte die T-Lymphozyten JURKAT unter den TMM-Zelllinien den größten durchschnittlichen Flächeninhalt mit $0,81 \text{ mm}^2$ (**Abb. 6** und **Abb. 7**). Die Fibroblasten MPAF wiesen das kompakteste Wachstum und damit den kleinsten Flächeninhalt unter den TMM-Zelllinien mit $0,09 \text{ mm}^2$ auf (**Abb. 7**).

Auffällig war, dass bei beiden EK-Zelllinien die Ko-Kultur mit MPAF den jeweils größten Flächeninhalt im Vergleich zu den Ko-Kulturen mit den anderen TMM-Zelllinien erzeugten (**Abb. 7**). Die Ko-Kulturen zwischen MPAF und der SE-Zelllinie TCam-2 und den CK-Zelllinien JAR und JEG-3 führte zu dem kleinsten Flächeninhalt unter den jeweiligen Ko-Kulturen (**Abb. 7**).

Im Vergleich mit allen anderen ausgemessenen Zellaggregaten hatte die Ko-Kultur aus JAR und den THP-1-diff. M2 Makrophagen den größten Flächeninhalt mit $0,95 \text{ mm}^2$ (**Abb. 7**). Diese Beobachtung entspricht den zuvor gezeigten mikroskopischen Aufnahmen, die zeigen, dass diese Ko-Kultur als großflächiges Geflecht wuchs (**Abb. 6**). Auch bei der CK-Zelllinie JEG-3 führte die Ko-Kultivierung mit den THP-1-diff. M2 Makrophagen zu dem größten Flächeninhalt im Vergleich zu den Ko-Kulturen mit den anderen TMM-Zelllinien (**Abb. 7**).

Den kleinsten durchschnittlichen Flächeninhalt mit $0,08 \text{ mm}^2$ hatte die Ko-Kultur aus der CK-Zelllinie JEG-3 und der Fibroblasten MPAF (**Abb. 7**).

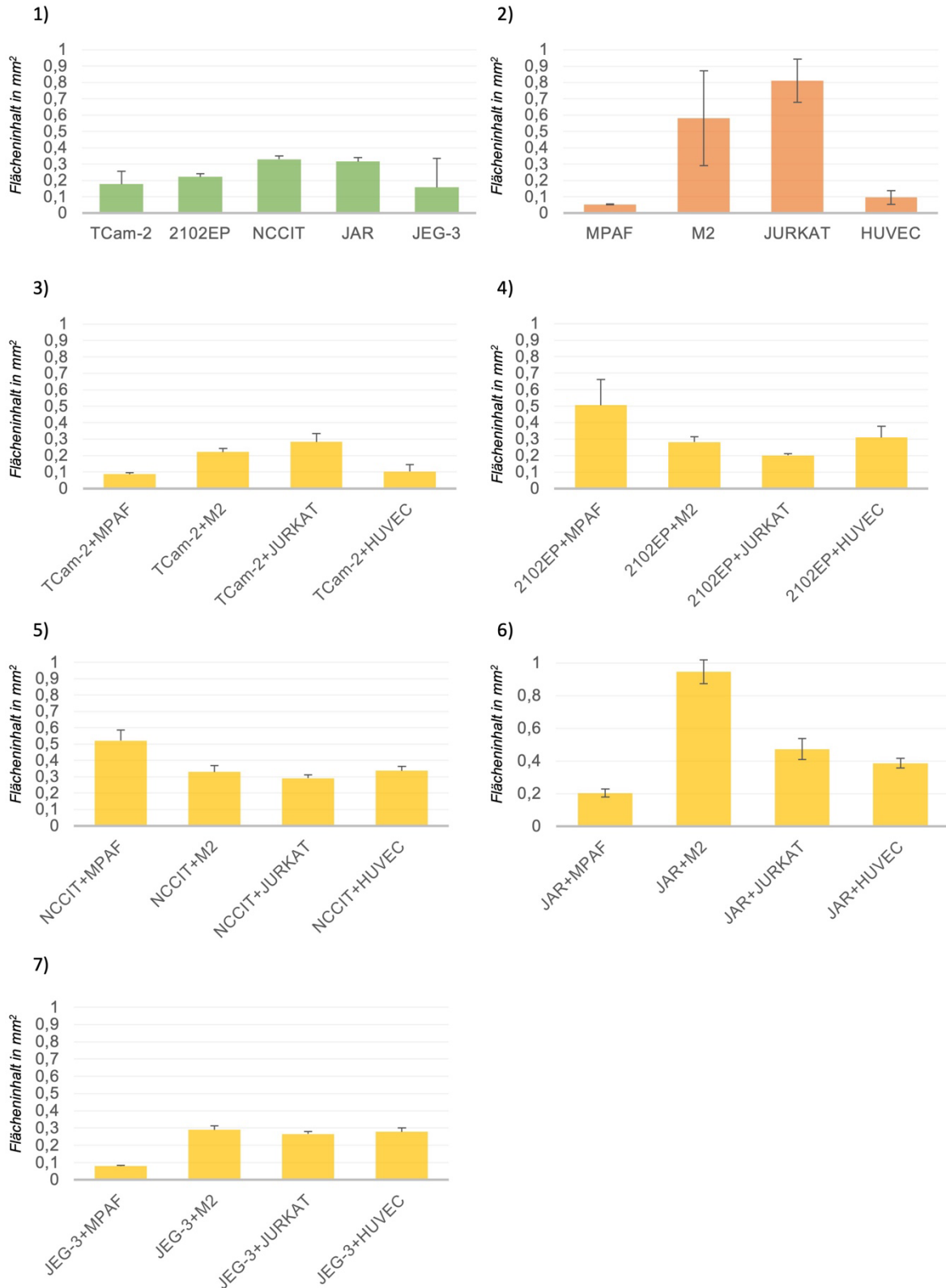


Abb. 7: Flächeninhalte der Zellaggregate in mm². Ausgemessen wurden jeweils 6 Zellaggregate (n=6), hieraus wurde ein Mittelwert mit entsprechender Standardabweichung berechnet. In grün sind die KZT-Zelllinien (TCam-2, 2102EP, NCCIT, JAR, JEG-3) und in orange die TMM-Zelllinien (MPAF, THP-1-diff. M2 Makrophagen, JURKAT, HUVEC) in der Monokultur dargestellt. In gelb sind KZT-TMM-Ko-Kulturen aufgeführt.

3.3 Morphologie der Zellaggregate in den Fluoreszenz-Aufnahmen

3.3.1 TCam-2-Ko-Kulturen

Die Weitfeldaufnahmen zeigen, dass die SE-Zelllinie TCam-2 in der Monokultur in der Lage war als Sphäroid zu wachsen (**Abb. 6**).

In der Ko-Kultur mit der Lymphozyten JURKAT bildeten die Zellen ebenfalls ein symmetrisches kugelförmiges Sphäroid (**Abb. 8**). Durch alle Ebenen in z-Richtung hinweg scheint es eine gleichmäßige Verteilung der TCam-2-Zellen und JURKAT-Zellen zu geben (**Abb. 9**).

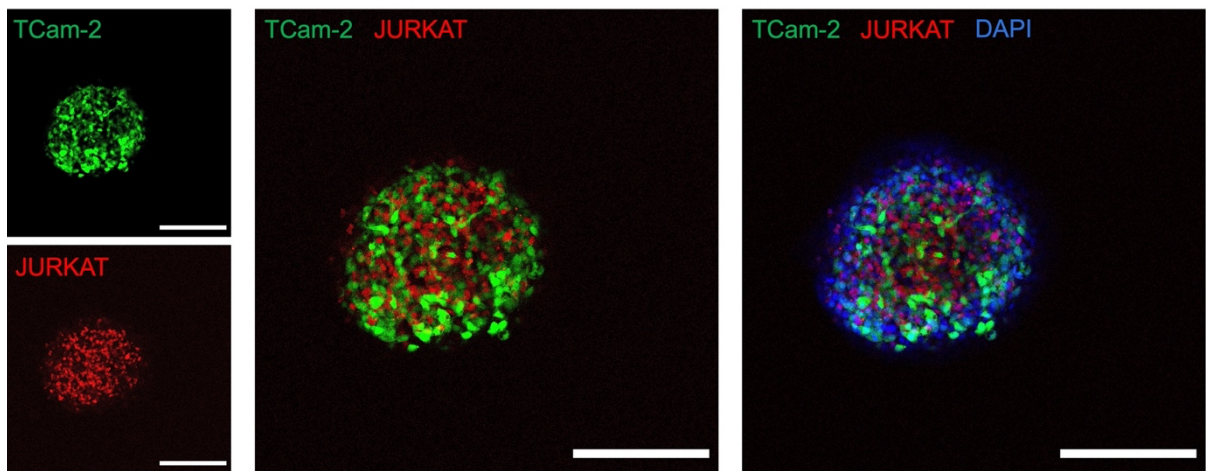


Abb. 8: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven SE-Zelllinie TCam-2 und der mCherry-positiven Lymphozyten JURKAT. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Der Maßstab entspricht 250 μm .

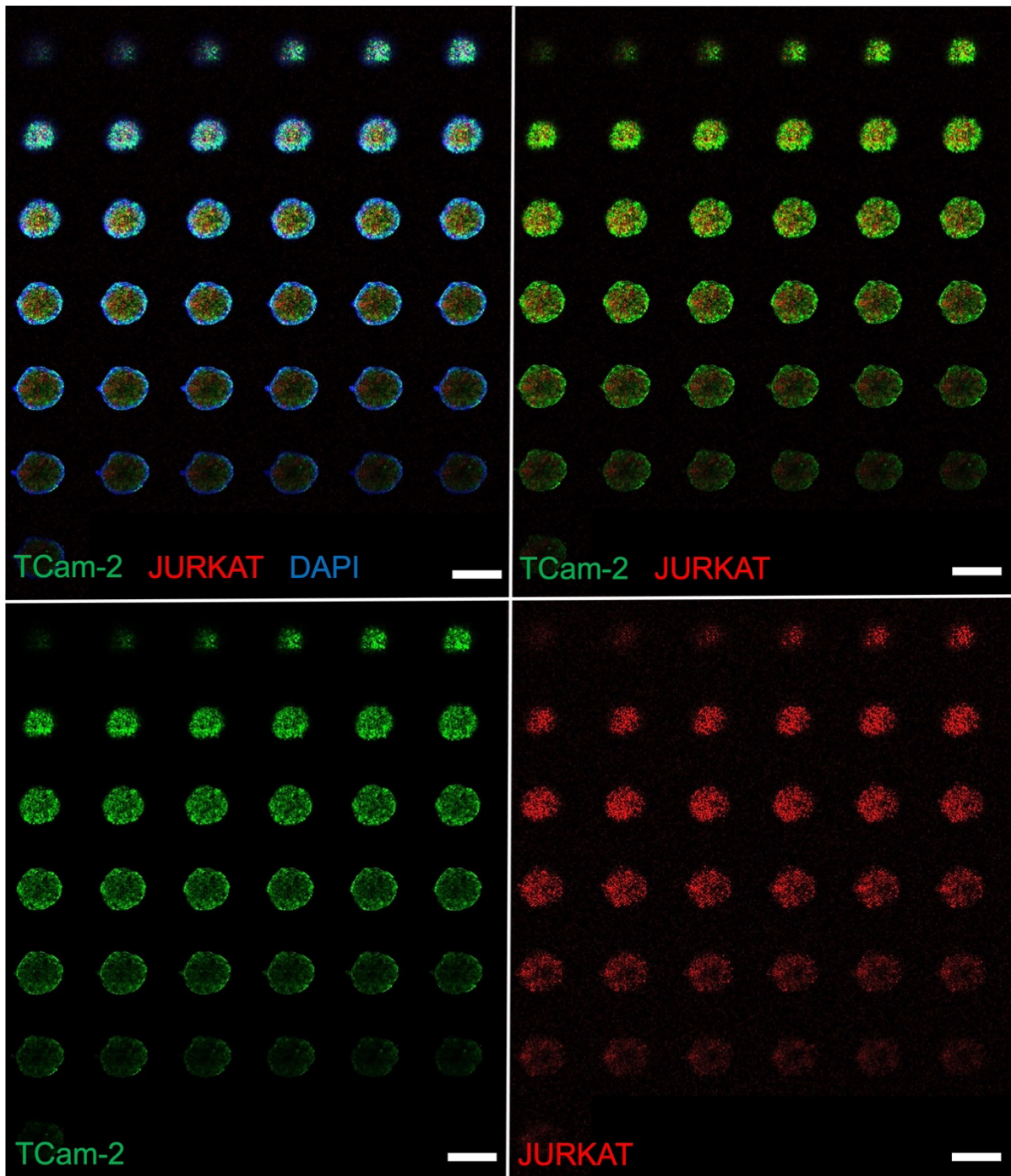


Abb. 9: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive TCam-2 und mCherry-positive JURKAT. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Die Rekonstruktion wurde mit der Software ImageJ® erstellt. Der Maßstab entspricht 500 μm .

Im Gegensatz dazu wuchsen die Zellen in der Ko-Kultur mit TCam-2 und den THP-1-diff. M2 Makrophagen nicht als symmetrisches Sphäroid (**Abb. 10**). Außerdem waren hier nur noch vereinzelte M2 Makrophagen vorhanden, die sich seitlich an das Zellaggregat anlagerten und kleinere separate Gruppen bildeten (**Abb. 11**).

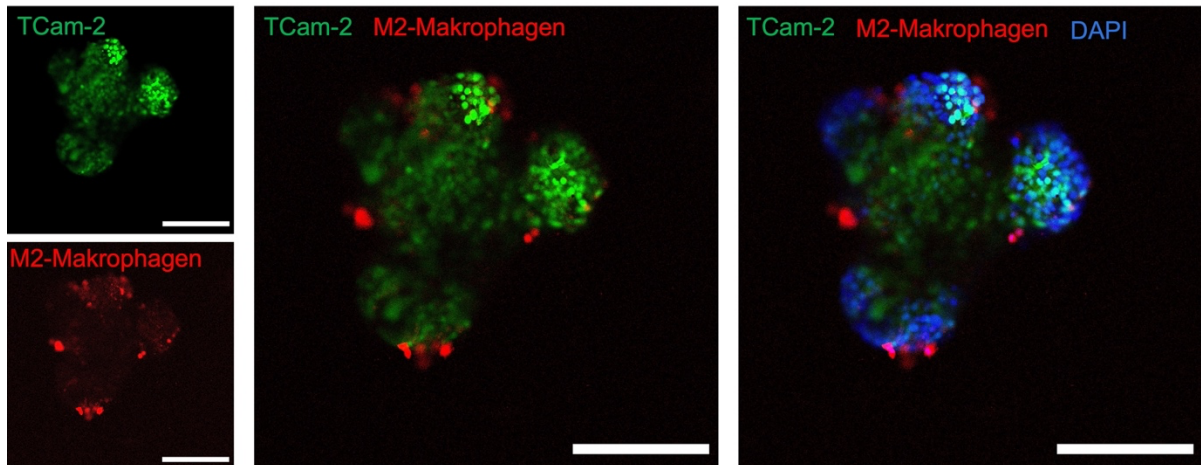


Abb. 10: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven SE-Zelllinie TCam-2 und den mCherry-positiven THP-1-diff. M2 Makrophagen. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Der Maßstab entspricht 250 μm .

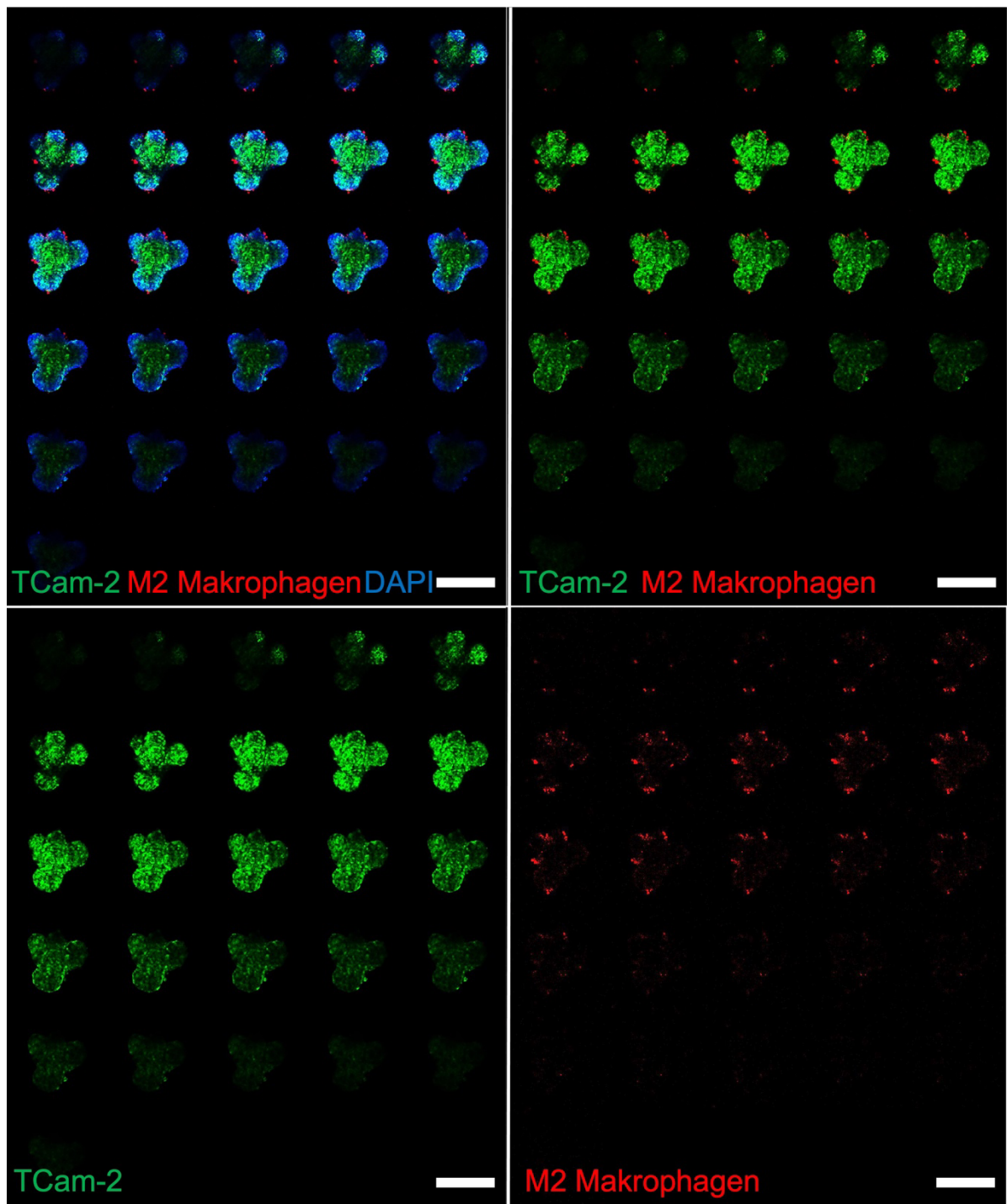


Abb. 11: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive TCam-2 und mCherry-positive THP-1-diff. M2 Makrophagen. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Die Rekonstruktion wurde mit der Software ImageJ® erstellt. Der Maßstab entspricht 500 μm .

Die Ko-Kultur mit den Fibroblasten MPAF zeigte eine annähernd kugelförmige Form, wobei sich einige der MPAF-Zellen als kleine Zellbälle außen an das Hauptaggregat anlagerten (**Abb. 12** und **Abb. 13**). Dieses Phänomen konnte allerdings bei den Weitfeldaufnahmen nicht gezeigt werden (**Abb. 6**). Innerhalb des Zellaggregates neigten die MPAF-Zellen dazu, sich zu kleinen Gruppen zusammenzuschließen und nicht einzeln das Zellaggregat zu durchsetzen wie die JURKAT-Zellen (**Abb. 13** und **Abb. 9**).

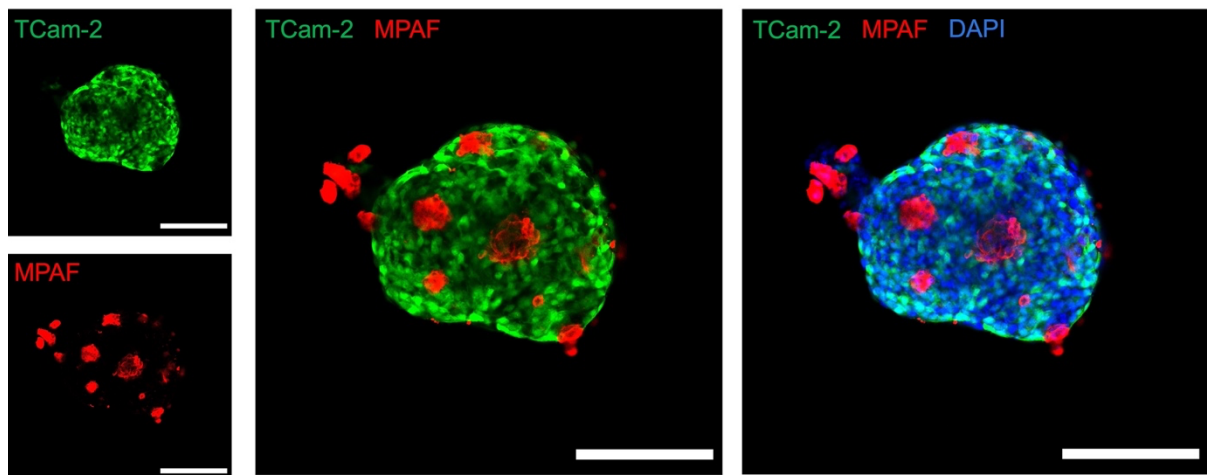


Abb. 12: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven SE-Zelllinie TCam-2 und den CD44-positiven Fibroblasten MPAF. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Der Maßstab entspricht 250 μm .

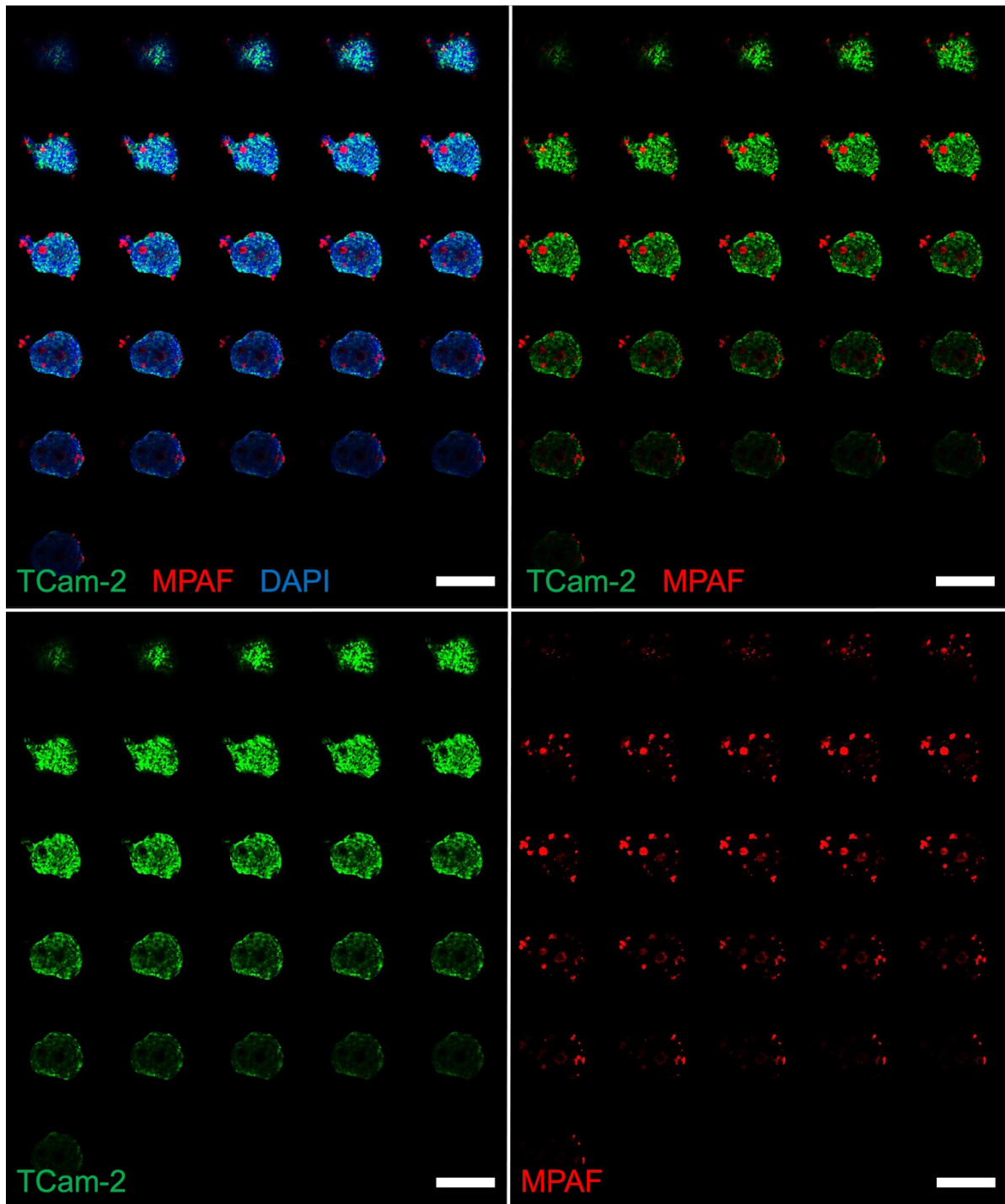


Abb. 13: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive TCam-2 und CD44-positive MPAF. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Die Rekonstruktion wurde mit der Software ImageJ® erstellt. Der Maßstab entspricht 500 μm .

In der Ko-Kultur mit den HUVEC-Zellen hatte sich zwar ein Sphäroid gebildet, allerdings wuchsen die Zellen durch alle Schichten hinweg nicht so dicht wie in den anderen TCam-2 Ko-Kulturen (**Abb. 14** und **Abb. 15**). Ähnlich wie in der Ko-Kultur mit MPAF lagerten sich die HUVEC-Zellen zu eigenen Zellverbänden zusammen, durchsetzten jedoch trotzdem das gesamte Zellaggregat wie die JURKAT-Zellen (**Abb. 15**).

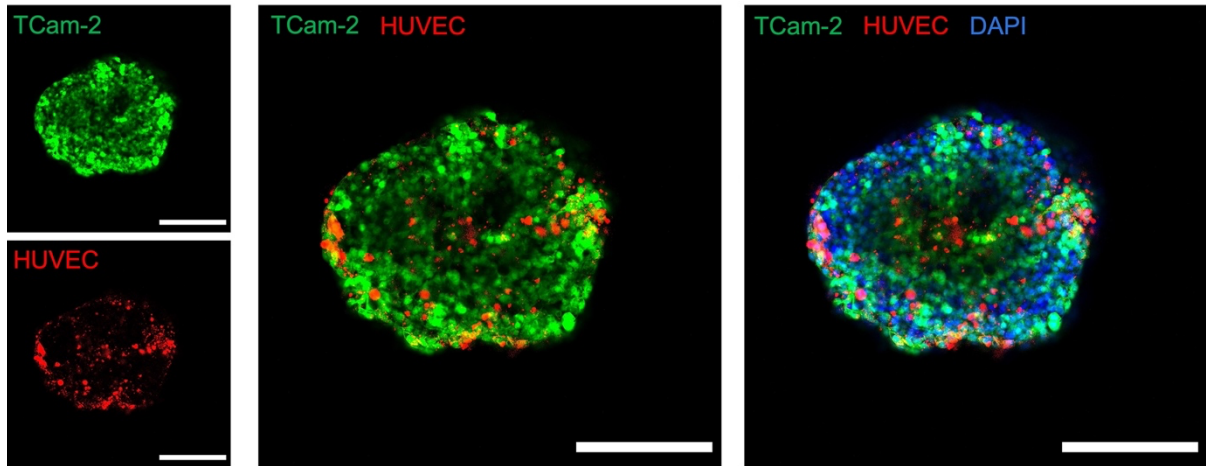


Abb. 14: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven SE-Zelllinie TCam-2 und der mCherry-positiven Endothelzelllinie HUVEC. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Der Maßstab entspricht 250 μm .

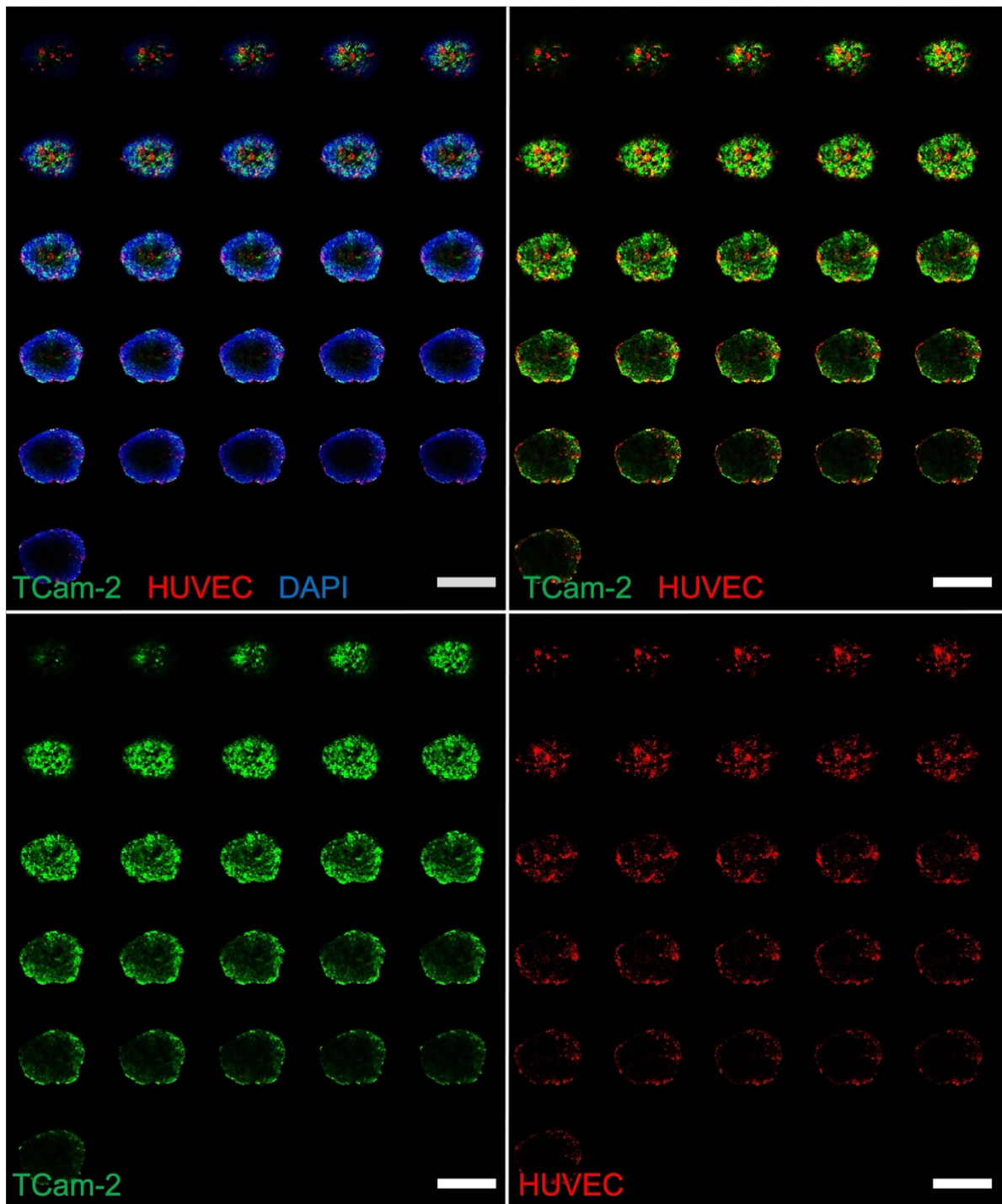


Abb. 15: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive TCam-2 und mCherry-positive HUVEC. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Die Rekonstruktion wurde mit der Software ImageJ® erstellt. Der Maßstab entspricht 500 μm .

Ergänzend festzustellen ist, dass im Vergleich zu den Ko-Kulturen mit MPAF, HUVEC und den M2 Makrophagen die JURKAT-Zellen die größte Ausprägung zeigten (**Abb. 9**, **Abb. 11**, **Abb. 13** und **Abb. 15**).

3.3.2 2102EP-Ko-Kulturen

Die EK-Zelllinie 2102EP war in der Monokultur in der Lage ein Sphäroid zu bilden (**Abb. 6**). Wie auch in der Ko-Kultur mit den TCam-2-Zellen durchsetzten auch hier die T-Lymphozyten der Zelllinie JURKAT das gesamte Zellaggregat (**Kapitel 3.3.1; Abb. 16**). Dabei schien es ebenfalls ein ähnliches Verhältnis zwischen 2102EP und JURKAT zu geben (**Abb. 17**). Außerdem waren die 2102EP-Zellen weiterhin in der Lage in der Ko-Kultur mit JURKAT ein Sphäroid zu bilden (**Abb. 16**).

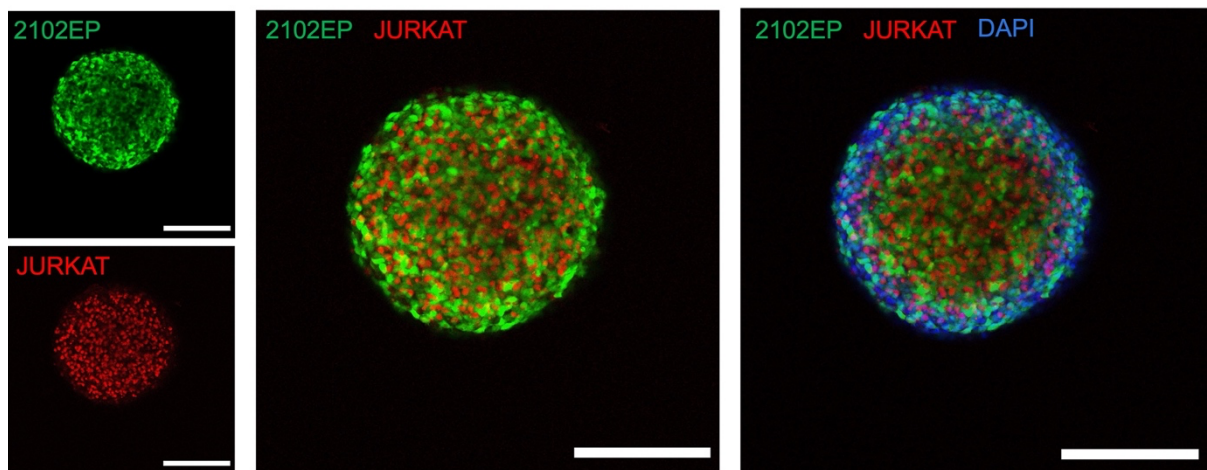


Abb. 16: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven EK-Zelllinie 2102EP und der mCherry-positiven Lymphozyten JURKAT. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Der Maßstab entspricht 250 μm .

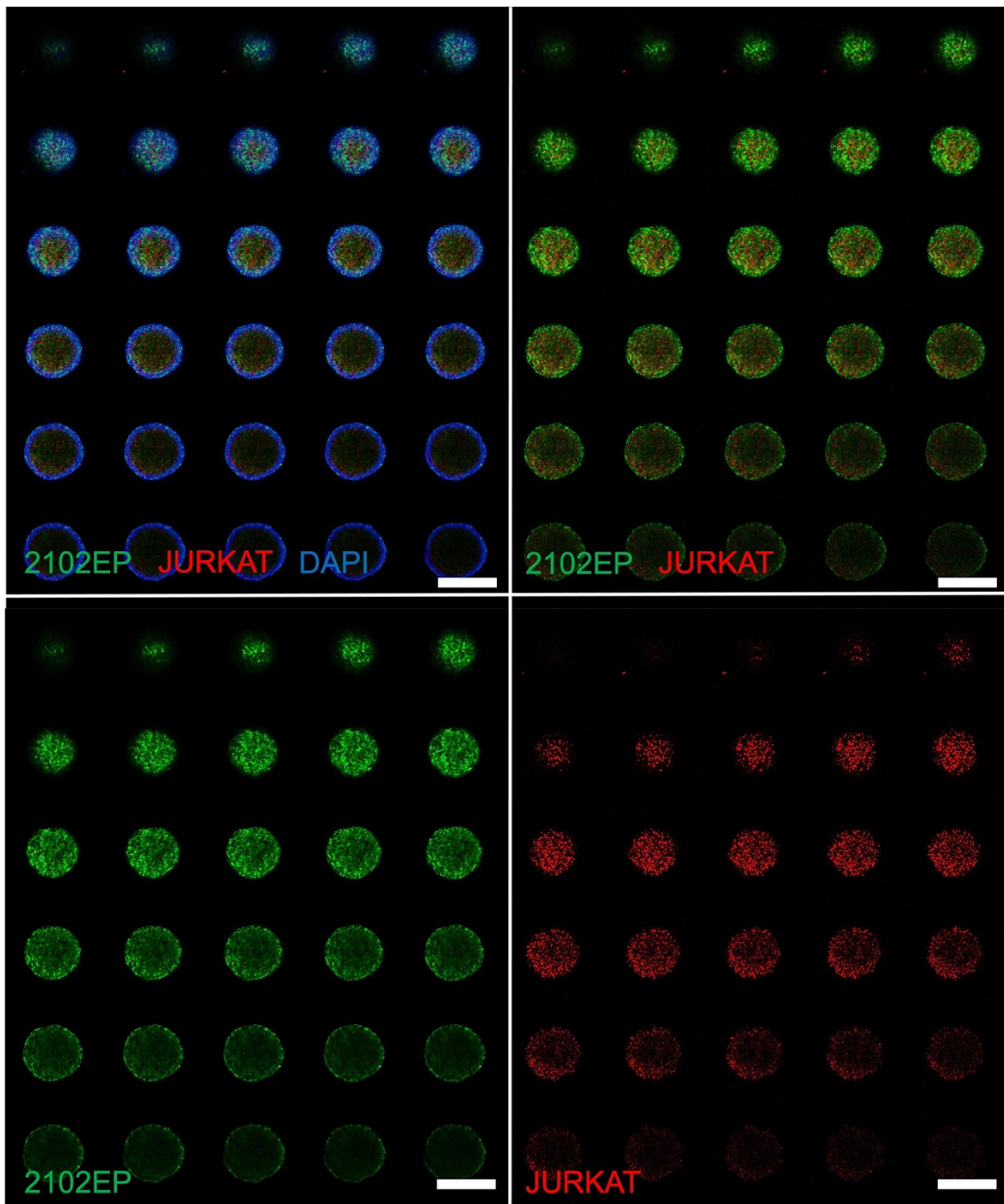


Abb. 17: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive 2102EP und mCherry-positive JURKAT. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Die Rekonstruktion wurde mit der Software ImageJ® erstellt. Der Maßstab entspricht 500 μm .

Die Ko-Kultur mit 2102EP und den THP-1-diff. M2 Makrophagen wuchs nicht in der typischen runden Sphäroidform (**Abb. 18**). Ähnlich wie bei der Ko-Kultur mit TCam-2 schien nur eine begrenzte Anzahl an M2 Makrophagen verblieben zu sein (**Kapitel 3.3.1**; **Abb. 19**). Die verbliebenen M2 Makrophagen durchsetzten anders als in der Ko-Kultur mit TCam-2 das gesamte Zellaggregat (**Abb. 11** und **Abb. 19**). Bei dem Zellaggregat, welches auf dem Weitfeldaufnahmen dargestellt ist, hatte es hingegen den Anschein, dass sich die M2 Makrophagen als separate Gruppen außen an das Zellaggregat anlagern (**Abb. 6**).

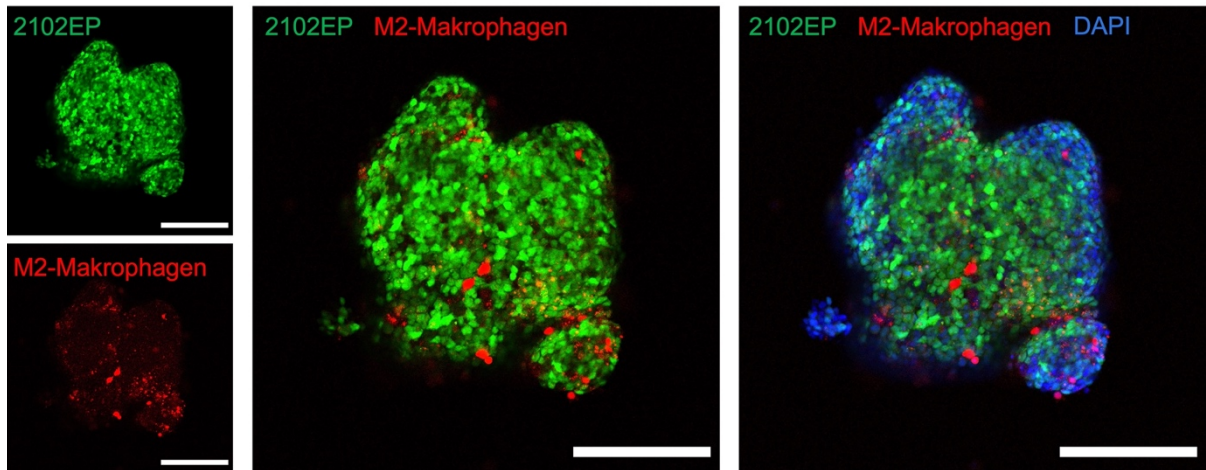


Abb. 18: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven EK-Zelllinie 2102EP und den mCherry-positiven THP-1-diff. M2 Makrophagen. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Der Maßstab entspricht 250 μm .

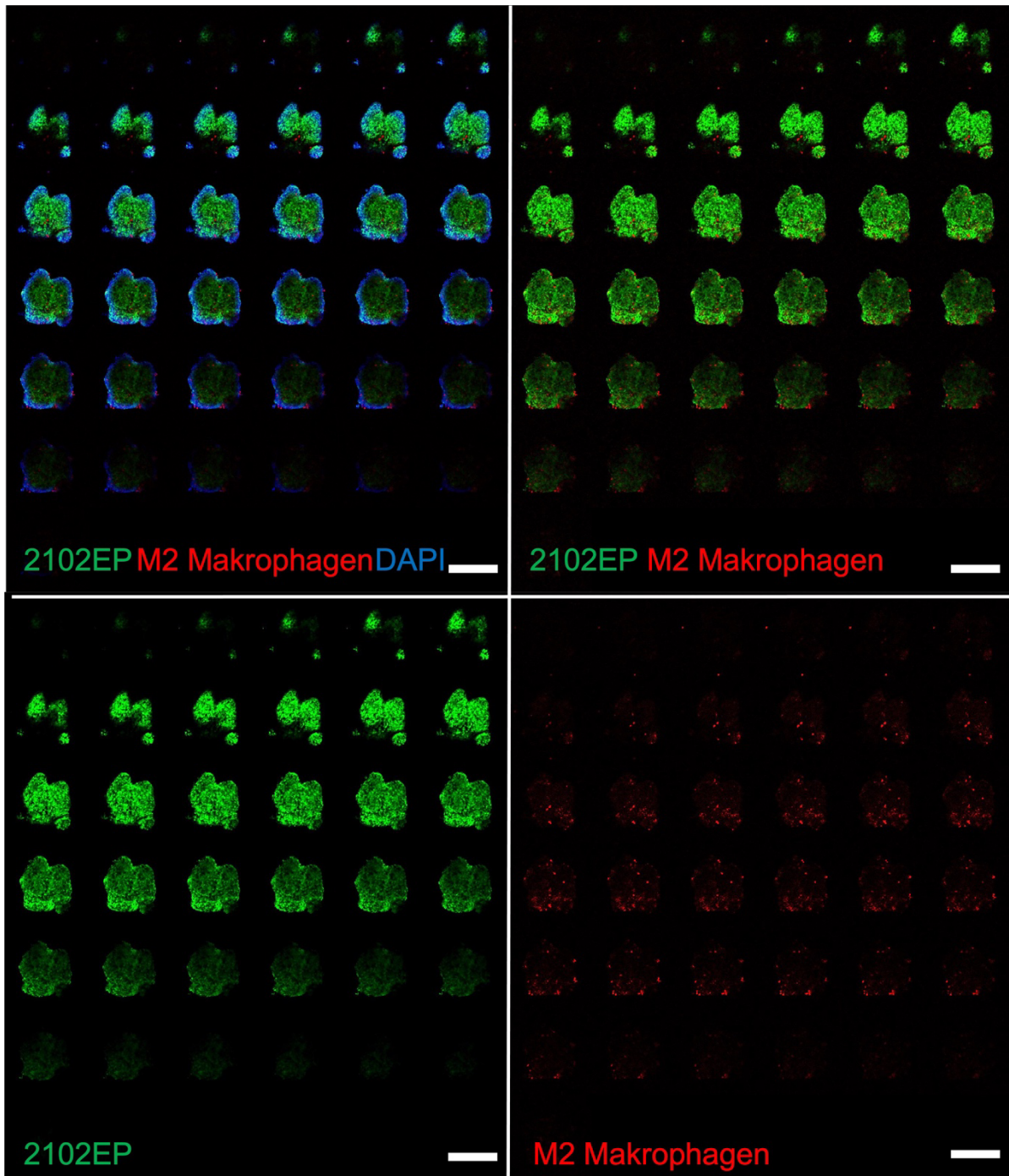


Abb. 19: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive 2102EP und mCherry-positive THP-1-diff. M2 Makrophagen. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Die Rekonstruktion wurde mit der Software ImageJ® erstellt. Der Maßstab entspricht 500 µm.

Wenn man bei der Ko-Kultur mit 2102EP und MPAF nur die 2102EP-Zellen betrachtet, erscheint das Zellaggregat annähernd in Form eines kugelförmigen Sphäroids gewachsen zu sein (**Abb. 20**). Jedoch war das Zellaggregat, welches für die Weitfeldaufnahmen verwendet wurde, deutlich weitläufiger (**Abb. 6**). Außerdem wirkte es hier so, dass sich die MPAF-Zellen vor allem außen an das Zellaggregat anlagerten. Bei Betrachtung der einzelnen Schichten fiel hingegen auf, dass sich die MPAF-Zellen im gesamten Zellaggregat befanden (**Abb. 21**). Dabei bildeten die MPAF-Zellen auch kleinere Gruppen, allerdings nicht so auffällig wie bei der Ko-Kultur mit TCam-2 (**Abb. 13** und **Abb. 21**).

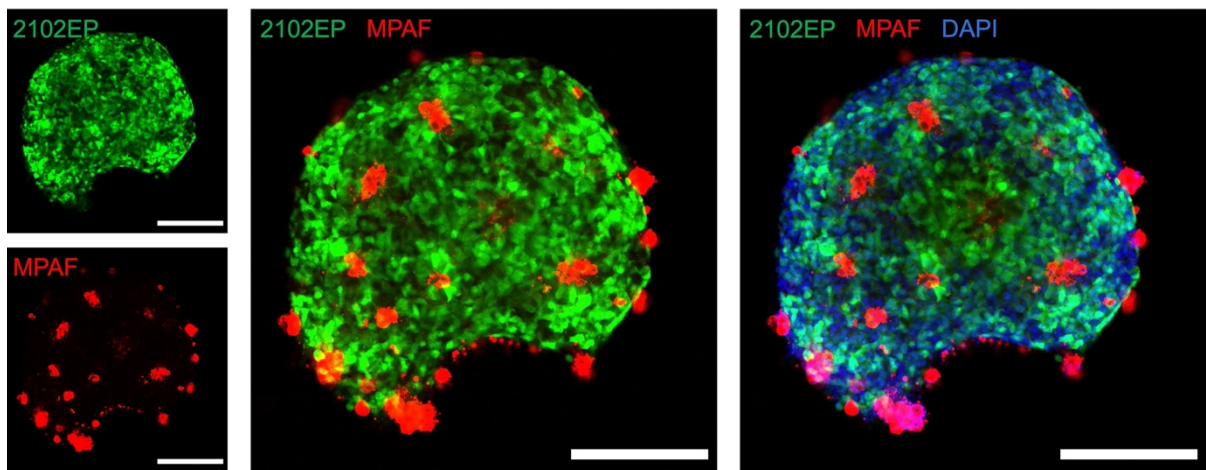


Abb. 20: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven EK-Zelllinie 2102EP und den CD44-positiven Fibroblasten MPAF. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Der Maßstab entspricht 250 μm .

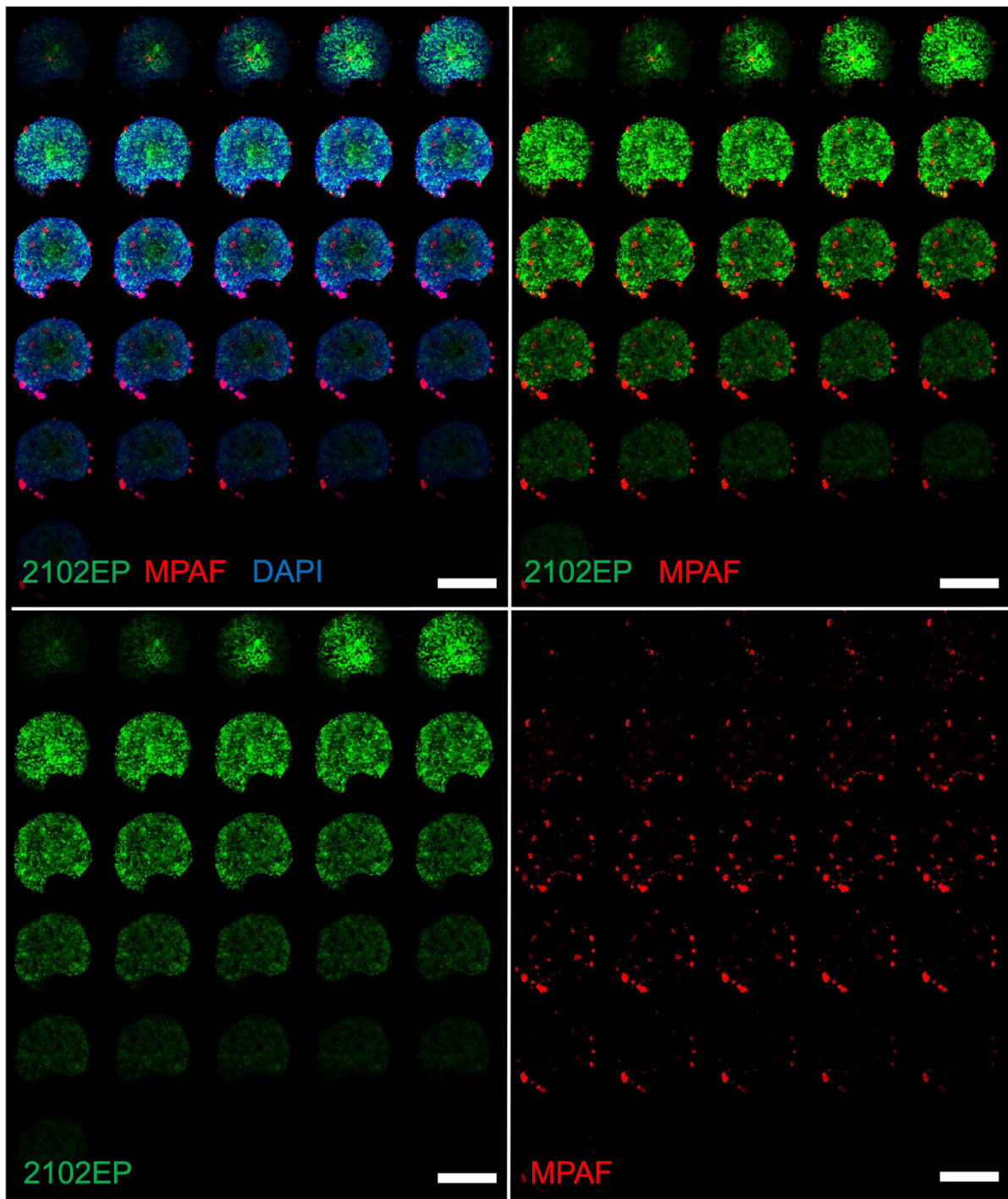


Abb. 21: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive 2102EP und CD44-positive MPAF. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Die Rekonstruktion wurde mit der Software ImageJ® erstellt. Der Maßstab entspricht 500 μm .

Die Zellen der Ko-Kultur aus 2102EP und HUVEC bildeten ein tropfenförmiges Zellaggregat (**Abb. 22**). Wie die Weitfeldaufnahme schon vermuten ließen, lagerten sich die HUVEC-Zellen vor allem außen an das Zellaggregat an (**Abb. 6** und **Abb. 23**). In den einzelnen Schichten war ebenfalls zu erkennen, dass sich vereinzelt Zellen im Zellaggregat befanden (**Abb. 23**). Das Wachstumsverhalten der HUVEC-Zellen in der Ko-Kultur mit 2102EP ähnelte dem der M2 Makrophagen in der Ko-Kultur mit 2102EP.

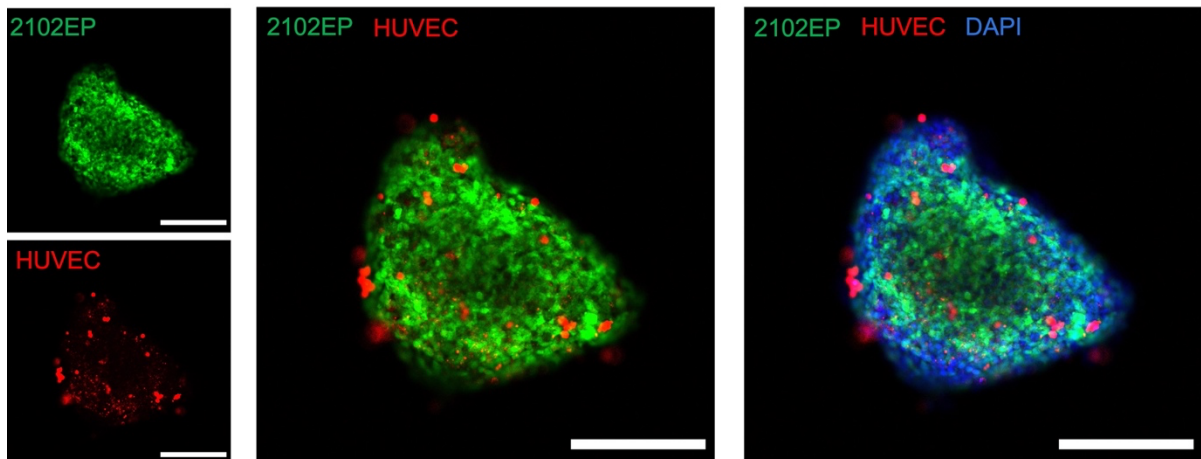


Abb. 22: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven EK-Zelllinie 2102EP und der mCherry-positiven Endothelzelllinie HUVEC. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Der Maßstab entspricht 250 μm .

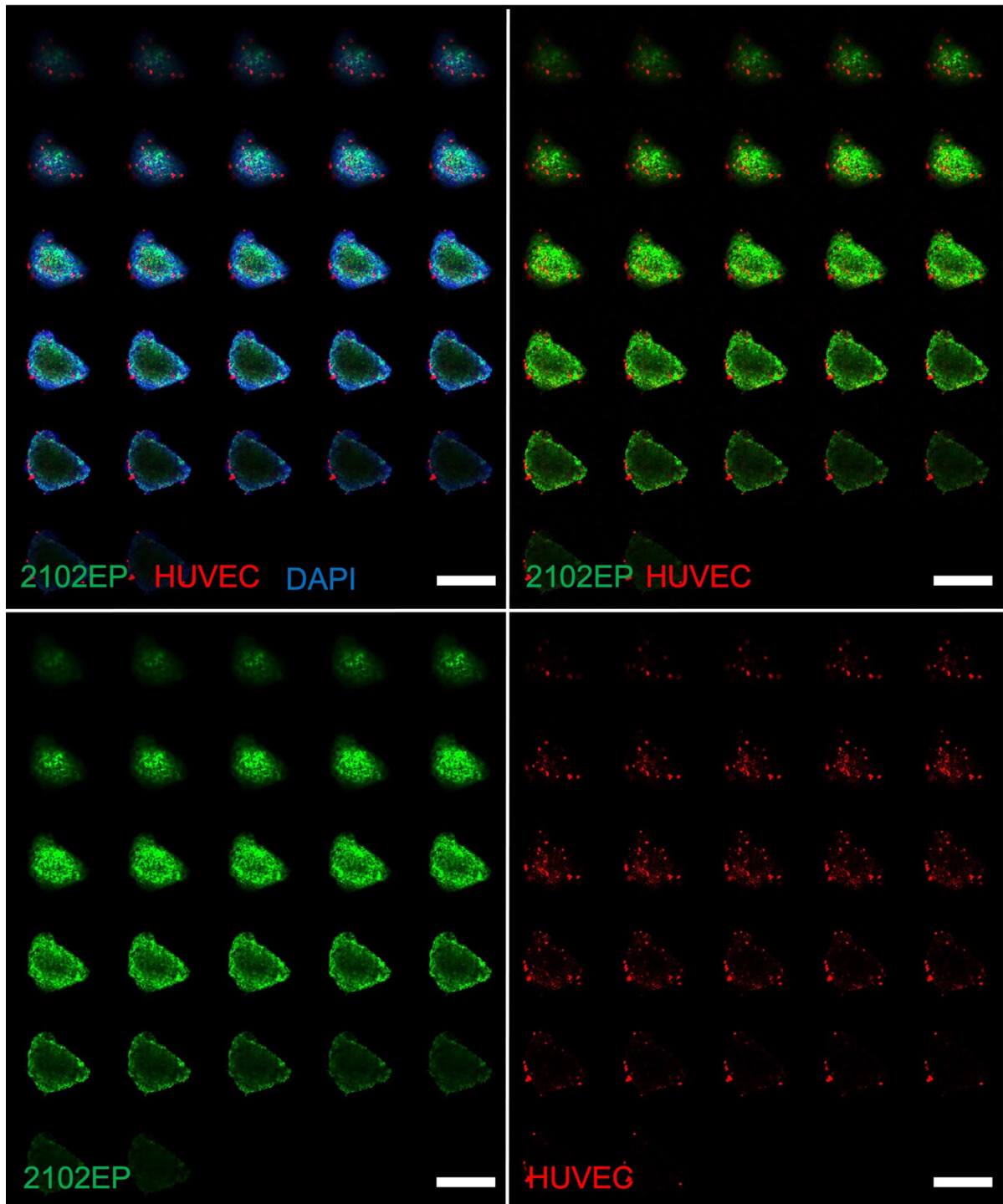


Abb. 23: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive 2102EP und mCherry-positive HUVEC. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Die Rekonstruktion wurde mit der Software ImageJ® erstellt. Der Maßstab entspricht 500 μm .

3.3.3 NCCIT-Ko-Kulturen

Die EK-Zelllinie NCCIT wuchs in der Monokultur als symmetrisches kugelförmiges Sphäroid (**Abb. 6**).

In der Ko-Kultur mit der Lymphozyten JURKAT bildeten die Zellen dieses auch weiterhin (**Abb. 24**). Dabei schienen die JURKAT-Zellen wie auch bei den zuvor beschriebenen Ko-Kulturen mit TCam-2 und 2102EP das gesamte Zellaggregat zu durchsetzen (**Kapitel 3.3.1 und 3.3.2; Abb. 25**). Bei Betrachtung der einzelnen Schichten fiel jedoch auf, dass sich die meisten JURKAT-Zellen vor allem in den oberen Schichten des Zellballes befanden (**Abb. 25**). Im Vergleich zu den Ko-Kulturen TCam-2 und JURKAT und 2102EP und JURKAT erscheint das Verhältnis der Zellen nicht gleichmäßig und eher zugunsten der NCCIT-Zellen (**Abb. 9, Abb. 17 und Abb. 25**).

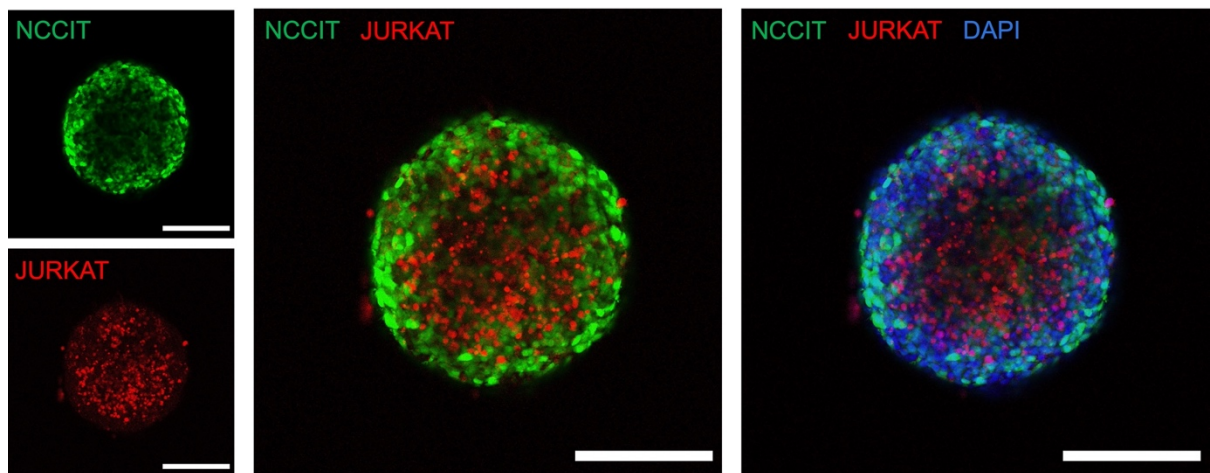


Abb. 24: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven EK-Zelllinie NCCIT und der mCherry-positiven Lymphozyten JURKAT. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Der Maßstab entspricht 250 μm .

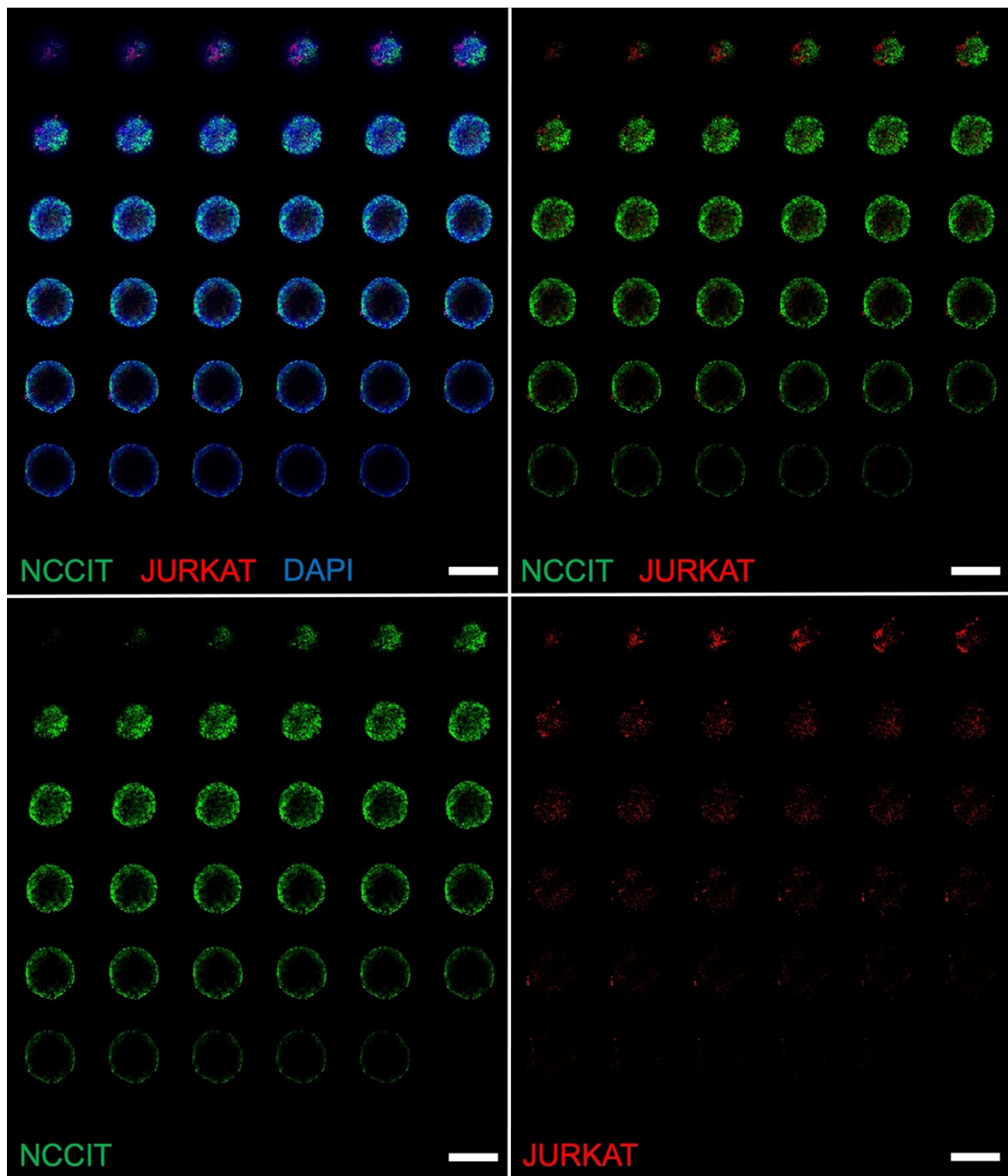


Abb. 25: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive NCCIT und mCherry-positive JURKAT. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Die Rekonstruktion wurde mit der Software ImageJ® erstellt. Der Maßstab entspricht 500 μm .

Ein besonderes Augenmerk sollte hier auf der Ko-Kultur mit den THP-1-diff. M2 Makrophagen gelegt werden (**Abb. 26**). Hier schien bis auf eine Zelle keine der M2 Makrophagen überlebt zu haben. Das Zellaggregat, welches daher beinahe ausschließlich aus NCCIT-Zellen bestand, wuchs annähernd rund (**Abb. 27**). Allerdings fiel bei der Auswertung der einzelnen Schichten auf, dass das Zellaggregat weniger dicht erschien (**Abb. 27**).

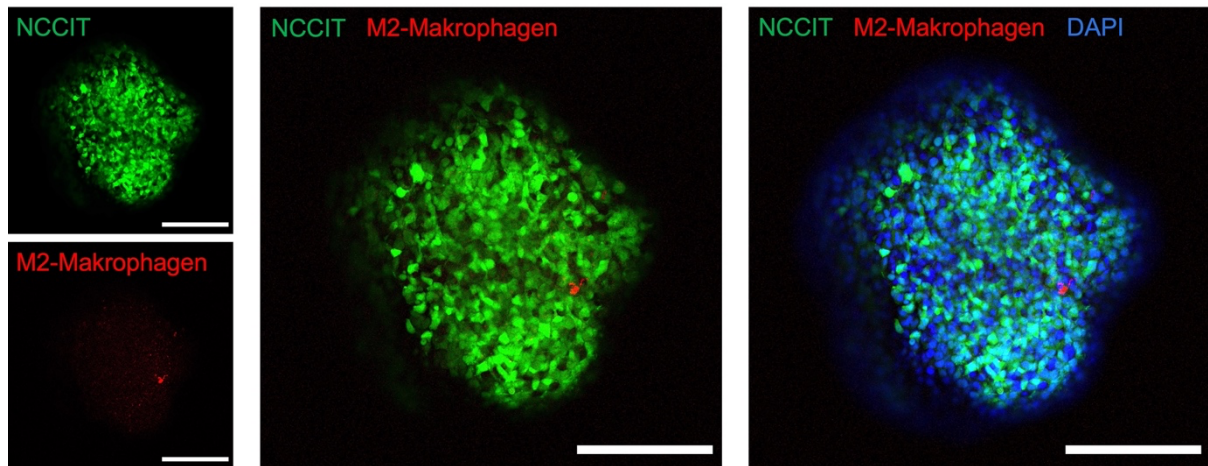


Abb. 26: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven EK-Zelllinie NCCIT und den mCherry-positiven THP-1-diff. M2 Makrophagen. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Der Maßstab entspricht 250 μm .

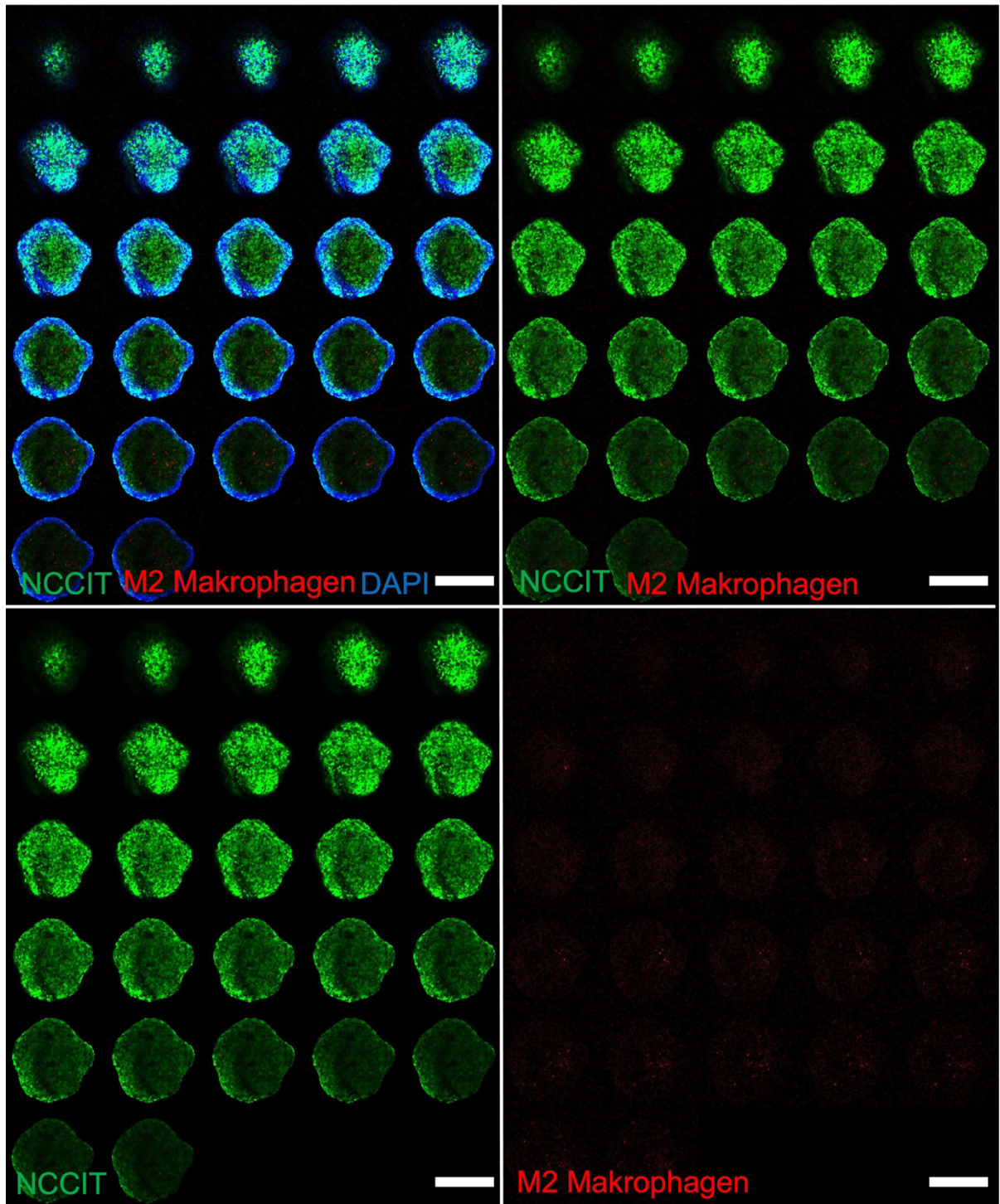


Abb. 27: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive NCCIT und mCherry-positive THP-1-diff. M2 Makrophagen. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Die Rekonstruktion wurde mit der Software ImageJ® erstellt. Der Maßstab entspricht 500 µm.

Eine weitere Besonderheit stellt die Ko-Kultur mit den Fibroblasten MPAF dar. Die Fibroblasten bildeten hier Filopodien (**Abb. 28**). Dieses Phänomen konnte in keiner anderen Ko-Kultur beobachtet werden. Das entstandene Zellaggregat wuchs nicht als rundes Sphäroid (**Abb. 28** und **Abb. 29**). Die MPAF-Zellen fanden sich in allen Schichten vor allem am äußeren Rand des Zellaggregates (**Abb. 29**).

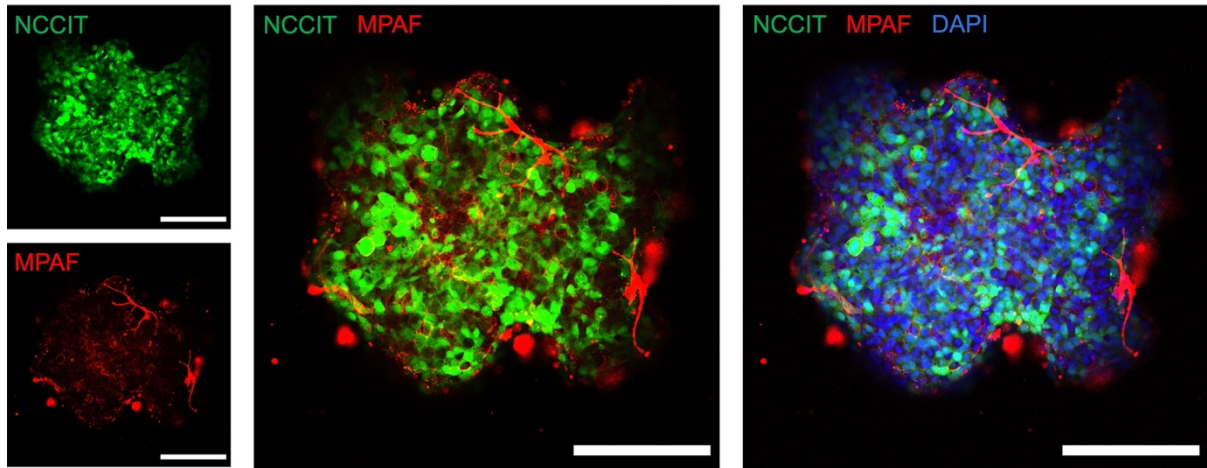


Abb. 28: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven EC-Zelllinie NCCIT und den CD44-positiven Fibroblasten MPAF. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Der Maßstab entspricht 250 μm .

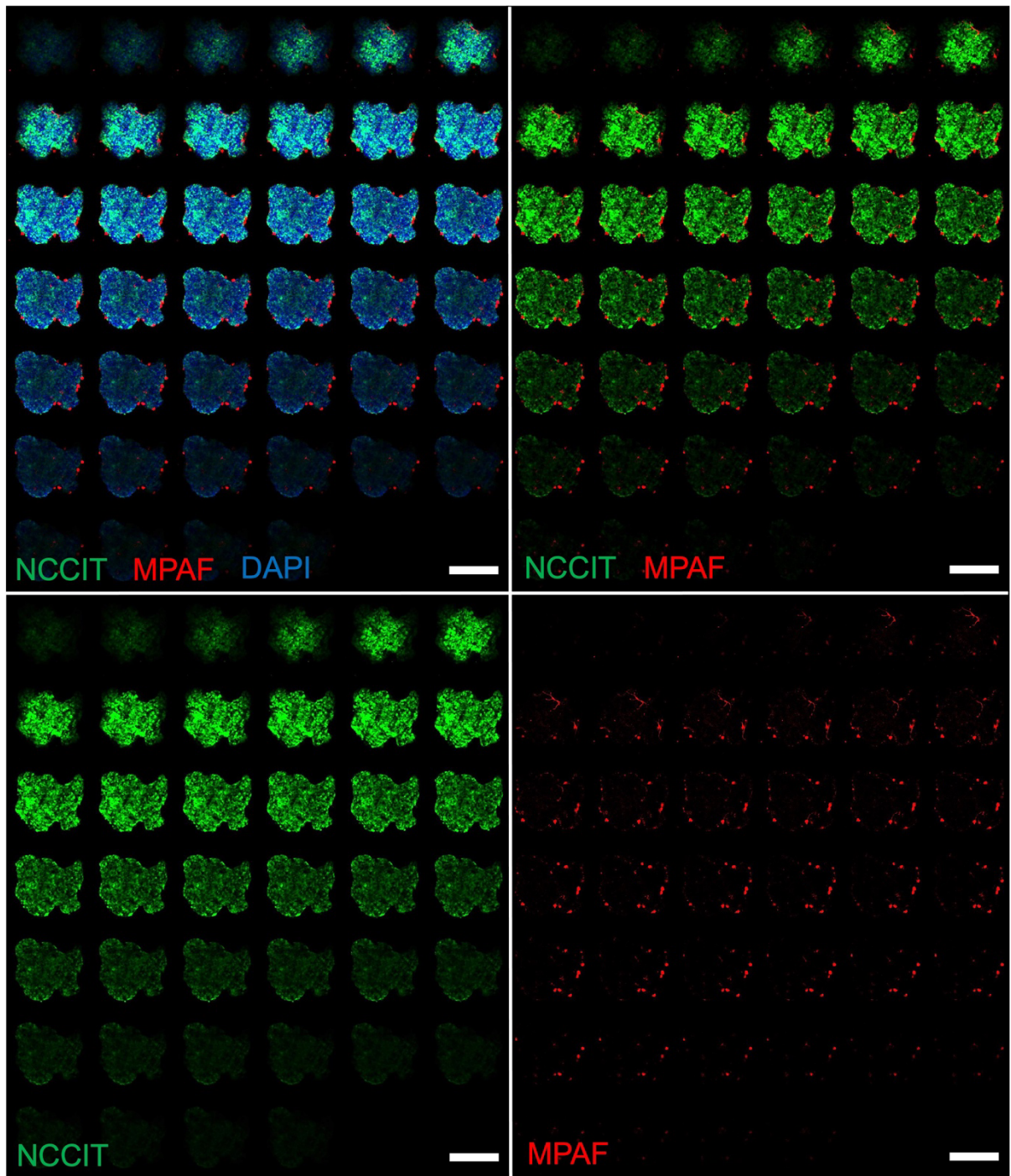


Abb. 29: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive NCCIT und CD44-positive MPAF. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Die Rekonstruktion wurde mit der Software ImageJ® erstellt. Der Maßstab entspricht 500 μm .

Das Zellaggregat der Ko-Kultur NCCIT und HUVEC wuchs als Sphäroid (**Abb. 30**). Die Endothelzellen der Zelllinie HUVEC bildeten drei kleinere Gruppen, die sich an der Außenseite des Zellaggregates befanden (**Abb. 31**).

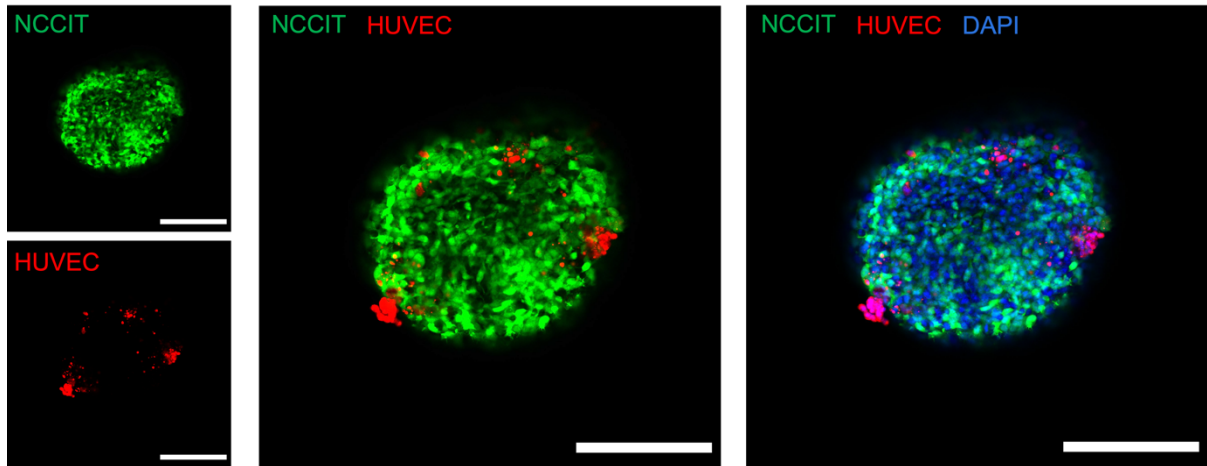


Abb. 30: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven EK-Zelllinie NCCIT und der mCherry Endothelzelllinie HUVEC. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Der Maßstab entspricht 250 μm .

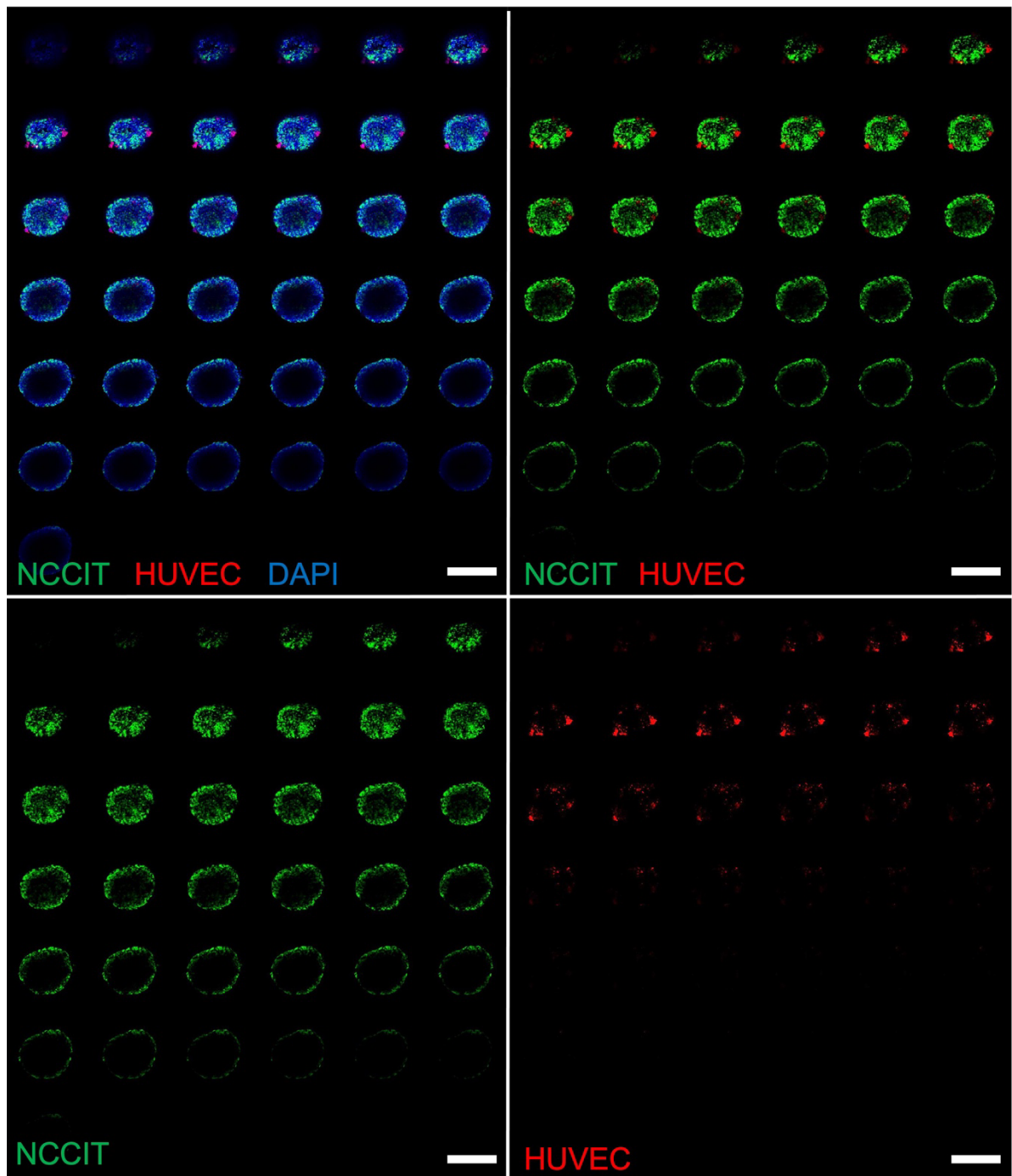


Abb. 31: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive NCCIT und mCherry-positive HUVEC. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Die Rekonstruktion wurde mit der Software ImageJ® erstellt. Der Maßstab entspricht 500 μm .

Die Weitfeldaufnahmen ließen bereits vermuten, dass sich die Morphologie der NCCIT Zellaggregate nur in der Ko-Kultur mit MPAF veränderte (**Kapitel 3.1**). Zusätzlich war jedoch auffällig, dass im Vergleich mit den Ko-Kulturen von TCam-2 und 2102EP alle TMM-Zellen eine geringere Ausprägung aufwiesen.

3.3.4 JAR-Ko-Kulturen

Die Zellen der CK-Zelllinie JAR waren in der Mono-Kultur nur in der Lage einen losen Zellverbund zu schließen und bildeten kein klassisches Sphäroid (**Abb. 6**).

In der Ko-Kultur mit der Lymphozyten JURKAT wuchsen die Zellen ebenfalls nicht in Form eines Sphäroides (**Abb. 32**). Im Vergleich mit den zuvor beschriebenen Ko-Kulturen der SE- und EK-Zelllinien waren nur noch wenige der JURKAT-Zellen vorhanden (**Kapitel 3.3.1, 3.3.2 und 3.3.3; Abb. 33**).

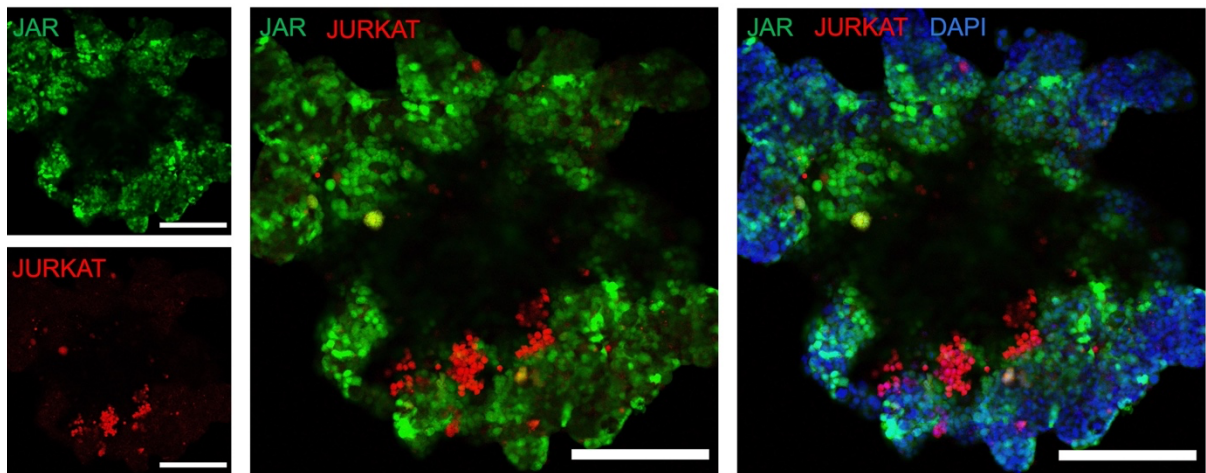


Abb. 32: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven CK-Zelllinie JAR und der mCherry-positiven Lymphozyten JURKAT. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Der Maßstab entspricht 250 μm .

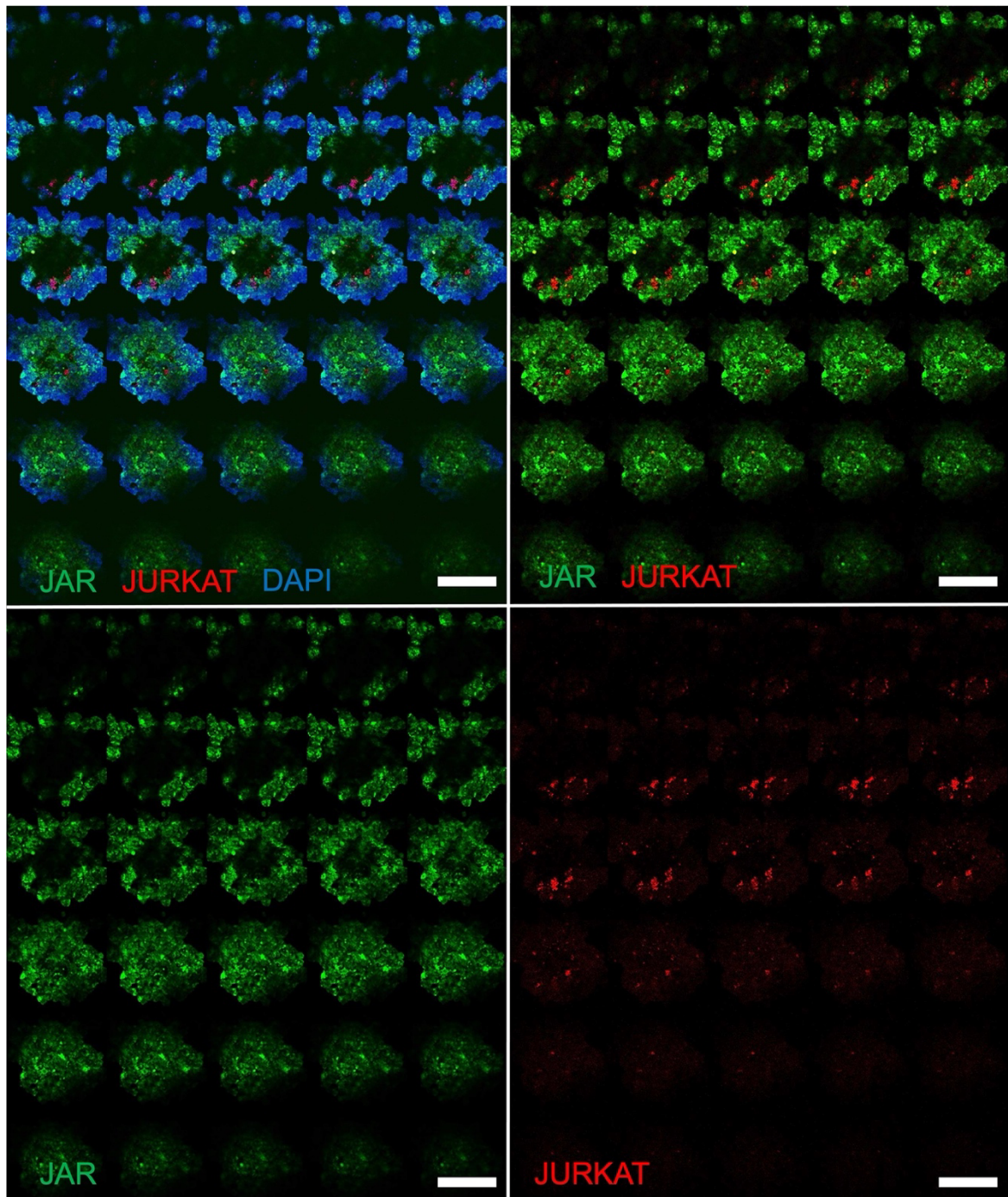


Abb. 33: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive JAR und mCherry-positive JURKAT. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Die Rekonstruktion wurde mit der Software ImageJ® erstellt. Der Maßstab entspricht 500 μm .

Die Weitfeldaufnahmen haben bereits gezeigt, dass sich das Wachstumsverhalten der JAR-Zellen in der Ko-Kultur mit den THP-1-diff. M2 Makrophagen stark veränderte (**Kapitel 3.1; Abb. 6**). Diese Ko-Kultur bildete ein großes Geflecht, welches nicht vollständig mit dem 10xair/NA0.45-Objektiv dargestellt werden konnte (**Abb. 34**). Das entsprach den Beobachtungen zur Größe der entstandenen Zellaggregate, die zeigten, dass diese Ko-Kultur den größten durchschnittlichen Flächeninhalt gebildet hatte (**Kapitel 3.2**). Ebenfalls auffällig war, dass im Vergleich zu den bereits beschriebenen Ko-Kulturen noch eine große Anzahl der M2 Makrophagen vorhanden war (**Kapitel 3.3.1, 3.3.2 und 3.3.3; Abb. 35**). Dabei durchsetzten die M2 Makrophagen alle Schichten und Bereiche des Geflechtes (**Abb. 35**).

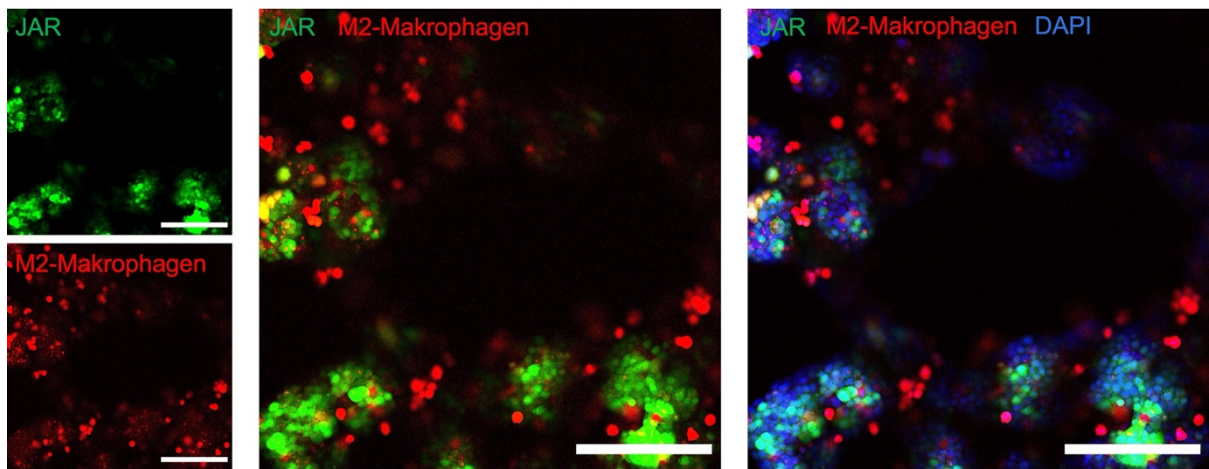


Abb. 34: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven CK-Zelllinie JAR und den mCherry-positiven THP-1-diff. M2 Makrophagen. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Der Maßstab entspricht 250 μm .

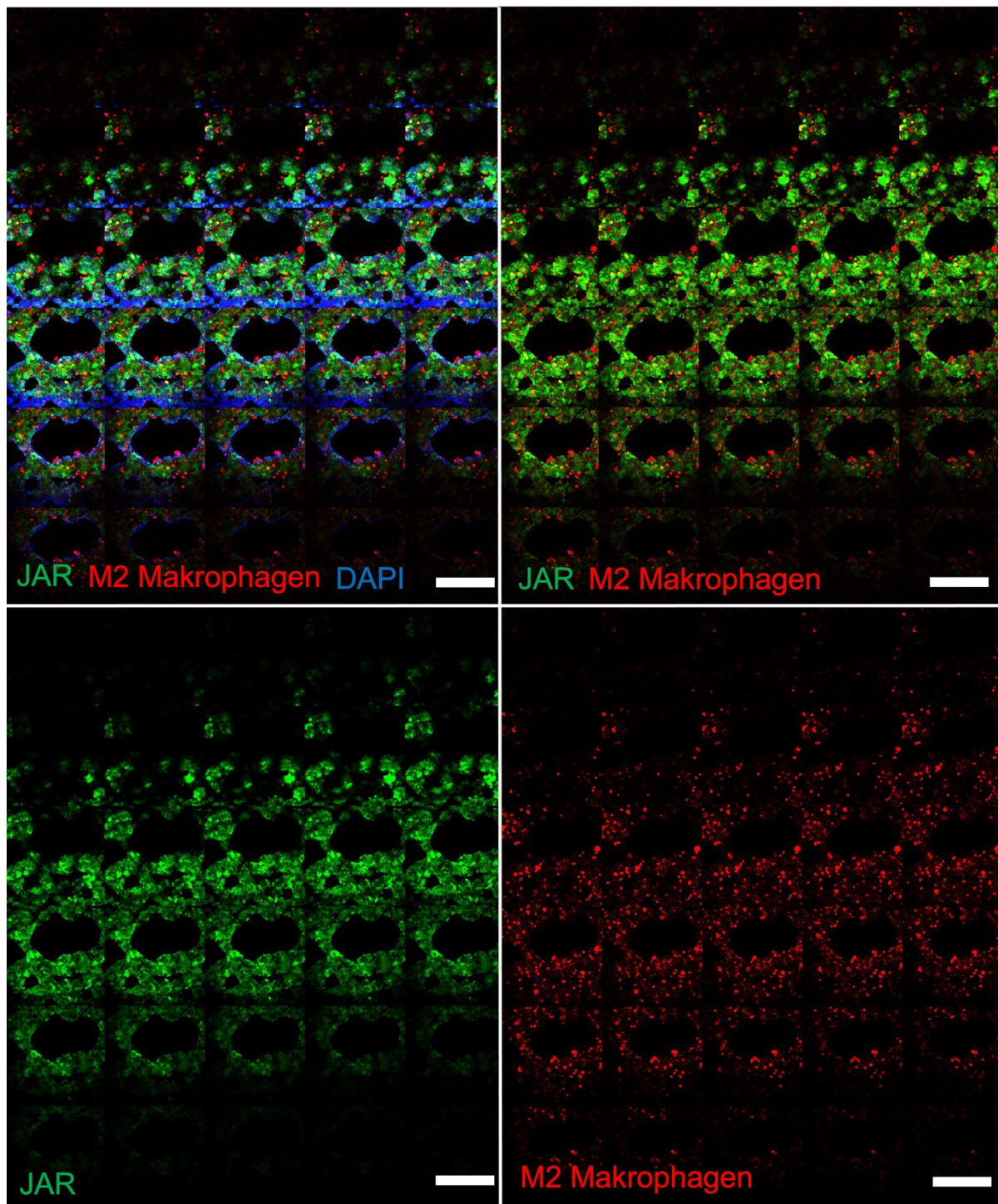


Abb. 35: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive JAR und mCherry-positive THP-1-diff. M2 Makrophagen. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Die Rekonstruktion wurde mit der Software ImageJ® erstellt. Der Maßstab entspricht 500 μm .

Die Zellen der Ko-Kultur aus JAR und MPAF wuchsen in einem engen Zellverbund (**Abb. 36**). Auch hier wirkte das Zellaggregat leicht geflechtartig (**Abb. 37**). Das Zellaggregat, welches für die Weitfeldaufnahmen verwendet wurde, zeigte hingegen die Form eines Sphäroids (**Abb. 6**). Die MPAF-Zellen waren in allen Schichten vorhanden und bildeten wie auch bereits auch bei anderen Ko-Kulturen kleinere Zellzusammenlagerungen (**Abb. 37**).

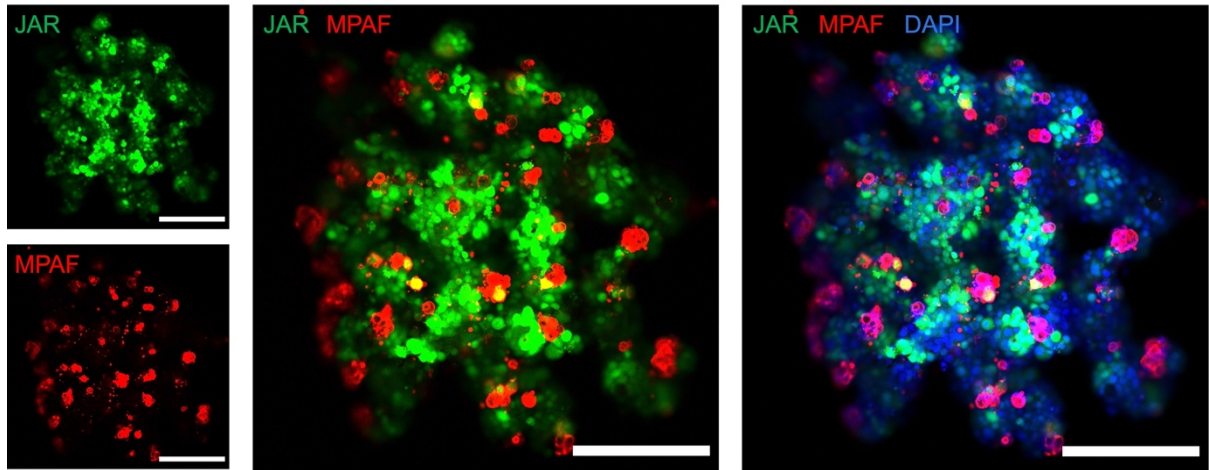


Abb. 36: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven CK-Zelllinie JAR und den CD44-positiven Fibroblasten MPAF. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Der Maßstab entspricht 250 μm .

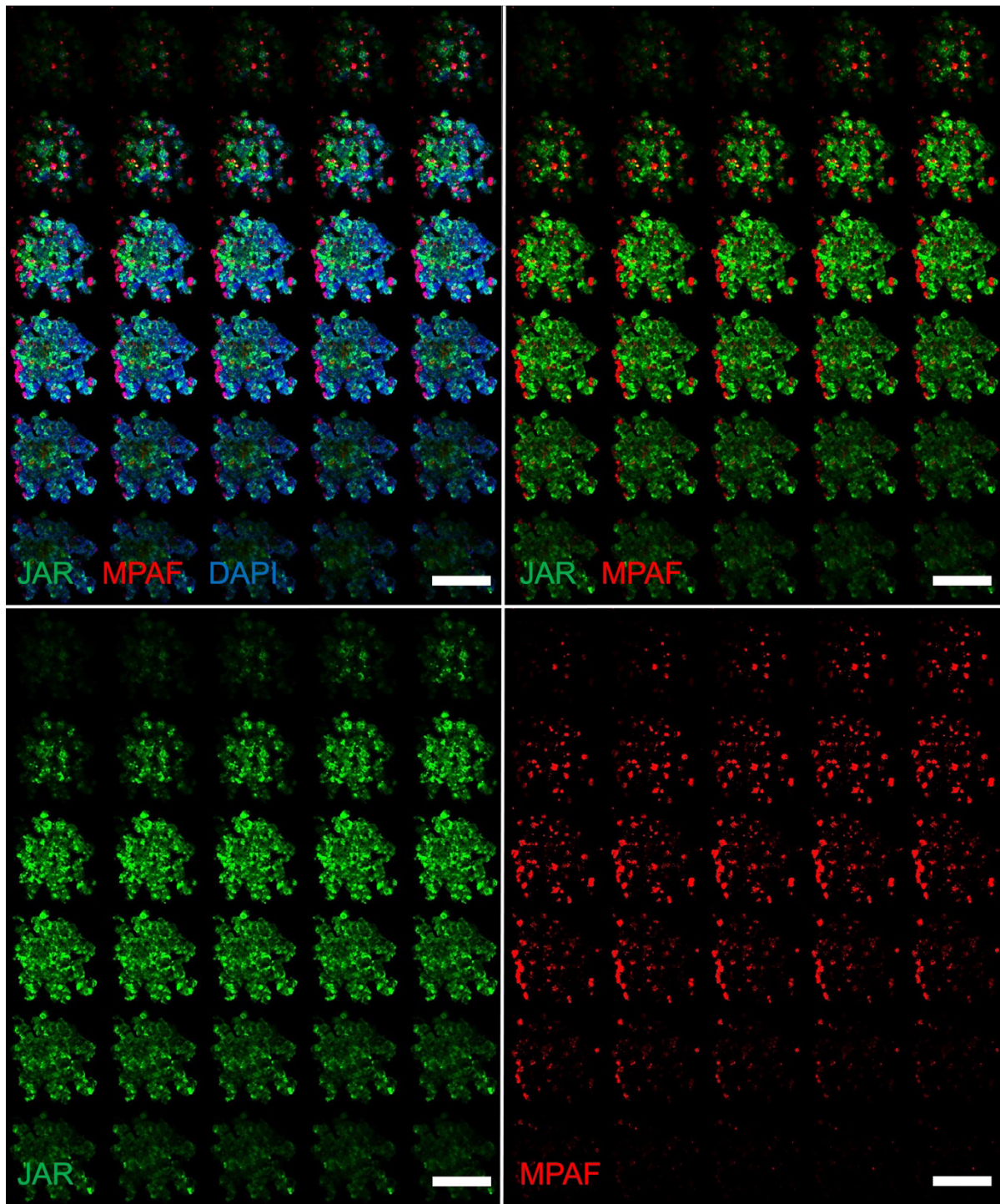


Abb. 37: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive JAR und CD44-positive MPAF. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Die Rekonstruktion wurde mit der Software ImageJ® erstellt. Der Maßstab entspricht 500 μm .

Die Ko-Kultur mit den Endothelzellen der HUVEC-Zelllinie bildeten ebenso ein Geflecht wie die Ko-Kultur mit den THP-1-diff. M2 Makrophagen (**Abb. 38**). Auch hier befanden sich die HUVEC-Zellen in allen Schichten und Bereichen des Geflechtes (**Abb. 39**).

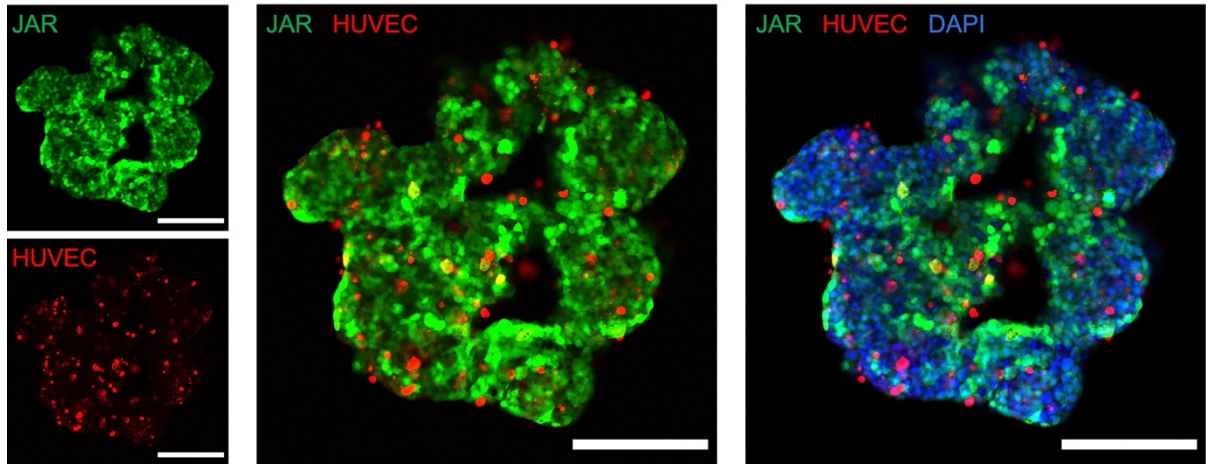


Abb. 38: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven CK-Zelllinie JAR und der mCherry-positiven Endothelzelllinie HUVEC. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Der Maßstab entspricht 250 μm .

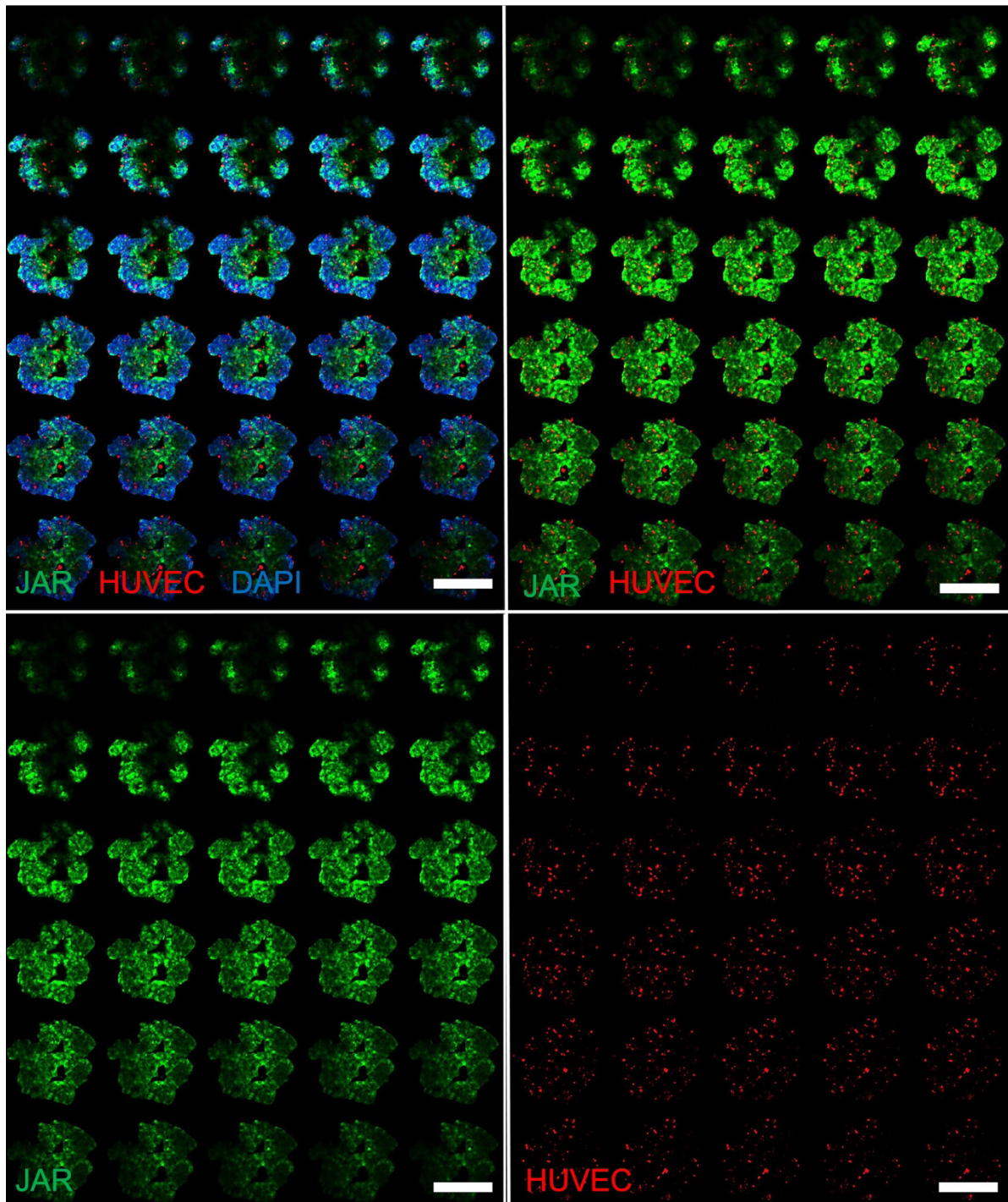


Abb. 39: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive JAR und mCherry-positive HUVEC. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Die Rekonstruktion wurde mit der Software ImageJ® erstellt. Der Maßstab entspricht 500 μm .

3.3.5 JEG-3-Ko-Kulturen

Die Ko-Kultur aus der CK-Zelllinie JEG-3 und der Lymphozyten JURKAT bildete einen sehr losen Zellverbund (**Abb. 40**). Obwohl die Zellen ein Zellaggregat gebildeten, wirkte es weniger zusammenhängend und die Zellen erschienen eher locker miteinander verbunden (**Abb. 41**). Die JURKAT-Zellen zeigen ein ähnliches Verhalten wie bei der CK-Zelllinie JAR (**Kapitel 3.3.4**). Im Vergleich zu den Ko-Kulturen mit TCam-2, 2102EP und NCCIT war die Zellausprägung deutlich reduziert und sie bildeten kleinere Zusammenlagerungen (**Kapitel 3.3.1, 3.3.2 und 3.3.3; Abb. 41**).

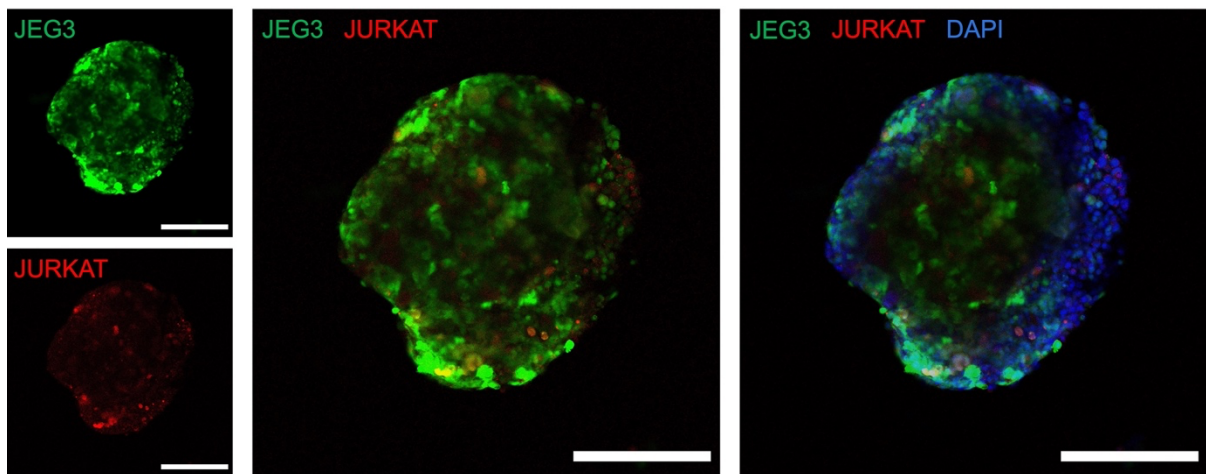


Abb. 40: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven CK-Zelllinie JEG-3 und der mCherry-positiven Lymphozyten JURKAT. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Maßstab entspricht 250 μm .

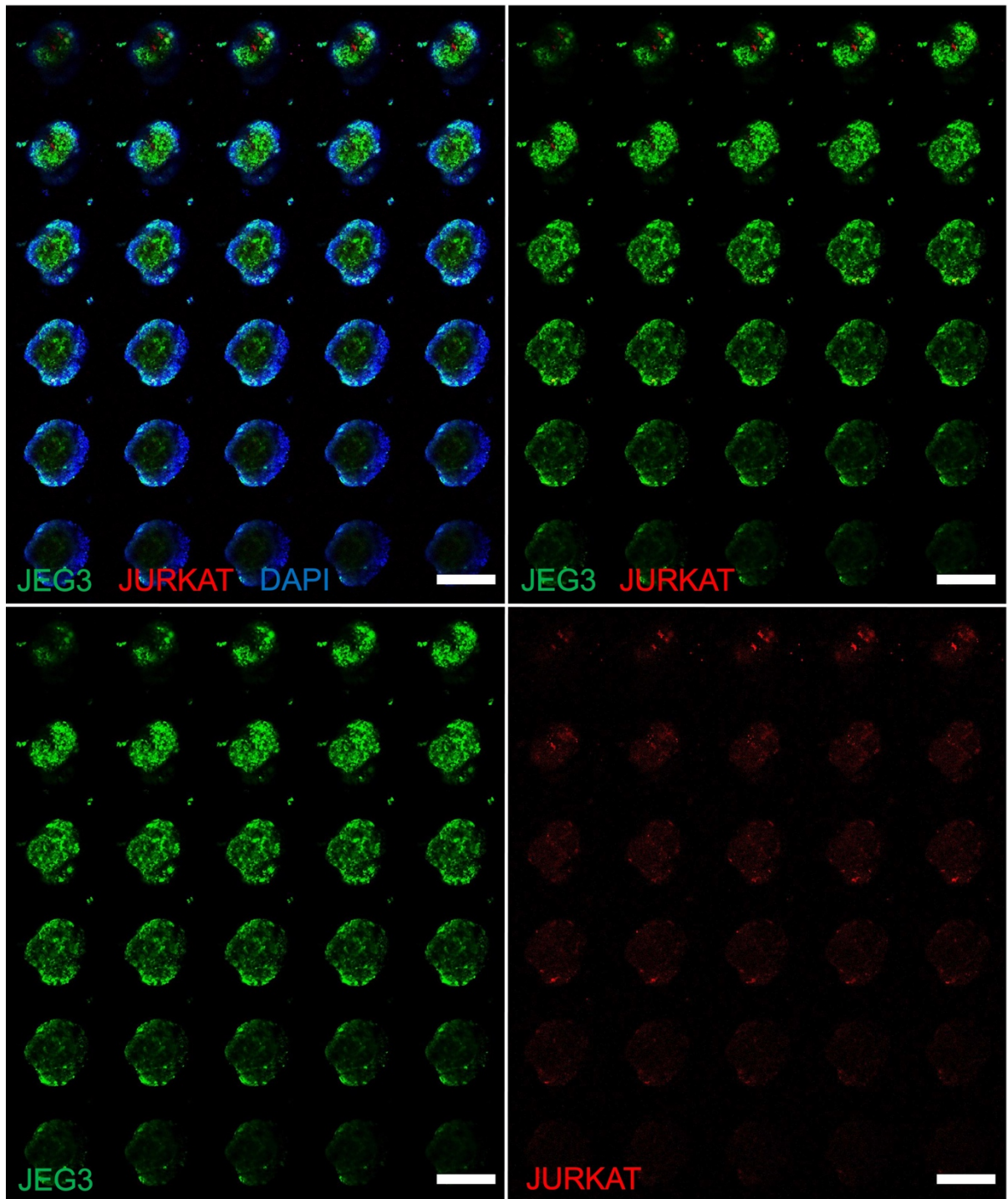


Abb. 41: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive JEG-3 und mCherry-positive JURKAT. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Die Rekonstruktion wurde mit der Software ImageJ® erstellt. Der Maßstab entspricht 500 μm .

Die JEG-3-Zellen wuchsen in der Ko-Kultur zusammen mit den THP-1-diff. M2 Makrophagen als rundes Sphäroid (**Abb. 42**). Ähnlich wie bei der CK-Zelllinie JAR waren die M2 Makrophagen hier deutlich stärker ausgeprägt (**Abb. 42** und **Abb. 43**). Ein Großteil der Zellen lagerte sich zu einem Ball inmitten des Zellaggregates zusammen (**Abb. 43**).

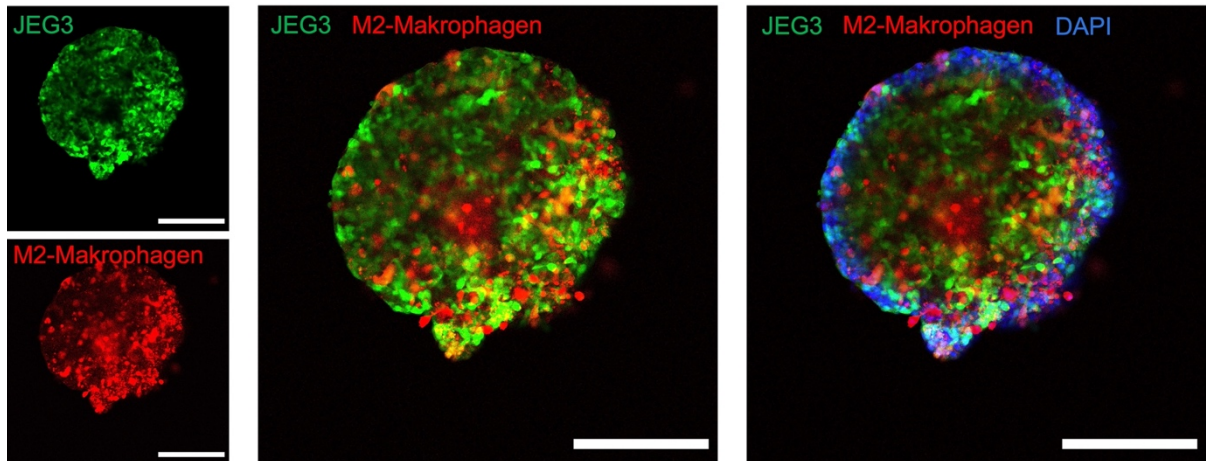


Abb. 42: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven CK-Zelllinie JEG-3 und den mCherry-positiven THP-1-diff. M2 Makrophagen. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Der Maßstab entspricht 250 μm .

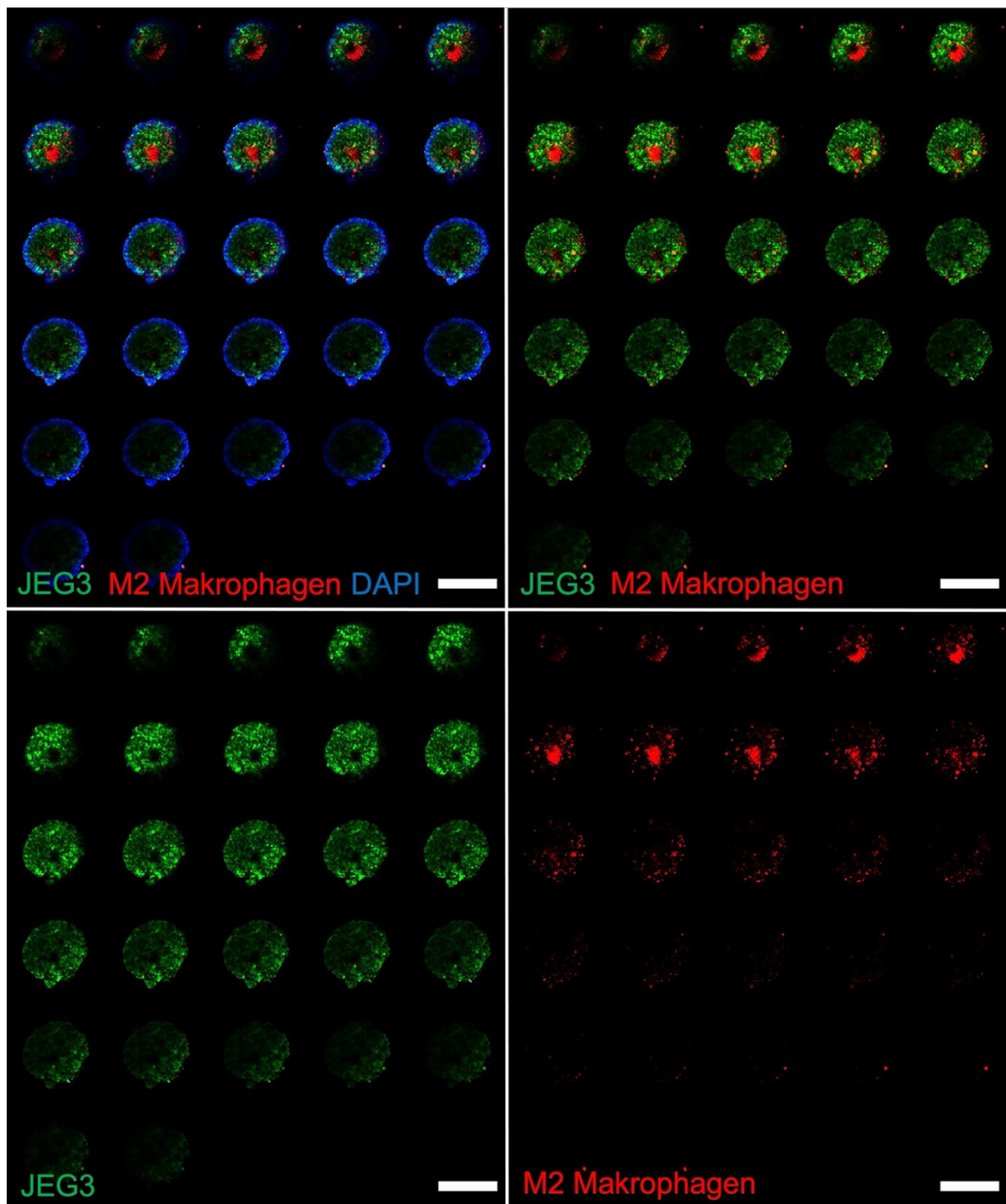


Abb. 43: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive JEG-3 und mCherry-positive THP-1-diff. M2 Makrophagen. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Die Rekonstruktion wurde mit der Software ImageJ® erstellt. Der Maßstab entspricht 500 μm .

Auch in der Ko-Kultur mit JAR bildeten die Fibroblasten MPAF wieder kleinere Zellverbünde innerhalb des Zellaggregates (**Abb. 45**). Das Zellaggregat wuchs sichelförmig annähernd in Form eines Sphäroids (**Abb. 44** und **Abb. 45**).

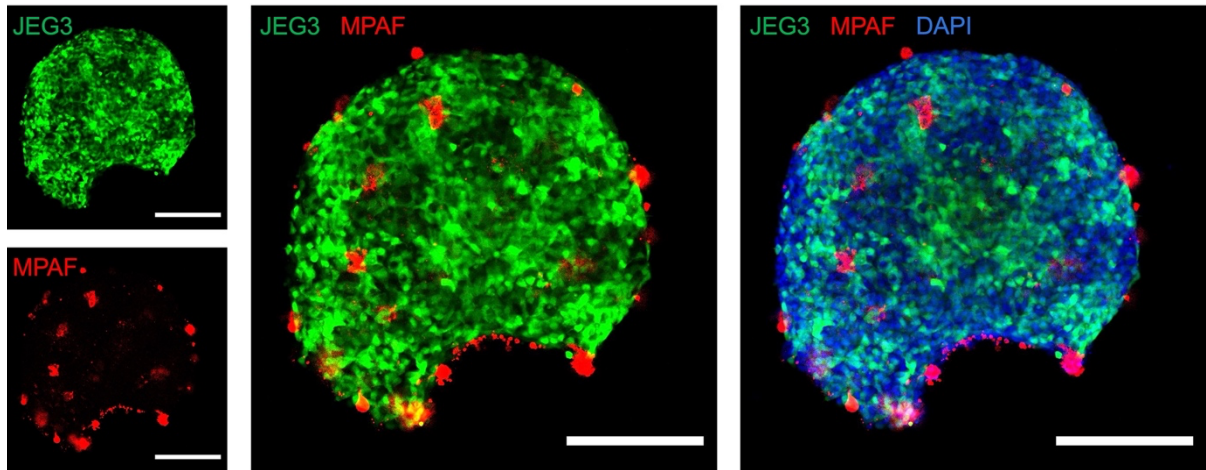


Abb. 44: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven CK-Zelllinie JEG-3 und den CD44-positiven Fibroblasten MPAF. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Der Maßstab entspricht 250 μm .

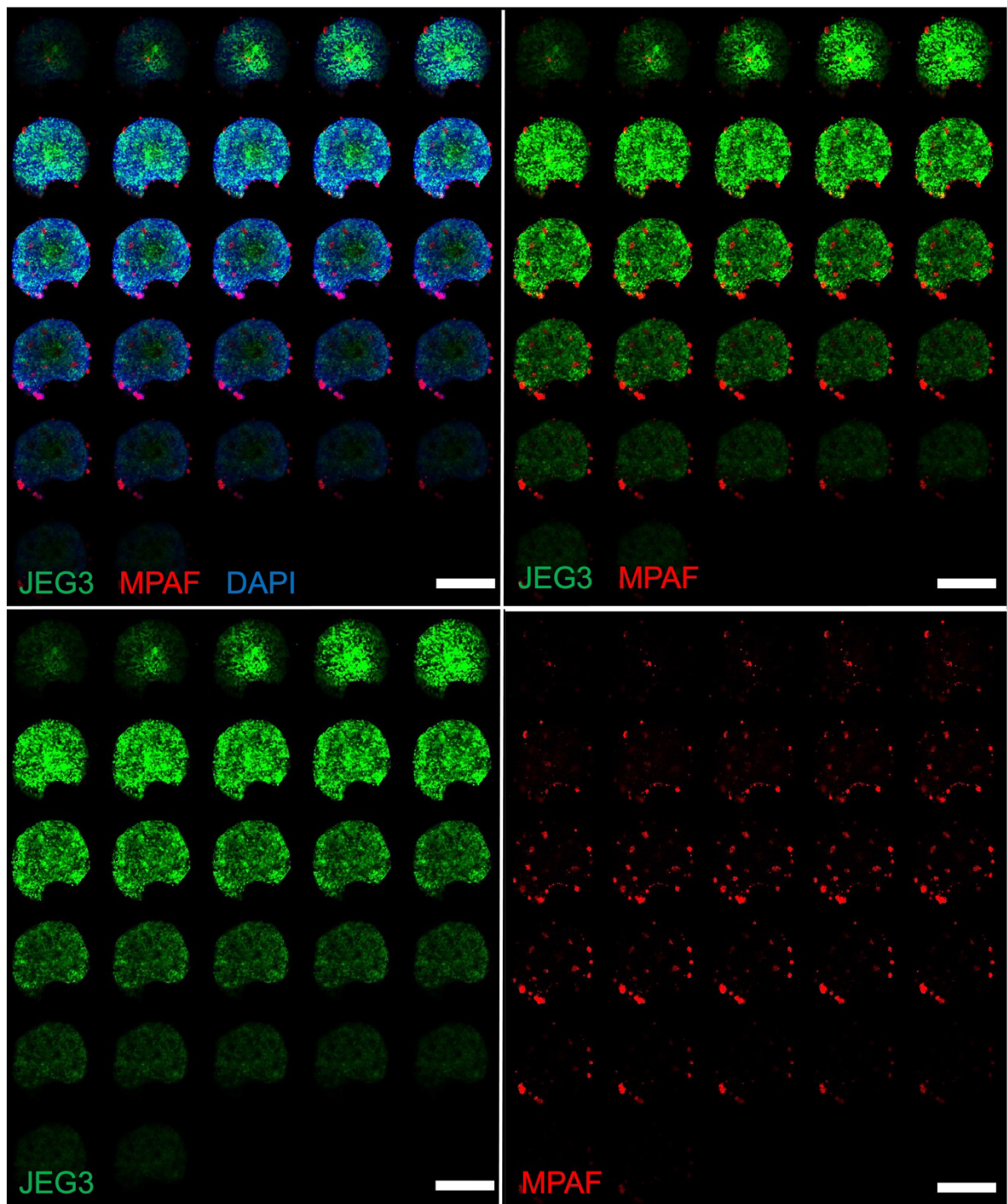


Abb. 45: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive JEG-3 und CD44-positive MPAF. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Die Rekonstruktion wurde mit der Software ImageJ® erstellt. Der Maßstab entspricht 500 μm .

In der Ko-Kultur mit JEG-3 und der Endothelzelllinie HUVEC wuchs das Zellaggregat annähernd rund mit kleineren Zellausläufern (**Abb. 46** und **Abb. 47**). Die HUVEC-Zellen waren in allen Schichten präsent und bildeten teilweise kleinere Zellverbünde (**Abb. 47**). Insgesamt war das Wachstumsverhalten der HUVEC-Zellen in allen Ko-Kulturen gleich.

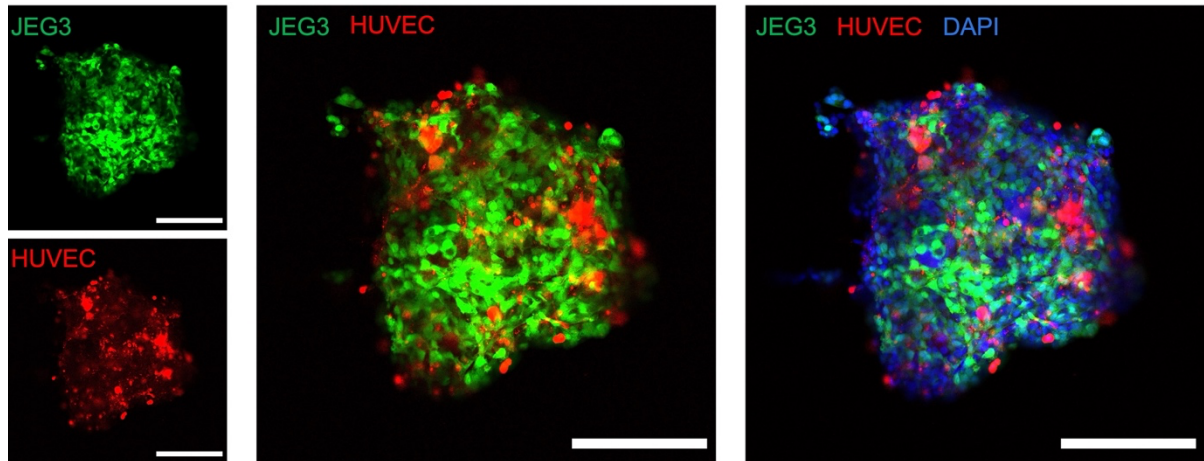


Abb. 46: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven CK-Zelllinie JEG-3 und der mCherry-positiven Endothelzelllinie HUVEC. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Der Maßstab entspricht 250 μm .

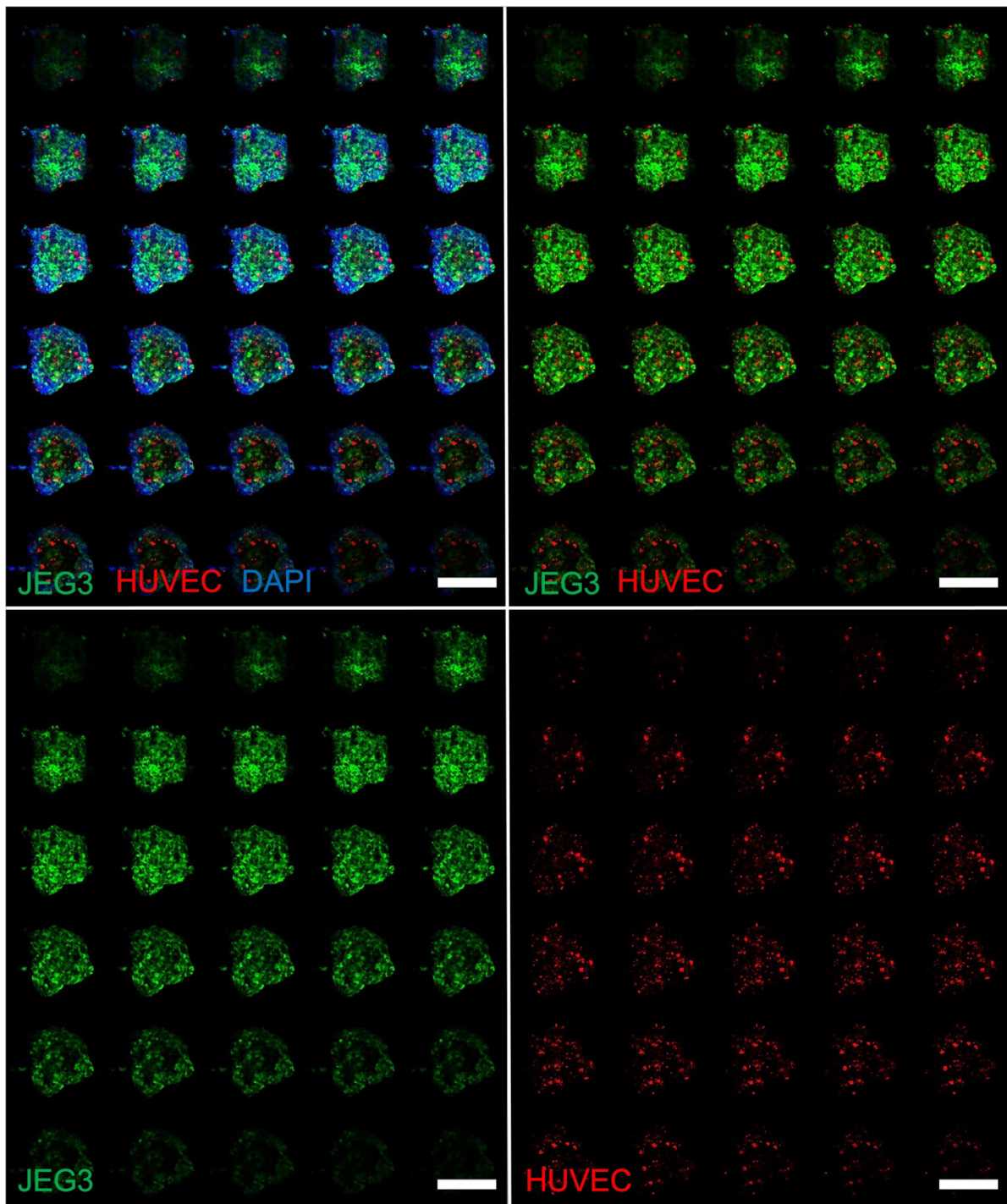


Abb. 47: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive JEG-3 und mCherry-positive HUVEC. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Für die Aufnahme wurde ein LSM mit einem 10xair/NA0.45 Objektiv verwendet. Die Rekonstruktion wurde mit der Software ImageJ® erstellt. Der Maßstab entspricht 500 μm .

4 Diskussion

Ziel dieser *in vitro* Arbeit war die morphologische Charakterisierung von 3D-mono- und ko-kultivierten KZT- und TMM-Zelllinien. Hierbei wurde zunächst das Wachstums- bzw. Formierungsverhalten der Zellaggregate sowie deren räumliche Größe in Einzel- und Ko-Kulturen mikroskopisch analysiert. Die fluoreszenzmikroskopische Darstellung schlüsselte die tatsächliche Organisation der 3D-Ko-Kultivierungen auf, sodass die Verteilung der KZT- und TMM-Zellen im 3D-Zellaggregat analysiert werden konnte.

4.1 Einfluss der Pluripotenz auf das Wachstum von KZT-Zellen im „Hanging Drop“

Frühere Forschungsarbeiten mit pluripotenten Stammzellen haben gezeigt, dass Zellen grundsätzlich in der Lage sind, sich selbst zu organisieren und anzuordnen (55-57). Die Bildung kugelförmiger Sphäroide im „Hanging Drop“ kann auf die frühe embryonale Entwicklung zurückgeführt werden (58). In der Embryogenese entwickelt sich die Morula, ein kompaktes kugeliges Gebilde (59). Durch die weitere Differenzierung der Zellen und Bildung von Flüssigkeit entsteht aus der Morula die Blastozyste (59). Diese besteht aus der inneren Zellmasse, die aus einer Gruppe pluripotenter Zellen besteht, und dem Trophoblasten, der für die Bildung der Plazenta verantwortlich ist (59). Auch embryonale Stammzellen, die in der Zellkultur kultiviert werden, differenzieren sich spontan und bilden dreidimensionale Aggregate, die als Embryoidkörper („embryoid bodies“, EBs) bezeichnet werden. Dieses Erkenntnis wurde verwendet, um die 3D Zellkulturtechniken zu entwickeln (57). Die Grundvoraussetzungen für dreidimensionales Wachstum sind die Fähigkeit zur Selbstorganisation und die Differenzierung der Zellen (55, 56, 60). Selbstorganisation fasst die genetischen Aspekte („fate specification“, Zell-Segregation, Zell-Sortierung), die für das Wachstum in der 3D Zellkultur relevant sind, zusammen (56). Des Weiteren haben die Mikroumgebung wie z. B. Serumkomponenten, die Charge des FBS und die Proliferationsrate Einfluss auf das dreidimensionale Wachstum der Zellen (56, 60, 61). Der Schlüsselfaktor für die 3D Kultur ist jedoch der pluripotente Zustand der Zellen (56). Die Pluripotenz von Stammzellen ist entscheidend für ihre Fähigkeit sich selbst zu organisieren, komplexe Strukturen zu bilden und mit ihrer Mikroumgebung zu interagieren (56, 61). Pluripotente Stammzellen weisen zudem eine hohe Plastizität auf (60). Diese Gegebenheiten ermöglichen es den Zellen dreidimensionale Muster zu erzeugen (56, 60). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass pluripotente Stammzellen, die dreidimensional kultiviert wurden, ein höheres Differenzierungspotential aufweisen als pluripotente Stammzellen, die in der 2D

Kultur kultiviert wurden (61). Darüber hinaus besitzen die 3D Zellaggregate einen hypoxischen Kern, der ebenfalls dazu beiträgt, dass die Zellen ihre Stammzellmerkmale und Differenzierungsfähigkeit beibehalten (62, 63). Diese hypoxischen Bedingungen führen zudem zu einer verbesserten Produktion von EZM und Wachstumsfaktoren (62, 63).

Die unterschiedlichen KZT-Entitäten weisen unterschiedliche Differenzierungspotenziale auf und unterscheiden sich in der Expression von Pluripotenzmarkern. EK sind pluri- bis totipotent und exprimieren die Pluripotenzmarker NANOG, OCT3/4 und SOX2 (19, 64, 65). Auch SE exprimieren die Pluripotenzmarker, allerdings weisen sie nur ein begrenztes Differenzierungspotenzial auf, weshalb SE als latent pluripotent beschrieben werden (19, 64, 66, 67). CK entwickeln sich aus EK und ähneln Zellen des Trophoblasten. Sie differenzieren sich extraembryonal und sind daher nicht pluripotent (68, 69).

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass die EK-Zelllinien 2102EP und NCCIT sowie die SE-Zelllinie TCam-2 in der Lage sind, im „Hanging Drop“ als kugelförmiges Sphäroid zu wachsen. Im Gegensatz dazu wachsen die CK-Zelllinien JAR und JEG-3 eher flach und planar in einer ungleichmäßigen Form. Werden die Differenzierungspotenziale, die Expression von Pluripotenzmarkern und das Wachstum der Zellen miteinander verglichen, fällt auf, dass die Pluripotenz Einfluss auf das Wachstum der KZT-Zellen im „Hanging Drop“ hat. Die pluripotenten EK- und SE-Zelllinien besitzen im „Hanging Drop“ die Fähigkeit als dreidimensionales kugelförmiges Sphäroid zu wachsen. Im Gegensatz dazu wachsen die nicht pluripotenten CK flach und in einer ungleichmäßigen Form. Neben der Pluripotenz könnte ein weiterer Grund für das atypische Wachstumsverhalten die Invasivität bzw. Aggressivität von CK sein. Durch die invasiven Eigenschaften sind CK-Zellen in der Lage, sich schnell zu bewegen und in umliegendes Gewebe einzudringen (70). Diese Eigenschaften könnten verhindern, dass die CK-Zellen sich zu einem stabilen Sphäroid organisieren. Eine zentrale Rolle bei der Zell-Zell Adhäsion und der Bildung von Sphäroiden spielt E-Cadherin (71). Hohe Expression von E-Cadherin führt zur Bildung kompakter Sphäroide, wohingegen eine geringe Expression nur zur Bildung loser Zellaggregate führt (71). Da CK eine reduzierte Expression von E-Cadherin aufweisen (72), kann das ein weiterer Aspekt für das lose und planare Wachstumsverhalten der CK-Zellen sein. Inwieweit die Ausbildung eines hypoxischen Kerns innerhalb von Sphäroiden bzw. die damit verbundenen hypoxischen Bedingungen für die Zellen ebenfalls Einfluss auf das Wachstum der CK-Zellen hat und ob diese eventuell empfindlicher gegenüber Sauerstoff- und Nährstoffmangel sind, könnte Bestandteil weiterer Forschung sein. Außerdem könnten die Bestimmung der Pluripotenzmarker nach Kultivierung der KZT-Zellen im „Hanging Drop“ und nach Ko-Kultivierung mit TMM-Zellen, sowie vergleichende Analysen mit KZT-Zellen aus der 2D Zellkultur dazu beitragen, die spezifischen Vorteile der 3D Zellkultur insbesondere für die Aufrechterhaltung und die Steuerung der Pluripotenz besser zu verstehen. Da die Pluripotenz von Tumorzellen zu einer erhöhten

Tumorigenität und Therapieresistenz führt (73), könnte das ebenfalls ein wichtiger Aspekt weiterer Forschung sein.

4.2 Einfluss der TMM-Zellen auf die Organisation der KZT-Zellen im 3D-Modell

Die bisherige Forschung konnte zeigen, dass das TMM eine große Rolle in der Tumorentwicklung, -progression und -metastasierung spielt (20, 22-26). Diese Arbeit hat sich daher mit der Frage beschäftigt, wie sich das Wachstum von KZT-Zellen durch die Anwesenheit von TMM-Zellen verändert und welchen Einfluss wiederum die KZT-Zellen auf die TMM-Zellen haben.

Wie in Abschnitt 4.1 beschrieben, unterscheidet sich das Wachstum der unterschiedlichen KZT-Entitäten bzw. ihre Fähigkeit, als kugelförmiges Sphäroid zu wachsen, bereits in der Monokultur. Durch die Ko-Kultivierung der KZT-Zellen mit TMM-Zellen veränderte sich teilweise das Wachstumsmuster im „Hanging Drop“. Die CK-Zelllinien JAR und JEG-3 waren in der Monokultur nicht in der Lage als kugelförmiges Sphäroid zu wachsen. In der Ko-Kultur mit den Fibroblasten MPAF bilden sie jedoch ein kugelförmiges Sphäroid. Zudem ist JEG-3 in der Ko-Kultur mit den Lymphozyten JURKAT ebenfalls in der Lage ein kugelförmiges Sphäroid zu bilden. Die größten Auffälligkeiten zeigen die Ko-Kulturen von JAR mit HUVEC sowie von JAR mit den THP-1-diff. M2 Makrophagen. Diese Ko-Kulturen bilden große wenig zusammenhängende Geflechte, die keine andere Mono- oder Ko-Kultur zeigt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die KZT-Zellen umgekehrt das Wachstum bzw. das Verhalten der TMM-Zellen im „Hanging Drop“ beeinflussen. Mit Ausnahme der Lymphozyten JURKAT erscheint in den Fluoreszenzaufnahmen die Ausprägung der TMM-Zellen in den Ko-Kulturen mit der EK-Zelllinie NCCIT im Vergleich deutlich vermindert. Dies wird besonders im direkten Vergleich mit der anderen EK-Zelllinie 2102EP deutlich. Werden die Flächeninhalte der gebildeten Sphäroide von NCCIT und 2102EP miteinander verglichen fällt auf, dass der durchschnittliche Flächeninhalt von NCCIT in der Monokultur um 50 % größer ist als der von 2102EP. In den Ko-Kulturen mit MPAF, HUVEC und den THP-1-diff. M2 Makrophagen hingegen beträgt der Unterschied nur 2 - 33 %. Diese Beobachtung kann durch die unterschiedliche Wachstumsrate der EK-Zellen erklärt werden. NCCIT-Zellen sind für eine schnelle Proliferation bekannt, wohingegen 2102EP im Vergleich deutlich langsamer wächst (74). Außerdem weisen diese Zelllinien ein unterschiedliches Differenzierungspotenzial auf. Beide EK-Zelllinien sind zwar pluripotent, jedoch zeigt 2102EP im Vergleich zu anderen pluripotenten Zelllinien eine eingeschränkte Differenzierungsfähigkeit (75, 76). Ein weiterer Unterschied ist der Ursprung der Zelllinien. Die Zelllinie NCCIT wurde aus einem mediastinalen gemischten KZT entnommen, während die Zelllinie 2102EP aus Zellen eines

primären testikulären Teratokarzinoms kultiviert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass mediastinale KZT invasiver sind, ein schlechteres Ansprechen auf platinbasierte Chemotherapie zeigen und NCCIT im Gegensatz zu 2102EP *TP53* Mutationen aufweist (77). Diese genannten Unterschiede könnten zu einer erhöhten Apoptose, verminderten Proliferation oder erhöhten Seneszenz der TMM-Zellen in der Ko-Kultur mit NCCIT sein. Um diese Beobachtung zu verifizieren, müssten unter anderem genaue Zellviabilitätstests nach Ko-Kultivierung durchgeführt werden. Sollten sich diese Beobachtungen bestätigen, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass mediastinale EK nicht von einer Behandlung profitieren, die sich gegen TMM-Zellen richtet.

Außerdem zeigte sich, dass der Einfluss der KZT-Zellen auf das Wachstum von MPAF Fibroblasten und HUVEC Endothelzellen im „Hanging Drop“ am geringsten ist. Hier unterscheidet sich das Wachstumsmuster in den verschiedenen Ko-Kulturen kaum. Wie bereits zuvor beschrieben, führen die Fibroblasten MPAF umgekehrt zu einem veränderten Wachstum der KZT-Zelllinien, insbesondere der CK-Zellen. Auch die Endothelzellen HUVEC scheinen einen entscheidenden Einfluss auf das Wachstum der CK-Zellen zu nehmen, die ihr Wachstumsmuster in dieser Ko-Kultur am stärksten verändern. Durch die in der Publikation „Profiling the 3D interaction between germ cell tumors and microenvironmental cells at the transcriptome and secretome level“ ergänzend durchgeführten Sekretomanalysen der untersuchten Ko-Kulturen konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten und Endothelzellen auch den größten Einfluss auf die Dysregulation von Genen und Proteinen von KZT-Zellen haben (48). Dabei handelt es sich vor allem um Gene, die für die Zelladhäsion, die EZM und die Zellmigration relevant sind (48). Bekannt ist, dass verstärkte EZM eine entscheidende Rolle bei der Invasivität, Metastasierung und Cisplatin-Sensitivität von Tumoren spielen (48, 78, 79). In zusätzlichen Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass Komponenten der EZM (Kollagen I, Kollagen IV und Fibronektin) die Cisplatin-Empfindlichkeit von KZT-Zellen beeinflussen und die Migrations- und Adhäsionsfähigkeit von KZT-Zellen modulieren (48). Auch hier stechen die Ergebnisse mit den konditionierten Medien von MPAF und HUVEC heraus. Von allen getesteten TMM-Zellen verringerten sie die Cisplatin-Empfindlichkeit der KZT-Zelllinien TCam-2 (SE), 2102EP (EK) und JAR (CK) (48). Zusammen mit der Beobachtung, dass MPAF und HUVEC in den Ko-Kulturen mit den KZT-Zellen das stabilste Wachstum aufweisen und die KZT-Zellen in ihrem Wachstum am stärksten beeinflussen, belegen diese Ergebnisse, dass MPAF und HUVEC einen großen Einfluss auf KZT-Zellen haben. Daher könnten Endothelzellen und Fibroblasten insbesondere für Cisplatin-resistente KZT, vor allem CK, mögliche Ansatzpunkte für Therapien darstellen.

4.3 Veränderte Ausprägung der Immunzellen in den Ko-Kulturen

Der Hoden ist ein immunprivilegiertes Organ. Unter physiologischen Bedingungen befinden sich nur wenige Immunzellen im Hodengewebe. Dabei handelt es sich in erster Linie um Makrophagen und Mastzellen, die ein antiinflammatorisches Milieu erzeugen (80). Lymphozyten spielen nur eine untergeordnete Rolle (80). Bei Hodentumoren geht dieses Privileg durch die Einwanderung von Immunzellen verloren. Insbesondere SE und EK weisen eine hohe Immunzellinfiltration auf (80, 81). Konträr zum physiologischen Zustand hat das TMM von SE und in geringerem Maße auch das von EK proinflammatorische Eigenschaften und ist durch die Infiltration von CD4⁺-T-Zellen, CD8⁺-T-Zellen und M1-Makrophagen gekennzeichnet (82-84). Nicht-SE werden ebenfalls in geringem Maße von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen infiltriert, weisen aber eine deutlich höhere Rate tumorfördernder regulatorischer T-Zellen auf (82, 83). Darüber hinaus finden sich bei Nicht-SE weitere Immunzellen (Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Mastzellen), die die antitumorale Immunantwort hemmen (83). Reine CK weisen die geringste Lymphozytendichte auf (81). Auch auf zellulärer Ebene konnte dies beobachtet werden. So konnte eine frühere Arbeit zeigen, dass die CK-Zelllinie JEG-3 eine immunsuppressive Wirkung auf T-Zellen hat (85). Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass CK in der 2D Ko-Kultur mit JURKAT Lymphozyten dazu führen, dass die JURKAT Zellen apoptotisch werden und sich die CK somit dem Immunangriff entziehen (86). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen ebenfalls, dass die Ausprägung der JURKAT Lymphozyten in den Ko-Kulturen mit den CK-Zelllinien JAR und JEG-3 im Vergleich zu den Ko-Kulturen mit der SE-Zelllinie TCam-2 und den EK-Zelllinien 2102EP auch in der 3D Zellkultur deutlich vermindert ist. Demnach scheinen die CK-Zellen auch in der 3D Zellkultur eine immunsuppressive Wirkung auf T-Zellen zu entfalten. Durch die in der Publikation „Profiling the 3D interaction between germ cell tumors and microenvironmental cells at the transcriptome and secretome level“ ergänzend durchgeführten Sekretomanalysen wurde gezeigt, dass JAR (CK) den geringsten Einfluss auf die Hochregulation des Expressionsmusters der JURKAT Lymphozyten besitzt (48). Vice versa beeinflussen die JURKAT Lymphozyten im Vergleich zu den anderen TMM-Zelllinien die Hochregulation des Expressionsmusters der CK-Zelllinie JAR am wenigsten. Hier wurden Gene hochreguliert, die mit folgenden biologischen Prozessen assoziiert sind: Zellkontakt, EZM-Organisation und Angiogenese. Dies könnte eine mögliche Erklärung für das Ausbilden eines runden Sphäroides der CK-Zelllinien nach Ko-Kultur mit JURKAT Lymphozyten sein. Go et al. (81) beschreiben zudem eine gezielte Modulation zentraler Immunaktivierungswege durch CK. Die Autoren zeigen, dass CK-Zellen die Expression von IL-2, CD25 sowie den JAK/STAT-Signalweg herunterregulieren, welche als Schlüsselfaktoren für die Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten gelten. Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass der Zellkulturüberstand von CK-Zellen die T-Zell-Aktivität deutlich unterdrücken kann. Dies wurde anhand einer reduzierten Expression klassischer

Oberflächen-Aktivierungsmarker nachgewiesen, darunter CD25, CD69, CD71, CD134 sowie CD3/HLA-DR. Diese Marker gelten als etablierte Indikatoren für eine funktionelle T-Zell-Aktivierung, sodass deren Herunterregulation auf eine gezielte immunsuppressive Wirkung der Tumorzellen hinweist.

Ein möglicher Grund für die ausgeprägte Immunsuppression könnte in der biologischen Herkunft von CK liegen. Diese entstehen aus trophoblastären Zellen, welche physiologische Immunevasionsmechanismen besitzen, um sich dem mütterlichen Immunsystem zu entziehen. Hierfür besitzen sie unterschiedliche Mechanismen (reduzierte Expression MHC-I-Moleküle, Expression nicht-klassischer HLA-G-Moleküle, Sekretion immunsuppressiver Zytokine wie IL-10 und TGF- β , Rekrutierung regulatorischer T-Zellen), welche CK behalten und verstärken können (81). Diese Immunsuppression stellt eine therapeutische Herausforderung in der Therapie mit Immuntherapeutika dar. Besonders Immuncheckpointinhibitoren, wie Anti-PD-1 und Anti-CTLA-4-Antikörper, wirken nur effektiv, wenn eine suffiziente T-Zell Aktivierung stattgefunden hat. Daher ist das Ansprechen von CK auf Checkpointinhibitoren gering und bislang nur in Einzelfällen beschrieben (87-89).

Wie bereits beschrieben, weisen SE-Präparate dagegen typischerweise ein ausgeprägtes lymphozytäres Infiltrat auf. Dieses Phänomen konnte auch auf zellulärer Ebene beobachtet werden. Dabei wurden T-Zellen in Ko-Kultur mit der SE-Zelllinie TCam-2 stark aktiviert und es konnte eine erhöhte Genexpression von Pluripotenz- und Proliferationsmarkern bei unverändertem SE-Marker (SOX17) nachgewiesen werden (90). Die Aufnahmen der Ko-Kultur aus TCam-2 und JURKAT dieser Arbeit stimmen mit diesen Ergebnissen überein. Die JURKAT-Lymphozyten weisen eine deutlich dominantere Verteilung auf, was auf eine gesteigerte Proliferationsrate hinweisen könnte. Auch in Einzelzellanalysen von SE konnte beobachtet werden, dass das TMM von SE eine hohe Immunzellinfiltration aufweist (67). Hier ließen sich insgesamt 15 Immunzell-Subtypen nachweisen. Verglichen mit gesundem Hodengewebe traten diese zwar deutlich vermehrt auf, zeigten jedoch eine ausgeprägte Dysfunktion. Diese Ergebnisse ließen die Autoren darauf schließen, dass sich das TMM von SE trotz hoher Immunzellinfiltration in einem immunsupprimierten Zustand befindet. Savelyeva et al. (91) gingen in diesem Zusammenhang gezielt der Frage nach dem unzureichenden Ansprechen von SE auf Immuntherapeutika trotz hoher Immunzellinfiltration nach und konnten dabei potenzielle Ursachen für das bislang unzureichende Ansprechen von SE auf Immuntherapie identifizieren. Die Autoren konnten zeigen, dass SE im Vergleich zu anderen Tumorentitäten einen niedrigeren Immunscore sowie eine erhöhte Infiltration neutrophiler Granulozyten aufweisen. Außerdem beschrieben sie molekular unterschiedliche Subtypen von SE, die sich hinsichtlich ihres Immunzustands deutlich unterscheiden. Diese Heterogenität der Immunmikroumgebung stellt eine erhebliche Herausforderung für die Entwicklung effektiver Immuntherapien dar, da standardisierte Ansätze möglicherweise nicht für alle Subtypen

geeignet sind. Auch hier diskutieren die Autoren als weiteren Erklärungsansatz eine mögliche Seneszenz oder Erschöpfung der lokalen Immunzellen, welche die Effektivität immunbasierter Therapien beeinträchtigen könnte. Allerdings sehen sie hierin aber auch einen potenziellen Ansatzpunkt für kombinatorische Therapiestrategien, etwa durch die Reaktivierung erschöpfter Immunzellen oder die gezielte Modulation der Mikroumgebung.

Das Vorhandensein von Lymphozyten in Tumoren vor allem in SE wird jedoch auch als Nachweis einer antitumoralen Immunität gewertet und ist mit einer besseren Prognose assoziiert (81, 82, 92). Im Gegensatz dazu korreliert eine höhere Dichte an M2 Makrophagen mit einer schlechteren Prognose (35) und die Anwesenheit von Makrophagen führt zu erhöhtem Tumorwachstum und Metastasierung (93). Die Aufnahmen dieser Arbeit zeigen, dass in den Ko-Kulturen mit der SE-Zelllinie TCam-2 und den EK-Zelllinien 2102EP und NCCIT nur noch vereinzelte M2 Makrophagen vorhanden sind. Diese Beobachtung kann unter anderem auf die forcierte Expression von miR-125b in NCCIT zurückgeführt werden, die zu einer Reduktion der TAMs führt (94). Außerdem könnte die zuvor beschriebene Seneszenz oder Erschöpfung der lokalen Immunzellen vor allem in SE eine Erklärung für die verminderte Anzahl der M2 Makrophagen in diesen Ko-Kulturen sein.

Umgekehrt sind in den Ko-Kulturen mit den CK-Zelllinien JAR und JEG-3 noch viele M2 Makrophagen vorhanden. Diese Arbeit konnte erstmals zeigen, dass CK im Vergleich zu SE und EK in der 3D Zellkultur eine höhere Ausprägung von M2 Makrophagen aufweisen. Diese Beobachtung zeigt ebenfalls, dass CK ein besonders immunsuppressives TMM schaffen. Bislang existieren kaum publizierte Daten, die gezielt das Vorkommen oder die funktionelle Rolle von M2 Makrophagen in CK untersucht haben. Die vorliegenden Ergebnisse könnten somit Grundlage für weiterführende Studien liefern. Mögliche Mechanismen könnten die Sekretion immunsuppressiver Zytokine (IL-10, TGF- β , CSF-1) oder die autokrine Wirkung von MIF (Macrophage Migration Inhibitory Factor) sein.

Die Prognose der Patienten, die unter einem nichtseminomatösen KZT im Hoden leiden, verschlechtert sich mit steigendem CK-Anteil (68). In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob die erhöhte Dichte von M2 Makrophagen und die verminderte Lymphozytenaktivität bei CK einen Einfluss auf die schlechte Prognose dieser Patienten haben und ob dies ein möglicher Ansatzpunkt für neue Therapien sein könnte.

4.4 Schlussfolgerung

Diese Arbeit zeigte die organisierte KZT spezifische Formierungsfähigkeit von KZT-Zelllinien im 3D-Modell. Die SE- und die EK-Zelllinien waren in der Lage ein kugelförmiges Sphäroid zu bilden. Im Gegensatz dazu wuchsen die CK-Zelllinien in einem Zellverbund, mit kleinen abgerundeten Ausläufern, die visuell Pseudopodien ähneln. Die Organisation der KZT-Sphäroide war zudem stark von der Anwesenheit von TMM-Zellen abhängig, die das KZT-Sphäroid infiltrierten (Lymphozyten) oder umlagerten (THP-1-diff. M2 Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen) und somit die Bildung eines Sphäroids unverändert ließen, aufbrachen (EK-Ko-Kulturen mit Fibroblasten, CK-Zelllinie JAR in der Ko-Kultur mit THP-1-diff. M2 Makrophagen und Endothelzellen) oder erst ermöglichten (CK-Ko-Kulturen mit Fibroblasten und Lymphozyten). Unter den TMM-Zellen zeigten Fibroblasten und Endothelzellen ein besonders stabiles Wachstum. Die Ausprägung der Lymphozyten in den Ko-Kulturen mit CK-Zelllinien war deutlich vermindert, umgekehrt waren noch viele THP-1-diff. M2 Makrophagen in diesen Ko-Kulturen vorhanden. Insgesamt zeigte sich eine deutlich verminderte Ausprägung von TMM-Zellen in den Ko-Kulturen mit der EK-Zelllinie NCCIT.

Die besonders hohe Ausprägung von THP-1-diff. M2 Makrophagen und das damit einhergehende immunsupprimierende TMM von CK könnte die Grundlage zukünftiger Studien sein, die die zugrunde liegenden Signalwege, die Rolle spezifischer Zytokine sowie potenzielle Targeting-Strategien gegen Makrophagen untersuchen.

Die ausgeprägten Effekte der EK-Zelllinie NCCIT könnten auf ihre mediastinale Herkunft zurückzuführen sein, da mediastinale KZT als invasiver gelten und schlechter auf platinbasierte Chemotherapien ansprechen. Die beobachtete verminderte Ausprägung von TMM-Zellen in den Ko-Kulturen mit NCCIT könnte somit tumorbiologische Eigenschaften widerspiegeln, deren Validierung weiterer Viabilitätsanalysen bedarf. Bestätigen sich diese Effekte, würde dies darauf hinweisen, dass mediastinale EK möglicherweise nicht von einer Behandlung profitieren, die auf das TMM abzielt.

Die Beobachtung, dass Fibroblasten (MPAF) und Endothelzellen (HUVEC) in Ko-Kulturen mit KZT-Zellen ein besonders stabiles Wachstum zeigten und die stärksten Auswirkungen auf deren Gen- und Proteinexpression hatten, legt nahe, dass diese Zelltypen eine zentrale Rolle im TMM spielen. Insbesondere bei therapieresistenten CK könnten sie potenzielle Zielstrukturen für neue Behandlungsstrategien darstellen.

5 Literaturverzeichnis

1. Oosterhuis JW, Looijenga LH. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(3):210-22.
2. Greimelmaier K. 1q und 12p als prognostische Marker kindlicher Keimzelltumoren: Christian-Albrechts-Universität Kiel; 2019.
3. Manski D. Urologielehrbuch.de: Dirk Manski; 2022.
4. Zeeman AM, Stoop H, Boter M, Gillis AJ, Castrillon DH, Oosterhuis JW, et al. VASA is a specific marker for both normal and malignant human germ cells. *Lab Invest*. 2002;82(2):159-66.
5. Al-Obaidy KI, Idrees MT. Testicular Tumors: A Contemporary Update on Morphologic, Immunohistochemical and Molecular Features. *Adv Anat Pathol*. 2021;28(4):258-75.
6. Moch H, Amin MB, Berney DM, Comperat EM, Gill AJ, Hartmann A, et al. The 2022 World Health Organization Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol*. 2022;82(5):458-68.
7. Krebsregisterdaten Zf, Institut RK. Inzidenz Hodenkrebs RKI [Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Hodenkrebs/hodenkrebs_node.html (zuletzt abgerufen am: 02.11.2025)].
8. Choices N. Testicular Cancer [Available from: <https://www.nhs.uk/conditions/testicular-cancer/> (zuletzt abgerufen am: 02.11.2025)].
9. Bertz J, Buttman-Schweiger N, Kraywinkel K. Epidemiologie bösartiger Hodentumoren in Deutschland. *Der Onkologe*. 2017.
10. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Keimzelltumoren des Hodens, Langversion 1.1, 2020, AWMF-Registernummer: 043/049OL, <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/hodentumoren> (zuletzt abgerufen am: 02.11.2025)
11. Nicol D, Berney D, Boormans JL, di Nardo D, Fankhauser CD, Fischer S, et al. EAU Guidelines on Testicular Cancer: European Association of Urology (EAU); 2023.
12. Albany C, Adra N, Snaveley AC, Cary C, Masterson TA, Foster RS, et al. Multidisciplinary clinic approach improves overall survival outcomes of patients with metastatic germ-cell tumors. *Ann Oncol*. 2018;29(2):341-6.
13. International Germ Cell Consensus Classification: a prognostic factor-based staging system for metastatic germ cell cancers. International Germ Cell Cancer Collaborative Group. *J Clin Oncol*. 1997;15(2):594-603.
14. Kier MG, Lauritsen J, Mortensen MS, Bandak M, Andersen KK, Hansen MK, et al. Prognostic Factors and Treatment Results After Bleomycin, Etoposide, and Cisplatin in Germ Cell Cancer: A Population-based Study. *Eur Urol*. 2017;71(2):290-8.
15. Lobo J, Jerónimo C, Henrique R. Cisplatin Resistance in Testicular Germ Cell Tumors: Current Challenges from Various Perspectives. *Cancers*. 2020;12(6):1601.
16. Bokemeyer C, Kollmannsberger C, Harstrick A, Beyer J, Gerl A, Casper J, et al. Treatment of patients with cisplatin-refractory testicular germ-cell cancer. German Testicular Cancer Study Group (GTCSG). *Int J Cancer*. 1999;83(6):848-51.
17. Orszaghova Z, Kalavska K, Mego M, Chovanec M. Overcoming Chemotherapy Resistance in Germ Cell Tumors. *Biomedicines*. 2022;10(5):972.

18. Lengert AVH, Pereira L, Cabral ERM, Gomes INF, Jesus LM, Goncalves MFS, et al. Potential New Therapeutic Approaches for Cisplatin-Resistant Testicular Germ Cell Tumors. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2022;27(8):245.
19. Nettersheim D, Schorle H. The plasticity of germ cell cancers and its dependence on the cellular microenvironment. *J Cell Mol Med*. 2017;21(8):1463-7.
20. de Visser KE, Joyce JA. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer Cell*. 2023;41(3):374-403.
21. Paget S. The Distribution of Secondary Growths in Cancer of the Breast. *The Lancet*. 1889;133(3421):571-3.
22. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(9):582-98.
23. Xiao Y, Yu D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. *Pharmacol Ther*. 2021;221:107753.
24. Wu T, Dai Y. Tumor microenvironment and therapeutic response. *Cancer Lett*. 2017;387(1):61-8.
25. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 2013;19(11):1423-37.
26. Maishi N, Hida K. Tumor endothelial cells accelerate tumor metastasis. *Cancer Sci*. 2017;108(10):1921-6.
27. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005;121(3):335-48.
28. Plikus MV, Wang X, Sinha S, Forte E, Thompson SM, Herzog EL, et al. Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. *Cell*. 2021;184(15):3852-72.
29. Kendall RT, Feghali-Bostwick CA. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front Pharmacol*. 2014;5(1663-9812 (Print)):123.
30. Birbrair A. Tumor Microenvironment - Non-Hematopoietic Cells: Springer; 2020.
31. Sahai E, Astsaturov I, Cukierman E, DeNardo DG, Egeblad M, Evans RM, et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer*. 2020;20(3):174-86.
32. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res*. 1999;59(19):5002-11.
33. Shen L, Zhou Y, He H, Chen W, Lenahan C, Li X, et al. Crosstalk between Macrophages, T Cells, and Iron Metabolism in Tumor Microenvironment. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021:8865791.
34. Fu LQ, Du WL, Cai MH, Yao JY, Zhao YY, Mou XZ. The roles of tumor-associated macrophages in tumor angiogenesis and metastasis
Tumor-associated macrophages: potential therapeutic strategies and future prospects in cancer. *Cell Immunol*. 2020;353(1):104119.
35. Li C, Xu X, Wei S, Jiang P, Xue L, Wang J, et al. Tumor-associated macrophages: potential therapeutic strategies and future prospects in cancer. *J Immunother Cancer*. 2021;9(1).
36. Stephan A, Suhrmann JH, Skowron MA, Che Y, Poschmann G, Petzsch P, et al. Molecular and epigenetic ex vivo profiling of testis cancer-associated fibroblasts and their interaction with germ cell tumor cells and macrophages. *Matrix Biol*. 2024;132:10-23.
37. Vitale I, Manic G, Coussens LM, Kroemer G, Galluzzi L. Macrophages and Metabolism in the Tumor Microenvironment. *Cell Metab*. 2019;30(1):36-50.

38. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010;141(1):39-51.
39. Preglej T, Ellmeier W. CD4(+) Cytotoxic T cells - Phenotype, Function and Transcriptional Networks Controlling Their Differentiation Pathways. *Immunol Lett*. 2022;247:27-42.
40. Knocke S, Fleischmann-Mundt B, Saborowski M, Manns MP, Kuhnel F, Wirth TC, et al. Tailored Tumor Immunogenicity Reveals Regulation of CD4 and CD8 T Cell Responses against Cancer. *Cell Rep*. 2016;17(9):2234-46.
41. Collier JL, Weiss SA, Pauken KE, Sen DR, Sharpe AH. Not-so-opposite ends of the spectrum: CD8(+) T cell dysfunction across chronic infection, cancer and autoimmunity. *Nat Immunol*. 2021;22(7):809-19.
42. Saito T, Nishikawa H, Wada H, Nagano Y, Sugiyama D, Atarashi K, et al. Two FOXP3(+)CD4(+) T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nat Med*. 2016;22(6):679-84.
43. Lim AR, Rathmell WK, Rathmell JC. The tumor microenvironment as a metabolic barrier to effector T cells and immunotherapy. *Elife*. 2020;9.
44. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407(6801):249-57.
45. Schaaf MB, Houbaert D, Mece O, Agostinis P. Autophagy in endothelial cells and tumor angiogenesis. *Cell Death Differ*. 2019;26(4):665-79.
46. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971;285(21):1182-6.
47. Genin M, Clement F, Fattaccioli A, Raes M, Michiels C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer*. 2015;15:577.
48. Skowron MA, Eul K, Stephan A, Ludwig GF, Wakileh GA, Bister A, et al. Profiling the 3D interaction between germ cell tumors and microenvironmental cells at the transcriptome and secretome level. *Mol Oncol*. 2022;16(17):3107-27.
49. Pietschmann T, Heinkelein M, Heldmann M, Zentgraf H, Rethwilm A, Lindemann D. Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export. *J Virol*. 1999;73(4):2613-21.
50. Ou W, Marino MP, Suzuki A, Joshi B, Husain SR, Maisner A, et al. Specific targeting of human interleukin (IL)-13 receptor alpha2-positive cells with lentiviral vectors displaying IL-13. *Hum Gene Ther Methods*. 2012;23(2):137-47.
51. Glaas MF, Wiek C, Wolter LM, Roellecke K, Balz V, Okpanyi V, et al. Mutational and Functional Analysis of FANCB as a Candidate Gene for Sporadic Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Anticancer Res*. 2018;38(3):1317-25.
52. Skowron MA, Becker TK, Kurz L, Jostes S, Bremmer F, Fronhoffs F, et al. The signal transducer CD24 suppresses the germ cell program and promotes an ectodermal rather than mesodermal cell fate in embryonal carcinomas. *Mol Oncol*. 2022;16(4):982-1008.
53. Hoarau-Vechot J, Rafii A, Touboul C, Pasquier J. Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions? *Int J Mol Sci*. 2018;19(1).
54. Skowron MA, Watolla MM, Nettersheim D. Three-Dimensional Cultivation of Germ Cell Cancer Cell Lines as Hanging Drops. *Testicular Germ Cell Tumors*. 2195: Springer Protocols; 2021. p. 77-83.
55. Huch M, Knoblich JA, Lutolf MP, Martinez-Arias A. The hope and the hype of organoid research. *Development*. 2017;144(6):938-41.

56. Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science*. 2014;345(6194):1247125.
57. Ader M, Tanaka EM. Modeling human development in 3D culture. *Curr Opin Cell Biol*. 2014;31:23-8.
58. Potter SW, Morris JE. Development of mouse embryos in hanging drop culture. *Anat Rec*. 1985;211(1):48-56.
59. Coticchio G, Lagalla C, Sturmey R, Pennetta F, Borini A. The enigmatic morula: mechanisms of development, cell fate determination, self-correction and implications for ART. *Hum Reprod Update*. 2019;25(4):422-38.
60. Weitzer G. Embryonic stem cell-derived embryoid bodies: an in vitro model of eutherian pregastrulation development and early gastrulation. *Handb Exp Pharmacol*. 2006(174):21-51.
61. Scadden DT. Nice neighborhood: emerging concepts of the stem cell niche. *Cell*. 2014;157(1):41-50.
62. Badea MA, Balas M, Dinischiotu A. Biological properties and development of hypoxia in a breast cancer 3D model generated by hanging drop technique. *Cell Biochem Biophys*. 2022;80(1):63-73.
63. Shearier E, Xing Q, Qian Z, Zhao F. Physiologically Low Oxygen Enhances Biomolecule Production and Stemness of Mesenchymal Stem Cell Spheroids. *Tissue Eng Part C Methods*. 2016;22(4):360-9.
64. Kristensen DM, Sonne SB, Ottesen AM, Perrett RM, Nielsen JE, Almstrup K, et al. Origin of pluripotent germ cell tumours: the role of microenvironment during embryonic development. *Mol Cell Endocrinol*. 2008;288(1-2):111-8.
65. Muller MR, Skowron MA, Albers P, Nettersheim D. Molecular and epigenetic pathogenesis of germ cell tumors. *Asian J Urol*. 2021;8(2):144-54.
66. Eckert D, Nettersheim D, Heukamp LC, Kitazawa S, Biermann K, Schorle H. Tcam-2 but not JKT-1 cells resemble seminoma in cell culture. *Cell Tissue Res*. 2008;331(2):529-38.
67. Lu X, Luo Y, Nie X, Zhang B, Wang X, Li R, et al. Single-cell multi-omics analysis of human testicular germ cell tumor reveals its molecular features and microenvironment. *Nat Commun*. 2023;14(1):8462.
68. Bishop BN, Edemekong PF. Choriocarcinoma: StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2023 2023.
69. Rajpert-De Meyts E, Nielsen JE, Skakkebaek NE, Almstrup K. Diagnostic markers for germ cell neoplasms: from placental-like alkaline phosphatase to micro-RNAs. *Folia Histochem Cytobiol*. 2015;53(3):177-88.
70. Reynaud D, Abi Nahed R, Lemaitre N, Bolze P-A, Traboulsi W, Sergent F, et al. NLRP7 Promotes Choriocarcinoma Growth and Progression through the Establishment of an Immunosuppressive Microenvironment. *Cancers*. 2021;13(12):2999.
71. Schmidt M, Scholz CJ, Polednik C, Roller J. Spheroid-based 3-dimensional culture models: Gene expression and functionality in head and neck cancer. *Oncol Rep*. 2016;35(4):2431-40.
72. Xue WC, Feng HC, Tsao SW, Chan KY, Ngan HY, Chiu PM, et al. Methylation status and expression of E-cadherin and cadherin-11 in gestational trophoblastic diseases. *Int J Gynecol Cancer*. 2003;13(6):879-88.
73. Abbaszadegan MR, Bagheri V, Razavi MS, Momtazi AA, Sahebkar A, Gholamin M. Isolation, identification, and characterization of cancer stem cells: A review. *J Cell Physiol*. 2017;232(8):2008-18.

74. Teshima S, Shimosato Y, Hirohashi S, Tome Y, Hayashi I, Kanazawa H, et al. Four new human germ cell tumor cell lines. *Lab Invest.* 1988;59(3):328-36.
75. Duran C, Talley PJ, Walsh J, Pigott C, Morton IE, Andrews PW. Hybrids of pluripotent and nullipotent human embryonal carcinoma cells: partial retention of a pluripotent phenotype. *Int J Cancer.* 2001;93(3):324-32.
76. Damjanov I, Horvat B, Gibas Z. Retinoic acid-induced differentiation of the developmentally pluripotent human germ cell tumor-derived cell line, NCCIT. *Lab Invest.* 1993;68(2):220-32.
77. Timmerman DM, Eleveld TF, Gillis AJM, Friedrichs CC, Hillenius S, Remmers TL, et al. The Role of TP53 in Cisplatin Resistance in Mediastinal and Testicular Germ Cell Tumors. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21).
78. Janiszewska M, Primi MC, Izzard T. Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *J Biol Chem.* 2020;295(8):2495-505.
79. Gonzalez-Molina J, Moyano-Galceran L, Single A, Gultekin O, Alsalhi S, Lehti K. Chemotherapy as a regulator of extracellular matrix-cell communication: Implications in therapy resistance. *Semin Cancer Biol.* 2022;86(Pt 3):224-36.
80. Islam R, Heyer J, Figura M, Wang X, Nie X, Nathaniel B, et al. T cells in testicular germ cell tumors: new evidence of fundamental contributions by rare subsets 2023.
81. Go JH. Pure choriocarcinoma of testis with tumor-infiltrating lymphocytes and granulomas. *Yonsei Med J.* 2006;47(6):887-91.
82. Gayer FA, Henkel M, Luft J, Reichardt SD, Fichtner A, Legler TJ, et al. The Subtype Identity of Testicular Cancer Cells Determines Their Immunostimulatory Activity in a Coculture Model. *Cancers (Basel).* 2023;15(9).
83. Siska PJ, Johnpulle RAN, Zhou A, Bordeaux J, Kim JY, Dabbas B, et al. Deep exploration of the immune infiltrate and outcome prediction in testicular cancer by quantitative multiplexed immunohistochemistry and gene expression profiling. *Oncoimmunology.* 2017;6(4):e1305535.
84. Torres A, Casanova JF, Nistal M, Regadera J. Quantification of immunocompetent cells in testicular germ cell tumours. *Histopathology.* 1997;30(1):23-30.
85. Matsuzaki N, Saji F, Okada T, Sawai K, Kameda T, Tanizawa O. Analysis of immunoregulatory activity of a choriocarcinoma-derived factor: specific suppression of proliferative process of cell-mediated immune responses including LAK cell generation. *J Reprod Immunol.* 1991;19(2):101-14.
86. Rajashekhar G, Loganath A, Roy AC, Mongelli JM. Resistance to Fas-mediated cell death in BeWo and NJG choriocarcinoma cell lines: implications in immune privilege. *Gynecol Oncol.* 2003;91(1):89-100.
87. Goldfarb JA, Dinoi G, Mariani A, Langstraat CL. A case of multi-agent drug resistant choriocarcinoma treated with Pembrolizumab. *Gynecol Oncol Rep.* 2020;32:100574.
88. Paspalj V, Polterauer S, Poetsch N, Reinthaller A, Grimm C, Bartl T. Long-term survival in multiresistant metastatic choriocarcinoma after pembrolizumab treatment: A case report. *Gynecol Oncol Rep.* 2021;37:100817.
89. Xiu W, Pang J, Hu Y, Shi H. Immune-related mechanisms and immunotherapy in extragonadal germ cell tumors. *Front Immunol.* 2023;14:1145788.
90. Gayer FA, Fichtner A, Legler TJ, Reichardt HM. A Coculture Model Mimicking the Tumor Microenvironment Unveils Mutual Interactions between Immune Cell Subtypes and the Human Seminoma Cell Line TCam-2. *Cells.* 2022;11(5).

91. Savelyeva AV, Medvedev KE. Seminoma subtypes differ in the organization and functional state of the immune microenvironment. *3 Biotech*. 2023;13(3):110.
92. Hwang WT, Adams SF, Tahirovic E, Hagemann IS, Coukos G. Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: a meta-analysis. *Gynecol Oncol*. 2012;124(2):192-8.
93. Gavalas NG, Karadimou A, Dimopoulos MA, Bamias A. Immune response in ovarian cancer: how is the immune system involved in prognosis and therapy: potential for treatment utilization. *Clin Dev Immunol*. 2010;2010:791603.
94. Batool A, Wang YQ, Hao XX, Chen SR, Liu YX. A miR-125b/CSF1-CX3CL1/tumor-associated macrophage recruitment axis controls testicular germ cell tumor growth. *Cell Death Dis*. 2018;9(10):962.

6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des TMM.	5
Abb. 2: Zellkultivierung in der "Hanging Drop" Technik.....	20
Abb. 3: Zellkulturschale mit "Hanging Drops".....	21
Abb. 4: Schematische Darstellung der erzeugten Ko-Kulturen.	21
Abb. 5: Größenbestimmung der Zellaggregat	26
Abb. 6: Weitfeldaufnahmen der unterschiedlichen KZT- und TMM-Zelllinien im „Hanging-Drop" Modell	29
Abb. 7: Flächeninhalte der Zellaggregate in mm ²	31
Abb. 8: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven SE-Zelllinie TCam-2 und der mCherry-positiven Lymphozyten JURKAT	32
Abb. 9: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive TCam-2 und mCherry-positive JURKAT	33
Abb. 10: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven SE-Zelllinie TCam-2 und den mCherry-positiven THP-1-diff. M2 Makrophagen	34
Abb. 11: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive TCam-2 und mCherry-positive THP-1-diff. M2 Makrophagen	35
Abb. 12: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven SE-Zelllinie TCam-2 und den CD44-positiven Fibroblasten MPAF	36
Abb. 13: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive TCam-2 und CD44-positive MPAF	37
Abb. 14: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven SE-Zelllinie TCam-2 und der mCherry-positiven Endothelzelllinie HUVEC	38
Abb. 15: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive TCam-2 und mCherry-positive HUVEC	39
Abb. 16: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven EK-Zelllinie 2102EP und der mCherry-positiven Lymphozyten JURKAT	40

Abb. 17: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive 2102EP und mCherry-positive JURKAT	41
Abb. 18: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven EK-Zelllinie 2102EP und den mCherry-positiven THP-1-diff. M2 Makrophagen	42
Abb. 19: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive 2102EP und mCherry-positive THP-1-diff. M2 Makrophagen	43
Abb. 20: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven EK-Zelllinie 2102EP und den CD44-positiven Fibroblasten MPAF	44
Abb. 21: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive 2102EP und CD44-positive MPAF	45
Abb. 22: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven EK-Zelllinie 2102EP und der mCherry-positiven Endothelzelllinie HUVEC	46
Abb. 23: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive 2102EP und mCherry-positive HUVEC	47
Abb. 24: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven EK-Zelllinie NCCIT und der mCherry-positiven Lymphozyten JURKAT	48
Abb. 25: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive NCCIT und mCherry-positive JURKAT	49
Abb. 26: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven EK-Zelllinie NCCIT und den mCherry-positiven THP-1-diff. M2 Makrophagen	50
Abb. 27: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive NCCIT und mCherry-positive THP-1-diff. M2 Makrophagen	51
Abb. 28: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven EC-Zelllinie NCCIT und den CD44-positiven Fibroblasten MAPF	52
Abb. 29: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive NCCIT und CD44-positive MPAF	53
Abb. 30: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven EK-Zelllinie NCCIT und der mCherry Endothelzelllinie HUVEC	54

Abb. 31: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive NCCIT und mCherry-positive HUVEC	55
Abb. 32: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven CK-Zelllinie JAR und der mCherry-positiven Lymphozyten JURKAT	56
Abb. 33: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive JAR und mCherry-positive JURKAT	57
Abb. 34: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven CK-Zelllinie JAR und den mCherry-positiven THP-1-diff. M2 Makrophagen	58
Abb. 35: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive JAR und mCherry-positive THP-1-diff. M2 Makrophagen	59
Abb. 36: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven CK-Zelllinie JAR und den CD44-positiven Fibroblasten MPAF	60
Abb. 37: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive JAR und CD44-positive MPAF	61
Abb. 38: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven CK-Zelllinie JAR und der mCherry-positiven Endothelzelllinie HUVEC	62
Abb. 39: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive JAR und mCherry- positive HUVEC	63
Abb. 40: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven CK-Zelllinie JEG-3 und der mCherry-positiven Lymphozyten JURKAT	64
Abb. 41: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive JEG-3 und mCherry-positive JURKAT	65
Abb. 42: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven CK-Zelllinie JEG-3 und den mCherry-positiven THP-1-diff. M2 Makrophagen	66
Abb. 43: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive JEG-3 und mCherry-positive THP-1-diff. M2 Makrophagen	67
Abb. 44: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven CK-Zelllinie JEG-3 und den CD44-positiven Fibroblasten MPAF	68

Abb. 45: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive JEG-3 und CD44-positive MPAF	69
Abb. 46: Zellaggregat aus der Ko-Kultur der GFP-positiven CK-Zelllinie JEG-3 und der mCherry-positiven Endothelzelllinie HUVEC	70
Abb. 47: Rekonstruktion der Z-Stapel von dem Zellaggregat der Ko-Kultur: GFP-positive JEG-3 und mCherry-positive HUVEC.....	71

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Unterteilung der KZT in fünf unterschiedliche Typen.....	2
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten humanen Zelllinien.....	11
Tabelle 3: Verwendete Materialien und Geräte für die Zellkultur	12
Tabelle 4: Übersicht der Zelllinienabhängige Zellkulturmedien mit entsprechenden Supplementen	14
Tabelle 5: Zusätzliche Materialien für die RNA-Isolation	15
Tabelle 6: zusätzlich verwendete Materialien für die cDNA-Synthese	16
Tabelle 7: verwendete Primer für die cDNA-Synthese	16
Tabelle 8: zusätzlich verwendete Materialien für die qRT-PCR	17
Tabelle 9: qRT-PCR-Zyklen	17
Tabelle 10: verwendete Plasmide	19
Tabelle 11: zusätzlich verwendete Materialien zur Herstellung der GFP- und mCherry- exprimierenden Zellen	19
Tabelle 12: zusätzlich verwendete Materialien für die DAPI- und CD44-Antikörper- Färbungen	23
Tabelle 13: verwendete Antikörper.....	23
Tabelle 14: verwendete Laser und Filtereinstellungen für das LSM 710 von Zeiss	25
Tabelle 15: Übersicht über die verwendeten Mikroskope.....	25
Tabelle 16: Übersicht der verwendeten Softwares zur Bildverarbeitung und -bearbeitung...	27

8 Anhang

Tabelle S1: Übersicht über die ausgemessenen Flächeninhalte (n=6) in μm^2 der Zellaggregate der KZT-Zelllinien (TCam-2, 2102EP, NCCIT, JAR, JEG-3). Die Zellaggregate wurden in ihrem Außenumfang gemessen.

	TCam-2	2102EP	NCCIT	JAR	JEG3
Zellaggregat 1	88163 μm^2	201587 μm^2	321026 μm^2	357534 μm^2	84802 μm^2
Zellaggregat 2	88296 μm^2	240062 μm^2	308884 μm^2	322283 μm^2	93932 μm^2
Zellaggregat 3	259466 μm^2	191523 μm^2	339845 μm^2	313692 μm^2	68599 μm^2
Zellaggregat 4	276729 μm^2	240768 μm^2	308489 μm^2	305856 μm^2	548381 μm^2
Zellaggregat 5	225234 μm^2	227905 μm^2	338105 μm^2	321796 μm^2	116634 μm^2
Zellaggregat 6	129430 μm^2	230362 μm^2	364115 μm^2	278495 μm^2	39141 μm^2

Tabelle S2: Übersicht über die ausgemessenen Flächeninhalte (n=6) in μm^2 der Zellaggregate der TMM-Zelllinien (MPAF, THP-1-diff. M2 Makrophagen, JURKAT, HUVEC). Die Zellaggregate wurden in ihrem Außenumfang gemessen.

	MPAF	M2 Makrophagen	JURKAT	HUVEC
Zellaggregat 1	55235 μm^2	1220666 μm^2	836919 μm^2	41630 μm^2
Zellaggregat 2	55938 μm^2	425548 μm^2	706441 μm^2	161154 μm^2
Zellaggregat 3	55300 μm^2	411571 μm^2	1070580 μm^2	68350 μm^2
Zellaggregat 4	52317 μm^2	526507 μm^2	688604 μm^2	126960 μm^2
Zellaggregat 5	52562 μm^2	384485 μm^2	713607 μm^2	115128 μm^2
Zellaggregat 6	49336 μm^2	524054 μm^2	855833 μm^2	64729 μm^2

Tabelle S3: Übersicht über die ausgemessenen Flächeninhalte (n=6) in μm^2 der Zellaggregate der TCam-2 Ko Kulturen. Die Zellaggregate wurden in ihrem Außenumfang gemessen.

	TCam-2 + MPAF	TCam-2 + M2 Makrophagen	TCam-2 + JURKAT	TCam-2 + HUVEC
Zellaggregat 1	76978 μm^2	239345 μm^2	327816 μm^2	124596 μm^2
Zellaggregat 2	101669 μm^2	238216 μm^2	192584 μm^2	120549 μm^2
Zellaggregat 3	92953 μm^2	190050 μm^2	312882 μm^2	133056 μm^2
Zellaggregat 4	87122 μm^2	195448 μm^2	282009 μm^2	109367 μm^2
Zellaggregat 5	73695 μm^2	246315 μm^2	339586 μm^2	117080 μm^2
Zellaggregat 6	86236 μm^2	219195 μm^2	241563 μm^2	11046 μm^2

Tabelle S4: Übersicht über die ausgemessenen Flächeninhalte (n=6) in μm^2 der Zellaggregate der 2102EP Ko Kulturen. Die Zellaggregate wurden in ihrem Außenumfang gemessen.

	2102EP + MPAF	2102EP + M2 Makrophagen	2102EP + JURKAT	2102EP + HUVEC
Zellaggregat 1	811816 μm^2	224466 μm^2	193879 μm^2	358832 μm^2
Zellaggregat 2	559172 μm^2	302764 μm^2	200548 μm^2	392329 μm^2
Zellaggregat 3	520965 μm^2	317406 μm^2	217340 μm^2	349399 μm^2
Zellaggregat 4	423261 μm^2	311602 μm^2	192416 μm^2	185601 μm^2
Zellaggregat 5	389540 μm^2	266257 μm^2	188153 μm^2	278926 μm^2
Zellaggregat 6	330005 μm^2	268278 μm^2	212905 μm^2	294631 μm^2

Tabelle S5: Übersicht über die ausgemessenen Flächeninhalte (n=6) in μm^2 der Zellaggregate der NCCIT Ko Kulturen. Die Zellaggregate wurden in ihrem Außenumfang gemessen.

	NCCIT + MPAF	NCCIT + M2 Makrophagen	NCCIT + JURKAT	NCCIT + HUVEC
Zellaggregat 1	607716 μm^2	263972 μm^2	278396 μm^2	332106 μm^2
Zellaggregat 2	597042 μm^2	318626 μm^2	303219 μm^2	334918 μm^2
Zellaggregat 3	509199 μm^2	306208 μm^2	292371 μm^2	319308 μm^2
Zellaggregat 4	507810 μm^2	336481 μm^2	322030 μm^2	390814 μm^2
Zellaggregat 5	415536 μm^2	378452 μm^2	295481 μm^2	338764 μm^2
Zellaggregat 6	486330 μm^2	373541 μm^2	254328 μm^2	304082 μm^2

Tabelle S6: Übersicht über die ausgemessenen Flächeninhalte (n=6) in μm^2 der Zellaggregate der JAR Ko Kulturen. Die Zellaggregate wurden in ihrem Außenumfang gemessen.

	JAR + MPAF	JAR + M2 Makrophagen	JAR + JURKAT	JAR + HUVEC
Zellaggregat 1	188204 μm^2	849381 μm^2	547364 μm^2	332276 μm^2
Zellaggregat 2	216795 μm^2	1046286 μm^2	432758 μm^2	367825 μm^2
Zellaggregat 3	177900 μm^2	1018776 μm^2	543834 μm^2	412847 μm^2
Zellaggregat 4	196040 μm^2	927491 μm^2	490729 μm^2	382501 μm^2
Zellaggregat 5	251701 μm^2	968508 μm^2	362398 μm^2	409728 μm^2
Zellaggregat 6	190015 μm^2	862298 μm^2	456988 μm^2	410494 μm^2

Tabelle S7: Übersicht über die ausgemessenen Flächeninhalte (n=6) in μm^2 der Zellaggregate der JEG-3 Ko Kulturen. Die Zellaggregate wurden in ihrem Außenumfang gemessen.

	JEG-3 + MPAF	JEG-3 + M2 Makrophagen	JEG-3 + JURKAT	JEG-3 + HUVEC
Zellaggregat 1	78133 μm^2	294529 μm^2	269441 μm^2	239683 μm^2
Zellaggregat 2	76424 μm^2	289074 μm^2	283447 μm^2	292465 μm^2
Zellaggregat 3	70368 μm^2	264026 μm^2	254586 μm^2	313194 μm^2
Zellaggregat 4	84243 μm^2	332285 μm^2	262838 μm^2	280250 μm^2
Zellaggregat 5	82457 μm^2	272650 μm^2	241989 μm^2	279085 μm^2
Zellaggregat 6	83844 μm^2	289850 μm^2	281213 μm^2	266927 μm^2

9 Danksagung

An vorrangiger Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Daniel Nettersheim für die Ermöglichung dieser experimentellen und besonderen Dissertation danken. Insbesondere möchte ich mich für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung, sowie die durchaus fordernden, und dadurch sehr hilfreichen Ratschläge, die stets offene Tür und sehr hohe Motivation bedanken. Ich danke ihm nicht nur für die wissenschaftliche Unterstützung, sondern auch für die vielen anregenden Gespräche auf freundschaftlicher Ebene.

Frau PD Dr. Margaretha Skowron möchte ich ebenfalls für ihre hervorragende Betreuung, ihren unermüdlichen Einsatz, ihr stets offenes Ohr und für ihre vielen Ratschläge und Ideen danken, die maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Des weiteren möchte ich meinen ausdrücklichen Dank Anna Pehlke aussprechen, für die intensive Unterstützung, konstruktive Kritik, ihre Geduld und Wertschätzung sowie Begleitung bei der Durchführung von Experimenten.

Mein Dank gilt auch den Mitgliedern der Arbeitsgruppe bestehend aus, Dr. Mara Kotthoff, Herrn Dr. Aaron Burmeister, Frau Dr. Melanie Müller, Frau Alissa Miklyaeva, Herrn Lukas Kurz und Frau Katharina Eul, für ihre stetige Unterstützung, Hilfsbereitschaft und das tolle Miteinander. Die Zusammenarbeit war nicht nur fachlich bereichernd, sondern auch menschlich wertvoll und hat meine Promotionszeit entscheidend geprägt.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Alexa Stephan, die mich während des Schreibprozesses mit großem Einsatz und stetiger Ermunterung unterstützt hat. Obwohl unsere enge Freundschaft erst nach der gemeinsamen Laborzeit entstand, ist sie inzwischen ein wichtiger Teil meines Lebens.

Danken möchte ich außerdem dem Center for Advanced Imaging (Cai) der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf für die Bereitstellung des Zeiss LSM 710 Mikroskopes.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern danken, die mir meinen bisherigen Lebensweg einschließlich dieser Universitätsausbildung ermöglichten, mich bedingungslos unterstützten, mir jederzeit und in jeder Hinsicht zu Seite standen und stehen und zu guter Letzt mich unermüdlich ermuntern an mich zu glauben.

Tief verbunden danke ich zuletzt meinem Ehemann, der mich nicht nur mit unzähligen Umarmungen aufgefangen hat, sondern stets geduldig zugehört, mich unermüdlich aufgemuntert und Rücksicht genommen hat.