

Technische Universität München
Fakultät für Medizin

Nicht-invasive Tumorbildgebung im befruchteten Hühnerei

Benedict Alexander Jefferies

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Lars Mägdefessel

Prüfer*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Rüdiger von Eisenhart-Rothe
2. Priv.-Doz. Dr. Katja Steiger

Die Dissertation wurde am 14.01.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 08.11.2022 angenommen.

Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie des Universitätsklinikums
rechts der Isar
der Technischen Universität München
Leitung: Univ.-Prof. Dr. med. Rüdiger von Eisenhart-Rothe

Nicht-invasive Tumorbildgebung im befruchteten Hühnerei

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.
im Studiengang Humanmedizin an der Technischen Universität München

vorgelegt von
Benedict Alexander Jefferies

aus
München

2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	5
Tabellenverzeichnis.....	6
Abbildungsverzeichnis	7
1 Einleitung.....	8
1.1 Knochen.....	10
1.2 Osteosarkom	12
1.3 Prostatakarzinom.....	16
1.4 Extrazellulärmatrix.....	18
1.5 Fragestellung	20
2 Material und Methoden	23
2.1 Verbrauchsmaterialien	23
2.2 Geräte.....	24
2.3 Reagenzien	25
2.4 Software	26
2.5 Verwendete Zelllinien.....	27
2.6 Zellkultur.....	27
2.7 3D-Tumormatrices.....	29
2.7.1 Cultrex®	29
2.7.2 Gelfoam®	29
2.8 CAM-Assay.....	30
2.8.1 Anatomie und Physiologie.....	30
2.8.2 Versuchsablauf	30
2.8.2.1 Seeding in BME.....	31
2.8.2.2 Seeding in Gelfoam®	31
2.9 Lentivirale Transduktion	34
2.10 Biolumineszenz.....	36
2.10.1 Biolumineszenzbildgebung in vitro.....	36
2.10.2 Biolumineszenzbildgebung in vivo.....	37
2.11 Fluoreszenzmikroskopie	37
2.12 Wiegen der Tumore.....	38
2.13 Histologische Färbung	38
3 Ergebnisse	39
3.1 Nachweis von Biolumineszenz und Fluoreszenz in PC-3-GL-Zellen in vitro	39
3.2 Biolumineszenzbildgebung von PC-3-GL-BME-Tumoren in vivo.....	41

3.3 Nachweis von Biolumineszenz und Fluoreszenz in MG-63-RL- und HOS-RL-Zellen in vitro.....	43
3.4 Biolumineszenzbildgebung von MG-63-RL-BME- und HOS-RL-BME-Tumoren in vivo.....	45
3.5 Biolumineszenzbildgebung von MG-63-RL-Gelfoam®-Tumoren in vivo.....	47
4 Diskussion.....	49
4.1 Zusammenfassung.....	49
4.2 Ausblick.....	56
5 Danksagungen.....	59
6 Literaturverzeichnis.....	60

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
BLI	Bioluminescence imaging, Biolumineszenzbildgebung
BME	Basalmembranextrakt
BMU	Basic multicellular unit
CA	carcinoma, Karzinom
CAM	chorioallantoic membrane, Chorionallantoismembran
CO ₂	Kohlendioxid
CT	Computertomographie
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DRU	Digital-rektale Untersuchung
ECM	extracellular matrix, Extrazellulärmatrix
EET	Embryonaler Entwicklungstag
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence-associated cell sorting
FBS	Fetal bovine serum
GFP	Green fluorescent protein
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
IFU	Infectious units, infektiöse Einheiten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MRT	Magnetresonanztomographie
PBS	Phosphate buffered saline
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RFP	Red fluorescent protein
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
WHO	World health organisation, Weltgesundheitsorganisation

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien	23
Tabelle 2: Geräte.....	24
Tabelle 3: Reagenzien	25
Tabelle 4: Software	26

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gelfoam	29
Abbildung 2: Tumor auf dem ausgedehnten Gefäßbett der CAM.	33
Abbildung 3: Versuchsansatz mit Tumoren auf der CAM.	33
Abbildung 4: Versuchsaufbau im Inkubator.....	33
Abbildung 5: Vektorkarte PC-3-GL	35
Abbildung 6: Vektorkarte HOS-RL, MG-63-RL.....	35
Abbildung 7: Bildgebung von PC-3- und PC-3-GL-Zellen in vitro.....	40
Abbildung 8: Bildgebung von PC-3-BME- und PC-3-GL-BME-Tumoren in vivo.	42
Abbildung 9: Bildgebung von HOS-, MG-63-, HOS-RL-, MG-63-RL-Zellen in vitro.....	44
Abbildung 10: Bildgebung von HOS-, MG-63-, HOS-RL-BME-, MG-63-RL-BME-Tumoren in vivo.	46
Abbildung 11: Bildgebung von MG-63- Gelfoam [®] -, MG-63-RL-Gelfoam [®] -Tumoren in vivo.	48

1 Einleitung

Ziel dieser Arbeit war es, ein Modell zur nichtinvasiven Beurteilung des Wachstums von Tumoren unter Verwendung des chick chorioallantoic membrane assays (CAM-Assay) zu etablieren. Der CAM-Assay ist eine etablierte und vielfach verwendete Methode für in-vivo Studien zu Fragestellungen aus dem Bereich der Onkologie, jedoch auch aus vielen anderen Gebieten, wie z.B. dem tissue engineering. Genauer werden hier heranwachsende Hühnerembryonen als experimentelle in-vivo-Umgebung genutzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Osteosarkom- und Prostatakarzinomzellen in diesem Modell untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Osteosarkomzelllinien MG-63 und HOS, so wie die Prostatakarzinomzelllinie PC-3 dahingehend gentechnisch verändert, dass sie biolumineszenz- und fluoreszenzbildgebend detektiert werden konnten. Eine weitere Modifikation der Tumore erfolgte durch Aussaat der jeweiligen Zellen in Matrices aus Basalmembranextrakt (BME) oder Gelfoam®, einem aus Schweinen gewonnenen Gelatineschwamm, was den jeweiligen Zellen eine dreidimensionale Wachstumsumgebung bot.

Die Biolumineszenzbildgebung ermöglichte tägliche sowohl räumliche als auch zeitliche Beurteilung des Wachstums der Tumore in vivo über eine Dauer von bis zu sieben Tagen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Matrix aus BME das Wachstum von PC-3-Zellen unterstützte, nicht jedoch das von MG-63 oder HOS. Im Gegensatz dazu erfuhren MG-63-Zellen in Verbindung mit Gelfoam® einen anfänglichen Wachstumsschub, der in der Bildgebung registriert und quantifiziert werden konnte.

Zusammenfassend lässt sich aussagen, dass diese Arbeit zum einen eine nichtinvasive Darstellung des Wachstums von Osteosarkom- und Prostatakarzinomzellen in vivo demonstriert, weiterhin jedoch ebenfalls Experimente an Tumorzellen anderen Ursprungs ermöglichen könnte. Eine weitere Untersuchung des Modells im Hinblick auf dessen eventuelle Vorteile in der präklinischen Forschung ist sicher sinnvoll.

Zum näheren Verständnis der Hintergründe dieser Arbeit soll im Folgenden ein Überblick über die Grundlagen des Knochenstoffwechsels sowie der den jeweiligen Zellarten zu-

grundlegenden Erkrankung gegeben werden. Zum weiteren Verständnis der Verwendung o.g. Matrices wird ein kurzer Überblick über die Physiologie der Extrazellulärmatrix gegeben.

1.1 Knochen

Das menschliche Skelett besteht aus 206 Knochen (Gray 1918). Es schützt die inneren Organe, dient der Bewegung, der Blutbildung und dem Mineralhaushalt (Gray 1918, Marieb 2015). Man unterscheidet zwischen kortikalem und trabekulärem Knochen, wobei die prozentuale Verteilung bei 80%, respektive 20% liegt (Post, Cremers et al. 2010). Kortikaler Knochen ist deutlich starrer und solider als trabekulärer Knochen und umgibt die Knochenmarkshöhlen, welche von trabekulärem Knochen durchzogen sind (Clarke 2008). Er besteht zum überwiegenden Anteil aus anorganischer Substanz (vorwiegend Hydroxylapatit), lediglich 30% der Knochenmasse ist organischer Natur, wovon wiederum nur 2% auf zelluläre Bestandteile verfallen (Clarke 2008, Post, Cremers et al. 2010). Im Knochen finden sich mehrere Arten von Zellen, darunter – und wesentlich an der Knochenphysiologie beteiligt – Osteoklasten, Osteoblasten und Osteozyten, wobei sich letztere aus Osteoblasten nach vollendeter Knochenbildung entwickeln (Heino and Hentunen 2008). Diese Zellen beeinflussen maßgeblich die Knochenbeschaffenheit. Um die Integrität des Knochens zu wahren, finden lebenslang Umbauvorgänge statt, welche schadhaften Knochen beseitigen und ihn durch „frischen“ Knochen ersetzen (Raisz 1999). Dies geschieht durch „basic multicellular units“ (BMU), welche aus miteinander kommunizierenden Osteoklasten und Osteoblasten bestehen, die durch variierende Grade von mechanischer Belastung des Knochens sowie nichtmechanische Faktoren aktiviert oder in der Aktivität gebremst werden (Jee 2000, Clarke 2008, Matsuo and Irie 2008). Osteoklasten resorbieren organische und anorganische Knochenbestandteile durch Sekretion von Enzymen und Protonen. Osteoblasten synthetisieren hingegen neue Knochenmatrix und bewirken, dass diese mineralisiert wird, ergo neue Knochensubstanz gebildet wird (Nesbitt and Horton 1997, Garnero, Borel et al. 1998, Roodman 1999, Heino and Hentunen 2008). Diese Umbauprozesse sind in der Pathophysiologie einer Vielzahl an Erkrankungen und deren Folgen relevant: altersbedingte Osteoporose, Morbus Paget, Erkrankungen der Schilddrüse, Diabetes mellitus und chronische Niereninsuffizienz sind nur einige wenige Beispiele, in deren Diagnostik und Behandlung ein gestörtes Verhältnis von Knochenaufbau zu -abbau bedacht werden sollte (Hruska and Teitelbaum 1995, Krakauer, McKenna et al. 1995, Garnero, Sornay-Rendu et al. 1996, Ralston, Langston et al. 2008, Gogakos, Duncan Bassett et al. 2010). In seltenen Fällen kann es auch zu einer

malignen Entartung o.g. Zellen kommen und daraus eine bösartige Tumorerkrankung resultieren. Eine dieser Knochentumorentitäten beschreibt das Osteosarkom. Hierzu soll im Folgenden ein Überblick gegeben werden.

1.2 Osteosarkom

Primäre Knochentumore stellen etwa 3-11% aller Tumore im Kindes- und Jugendalter und weniger als 1% der Tumore im Erwachsenenalter dar (Mirabello, Troisi et al. 2009, Kaatsch 2010). Mit einem Anteil von bis zu 43% ist das Osteosarkom der häufigste maligne Primärtumor des knöchernen Bewegungsapparates und repräsentiert die dritthäufigste Tumorentität bei Heranwachsenden (Ottaviani and Jaffe 2010, Gulia, Puri et al. 2016). Obgleich sich unter den Patienten vorwiegend Kinder und junge Erwachsene finden, lässt sich eine zweigipflige Altersverteilung beobachten mit einem Maximum der Inzidenzraten in der zweiten Lebensdekade sowie bei älteren Patienten zwischen 70 und 85 Jahren (Savage and Mirabello 2011). Das Osteosarkom des jungen Menschen tritt häufiger bei Jungen als bei Mädchen auf (Berner, Johannesen et al. 2015), wobei das durchschnittliche Erkrankungsalter für Mädchen etwas geringer ist (12 Jahre) als das für Jungen (16 Jahre) (Mirabello, Troisi et al. 2009). Laut Studien aus den USA beträgt die durchschnittliche altersadjustierte Inzidenz innerhalb der ersten 24 Lebensjahre 4,0 – 5,0 Fälle pro Million Einwohner (Mirabello, Troisi et al. 2009, Ottaviani and Jaffe 2010). Im internationalen Vergleich weisen die Inzidenzraten keine höhergradigen Unterschiede zwischen den Nationen auf (Parkin, Stiller et al. 1988, Valery, Laversanne et al. 2015).

Der überwiegende Anteil an Osteosarkomen tritt sporadisch auf, für einen geringen Prozentsatz scheint jedoch eine genetische Prädisposition zu bestehen (Savage and Mirabello 2011). So treten zum Beispiel im Rahmen von genetischen Syndromen wie dem Li-Fraumeni-Syndrom, hereditären Retinoblastomen oder auch in Familien, in denen die Eltern an einer andersartigen Tumorerkrankung litten, vermehrt primäre Osteosarkome auf (Ji and Hemminki 2006, Calvert, Randall et al. 2012). Weiterhin kommen Osteosarkome als seltene sekundäre Osteosarkome vor, diese vorwiegend im höheren Alter. Die häufigsten Ursachen hierfür sind eine vorangegangene Bestrahlung der entsprechenden Region, die im Zuge der Therapie einer anderen Erkrankung durchgeführt wurde, (Echchikhi, Loughlimi et al. 2016, Giannini, Incandela et al. 2018) sowie der Morbus Paget, eine Erkrankung, bei der es zu einem stetig erhöhten Umsatz der Knochensubstanz kommt und welche mehr als 20% der Osteosarkome bei Patienten über einem Alter von

40 Jahren verursacht WHO (2002). Mit 34,1% ist das Osteosarkom das häufigste strahlungsinduzierte Sarkom, das Durchschnittsalter dieser Patienten beträgt 50 Jahre (Zhu, Hu et al. 2016).

Die Lokalisation des primären Osteosarkoms betrifft am häufigsten die Metaphysen langer Röhrenknochen (Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie 2010). In 85% sind die proximale Tibia, der distale Femur oder der proximale Humerus betroffen (Picci 2007). Seltenere Lokalisationen beinhalten den Kopf- und Kieferbereich (5,6%) (van den Berg and Merks 2014), die Rippen (1-3%) (Bay, Kebudi et al. 2018), Weichteile und innere Organe (Yu and Yang 2018, Mujtaba, Nassar et al. 2019).

Das Osteosarkom äußert sich meist durch unspezifische lokale, chronische Knochen- und/oder Muskelschmerzen, welche in Ruhe oder bei Belastung auftreten können und sich häufig nur schlecht mit herkömmlichen Schmerzmitteln lindern lassen (Sneppen and Hansen 1984, Wittig, Bickels et al. 2002, Fragkandrea, Nixon et al. 2013). Besonders nächtliche Schmerzen, welche die Patienten aufwachen lassen, sollten den Untersucher hellhörig machen (Nazemi and Malempati 2009, Fragkandrea, Nixon et al. 2013). In einigen Fällen findet sich eine Schwellung der betroffenen Region (Wittig, Bickels et al. 2002, Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie 2010). Ebenfalls kann es zu einer verringerten Beweglichkeit eines Gelenkes kommen, wenn der Tumor in Gelenknähe wächst und dieses in der Bewegungsfreiheit einschränkt (Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie 2010). Frakturen, die an ungewöhnlicher Stelle oder nach einem Bagateltrauma auftreten (sog. pathologische Frakturen), sollten ebenfalls den Verdacht eines malignen Prozesses erwecken (Nazemi and Malempati 2009). Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust (sog. B-Symptome) und lokale Lymphknotenschwellung treten eher selten auf (Wittig, Bickels et al. 2002).

Da sich eine Vielzahl der Patienten im pubertären Wachstumsschub befindet, werden Initialbeschwerden wie lokalisierte, belastungsabhängige Schmerzen jedoch häufig fehlinterpretiert und eine gutartige Genese angenommen, was zu einer verzögerten Diagnosestellung führen kann (Sneppen and Hansen 1984, Nazemi and Malempati 2009).

Die erste diagnostische Maßnahme besteht in der Regel nach Anamnese und körperlicher Untersuchung in der Röntgendarstellung der betroffenen Region, um eine erste Einschätzung knöcherner Veränderungen zu visualisieren (Ritter and Bielack 2010). Charakteristische röntgenologische Zeichen sind das sog. „sun burst Phänomen“, d.h. radiär von der Läsion ausgehende Ausziehungen der Knochensubstanz, das Vorkommen eines Codman-Dreiecks, welches das Abheben des Periosts vom darunterliegenden Knochen signalisiert sowie eine Destruktion des betroffenen Knochens und Knochenneubildung im umliegenden Weichteilmantel (Kundu 2014).

Bei begründetem Verdacht schließen sich einige Untersuchungen an, die dem Staging, d.h. der Feststellung der Ausdehnung der Erkrankung dienen: Eine kontrastmittelgestützte MRT-Bildgebung der betroffenen Extremität ermöglicht eine Aussage über den Grad der Weichteilbeteiligung sowie der intramedullären Tumorausdehnung. Diese Untersuchung ist essenziell, um das Ausmaß der Resektion im Rahmen der präoperativen Planung festlegen zu können (Eftekhari 2009, Ritter and Bielack 2010). Die Computertomografie des Thorax sowie die ^{99m}Techneium-Skelettszintigrafie dienen der Suche nach Fernmetastasen (Eftekhari 2009). Bei Erstdiagnose weisen bereits etwa 18% aller Patienten Metastasen auf, wobei diese Metastasen vorwiegend in der Lunge auftreten (Marko, Diessner et al. 2016). Zur Sicherung der Diagnose ist eine Biopsie des Befundes mit anschließender histopathologischer Aufarbeitung und ggf. molekulargenetischen Untersuchungen des Biopsats erforderlich (Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie 2010).

Histopathologisch lässt sich das Osteosarkom in high-grade- und low-grade-Varianten unterteilen (Wittig, Bickels et al. 2002), wobei den überwiegenden Anteil hochmaligne high-grade Osteosarkome ausmachen (WHO 2002). Anhand der Hauptkomponenten der Extrazellulärmatrix (s.u.), die von den Zellen produziert werden, lässt sich eine Einteilung in chondroblastische, osteoblastische und fibroblastische Osteosarkome vornehmen, wobei in den meisten Fällen Mischformen vorliegen (Klein and Siegal 2006).

Osteosarkome werden primär multidisziplinär behandelt. Die Operation des Primärtumors sowie eine Chemotherapie sind darin die entscheidenden Behandlungsmodalitäten (Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie 2010). In der Regel erfolgt eine neoadjuvante Chemotherapie nach dem MAP-Schema, einer Kombination aus Methotrexat, Adriamycin

und Cisplatin, über eine Dauer von 6-8 Wochen, um einer Metastasierung entgegenzuwirken und das Tumolvolumen präoperativ zu verkleinern (Anninga, Gelderblom et al. 2011, Durfee, Mohammed et al. 2016). Nach Abschluss der neoadjuvanten Vorbehandlung wird die Resektion des Tumors sowie die Rekonstruktion der betroffenen Extremität angestrebt (Grimer 2005). Anschließend erfolgt eine Fortführung der Chemotherapie als zumeist mehrere Monate andauernde adjuvante Chemotherapie. Im Falle von histologisch niedrigmalignen Varianten kann die Therapie jedoch auch in einer alleinigen Operation ohne Chemotherapie bestehen, sofern eine Resektion im Gesunden erfolgen kann (Kurt, Unni et al. 1990, Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie 2010). Bei Nachweis von einzelnen, resektablen Metastasen im Rahmen des Stagings sollte ebenfalls die operative Entfernung und chemotherapeutische Behandlung dieser Läsionen angestrebt werden (Bacci, Rocca et al. 2008).

Vor Einführung von Polychemotherapieschemata in den 1980er Jahren lag die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate für Osteosarkompatienten bei etwa 20% (Mirabello, Troisi et al. 2009). Durch die Einführung der Chemotherapie in das Therapiekonzept konnten diese Zahlen deutlich verbessert werden, sodass inzwischen die 5-Jahres-Überlebensrate bei früher Diagnose ohne Vorliegen einer Fernmetastasierung bei über 70% liegt (Ferrari, Smeland et al. 2005, Mirabello, Troisi et al. 2009). Es zeigen sich jedoch bei 18% - 20% der Patienten bei Diagnosestellung bereits Metastasen, vor allem in der Lunge und im restlichen skelettalen System (Longhi, Errani et al. 2006, Marko, Diessner et al. 2016). Das Auftreten von Lungenmetastasen geht einher mit einer Reduktion der 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit auf etwa 30%. Die Anzahl der Metastasen und der Erfolg der chirurgischen Therapie haben hierbei maßgeblichen Einfluss auf die Prognose (Kager, Zoubek et al. 2003, Luetke, Meyers et al. 2014). Weiterhin weisen Patienten, bei denen sog. „skip lesions“ auftreten, d.h. lokale Absiedelungen innerhalb des Knochens, der von dem Primärtumor befallen ist, eine schlechte Prognose auf (Sajadi, Heck et al. 2004). Obgleich die gegenwärtigen Behandlungsstrategien einen Fortschritt im Vergleich zu früheren Jahren darstellen, haben die derzeit verwendeten Therapieschemata seit Jahrzehnten Bestand. Neuerungen, welche das Langzeitüberleben der Patienten weiter anheben, stehen zum aktuellen Zeitpunkt aus (Chou, Geller et al. 2008, Berner, Johannesen et al. 2015).

1.3 Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom stellt weltweit die zweithäufigste Tumorerkrankung beim Mann dar und ist verantwortlich für etwa 5,8% der tumorassoziierten Todesfälle unter männlichen Patienten (Parkin, Bray et al. 2005). Die Patienten sind in den überwiegenden Fällen höheren Alters, die Inzidenzraten steigen ab einem Alter von 65 Jahren stark an (Weir, Thun et al. 2003). Zu den Risikofaktoren für die Entwicklung eines Prostatakarzinoms werden unter anderem höheres Alter, eine positive Familienanamnese, Alterationen im Hormonhaushalt, Ernährungsgewohnheiten und Exposition gegenüber bestimmten Pestiziden und weiteren Chemikalien, die den Hormonhaushalt beeinflussen könnten, diskutiert (Pienta and Esper 1993, Bostwick, Burke et al. 2004).

Die Frühstadien der Erkrankung bleiben meist symptomarm. In weiter fortgeschrittenen Stadien zeigen sich eventuell Blasenentleerungsstörungen, Knochenschmerzen oder eine B-Symptomatik (Castillejos-Molina and Gabilondo-Navarro 2016). Das primäre diagnostische Vorgehen beinhaltet die digital-rektale Untersuchung (DRU), bei der abklärungsbedürftige Anomalien in der Konsistenz und Ausdehnung der Prostata bereits erkannt werden können (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft 2018)). Zur weiteren Abklärung wird eine MRT der Prostata sowie eventuell eine transrektale Ultraschallbildgebung herangezogen, mittels derer der Tumorbefund genauer lokalisiert und seine Ausdehnung näher beschrieben werden können (Litwin and Tan 2017). Laborchemisch hat das Prostata-spezifische Antigen Relevanz, dies jedoch vorwiegend in der Tumornachsorge nach stattgehabter Therapie (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft 2018)). Nach Abwägung der Ergebnisse der DRU und des PSA-Wertes erfolgt die endgültige Diagnosesicherung mittels ultraschallgestützter, transrektaler Mehrfachbiopsie und anschließender histopathologischer Begutachtung der Biopsiestanzen (EAU 2015). Nach gesicherter Diagnose schließen sich Staginguntersuchungen der Erkrankung mittels Abdomensonographie, CT und Szintigrafie an (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft 2018)).

Bei gesicherter Diagnose eines Prostata-CA bestehen in Abhängigkeit des Erkrankungsmaßes verschiedene Therapieoptionen. Beim lokal begrenzten Prostata-CA wird ent-

weder operativ im Sinne einer radikalen Prostatektomie oder strahlentherapeutisch mittels perkutaner Strahlentherapie oder Brachytherapie vorgegangen (Bill-Axelsson, Holmberg et al. 2005, Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft 2018)). Beim lokal fortgeschrittenen sowie metastasierten Karzinom stehen ebenfalls die oben genannten Therapieoptionen zur Verfügung. Weiterhin wird eine Chemotherapie und eine medikamentöse Androgensuppression, sofern Letztere im Rahmen der Tumorbiologie sinnvoll ist, angewandt (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft 2018)).

Im Rahmen der Tumornachsorge wird in regelmäßigen Abständen der PSA-Wert bestimmt sowie eine DRU durchgeführt, um ein Rezidiv frühzeitig zu erkennen. Weitere apparative Untersuchungen sollten nicht routinemäßig in der Nachsorge eingesetzt werden (EAU 2015). Die altersadjustierten Sterblichkeitsraten variieren zwischen den Nationen und Ethnien, weisen in westlichen Nationen jedoch höhere Werte auf als in Regionen, deren Einwohner einem weniger großen Risiko für Prostatakarzinome unterliegen (Hsing and Chokkalingam 2006).

1.4 Extrazellulärmatrix

Die Extrazellulärmatrix (ECM) beschreibt die Gesamtheit der Komponenten des Zwischenzellraums. Sie umfasst eine Vielzahl von Proteinen, Wachstumsfaktoren und Enzymen, welche dem Gewebe Funktion und Form geben, die Zellpolarität und -migration mitbestimmen und mittels derer die Kommunikation von Zellen untereinander stattfindet (Kim, Turnbull et al. 2011, Naba, Hoersch et al. 2012, Naba, Clauser et al. 2016). Die ECM ist dabei kein ungeordnetes Zufallsprodukt zellulärer Sekretion, sondern eine organisierte, dreidimensionale Struktur, welche einer stetigen, in Wechselwirkung mit den umliegenden Zellen generierten Dynamik unterliegt und verschiedene physiologische und pathophysiologische Zusammenhänge bedingt (Lin and Bissell 1993, Lukashev and Werb 1998, Nelson and Bissell 2006). Zu diesen Prozessen zählen, um nur einige wenige Beispiele zu nennen, die Mineralisierung der ECM im Knochen, die Interaktion von Neuronen, Gliazellen und ECM, welche wesentlich in der Entwicklung und Regeneration des zentralen Nervensystems ist, die Differenzierung der Brustdrüse, die Bestimmung mechanischer Eigenschaften von Knorpel und Sehnen, welche wiederum die Zusammensetzung der ECM in Abhängigkeit von der mechanischen Belastung beeinflussen (Carney and Muir 1988, Hay 1993, Murshed, Schinke et al. 2004, Docking, Samiric et al. 2013, Song and Dityatev 2017). Unter den Enzymen in der ECM finden sich unter anderem Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und deren Inhibitoren (TIMPs), welche den kontrollierten Um- und Abbau der ECM bewirken (Malemud 2006). MMPs sind, neben ihren physiologischen Funktionen, an der Entstehung einiger Krankheitsbilder beteiligt. So zeigen sich Zusammenhänge zwischen der Aktivität bestimmter MMPs und dem Ausmaß von cerebralen Ischämien und Blutungen, der Entstehung von Arthrose, kardiovaskulären Erkrankungen und verschiedenen Formen von Tumoren (Dean, Martel-Pelletier et al. 1989, Bosse, Miqdad et al. 2009, Candelario-Jalil, Yang et al. 2009, Hua, Li et al. 2011).

Die ECM stellt im Kontext maligner Erkrankungen einen Teil des sog. Tumormikromilieus dar, einer Umgebung, welche in sämtlichen Schritten der Tumorentstehung und -progression von großer Relevanz ist (Whiteside 2008) und aus verschiedenen zellulären und nichtzellulären Komponenten besteht (dazu zählen Extrazellulärmatrix, Fibroblasten, neuroendokrine Zellen, Zellen des Immunsystems sowie Blut- und Lymphgefäßsysteme) (Whiteside 2008, Joyce and Pollard 2009, Wang, Zhao et al. 2017). Den MMPs, als Teil

der ECM, kommt dabei besondere Bedeutung zu in der Förderung invasiven und metastatischen Tumorwachstums, indem sie Matrixbestandteile, welche eine Art natürliche Wachstumsbarriere für „gesunde“ Zellen darstellen, abbauen und Signalkaskaden und die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren zum Vorteil der Tumorzellen beeinflussen (Salmela, Karjalainen-Lindsberg et al. 2001, Kessenbrock, Plaks et al. 2010). Studien anderer Arbeitsgruppen bestätigen weiter, dass die beteiligten Tumorzellen die Zusammensetzung der ECM dahingehend verändern, dass ihre Beschaffenheit die Invasion maligne entarteter Zellen in umliegendes Gewebe fördert (Mathias, Chen et al. 2010, Klein-Scory, Tehrani et al. 2014, Glavey, Naba et al. 2017). Das Einwachsen von Gefäßen in den Tumor ist ab einer kritischen Größe für das Überleben der Tumorzellen essenziell. Die Stimulation dieses Vorgangs wird ebenfalls über das Tumormikromilieu reguliert (Nyberg, Salo et al. 2008, Weis and Cheresch 2011).

1.5 Fragestellung

Um o.g. Zusammenhänge näher verstehen und eventuelle pharmakologische Ansatzpunkte für eine Therapie der unter 1.2 und 1.3 genannten Erkrankungen weiterentwickeln zu können, sind präklinische Versuchsmodelle notwendig, welche das Wachstum von Tumorzellen im dreidimensionalen Raum quantifizierbar machen sowie im Weiteren deren Wechselwirkung mit der ECM beleuchten lassen (Joyce and Pollard 2009). Im Hinblick auf die zuvor genannte Relevanz der ECM im Kontext maligner Erkrankungen hat sich die Verwendung dreidimensionaler Matrices (auch: scaffolds, s.u.) in der Kultivierung von (Tumor-) Zellen etabliert (Kim 2005, Nelson and Bissell 2006, Aguado, Caffè et al. 2016, Chen, Wang et al. 2017).

Derzeit ist eine Vielzahl an Methoden bekannt, welche das Wachstum von Tumoren in vivo, d.h. im lebenden Organismus, darzustellen und ebenfalls hierin den Erfolg von anti-proliferativen Therapien zu protokollieren vermögen. Sicherlich ist die Verwendung von Mausmodellen in diesem Kontext noch immer der Goldstandard. Banerjee et al. präsentieren ein orthotopes Maustibiomodell unter Verwendung der Osteosarkomzelllinie K7M2 (Banerjee, Thayanithy et al. 2013). Nach intratibialer Injektion der Zellen wurde die Zunahme der Tumormasse durch Wiegen der Mäuse sowie Messung des Tibiaumfangs und konsekutiver Berechnung des Tumorumfanges quantifiziert. Cole et al. nutzten ein ähnliches Modell mit K7M3-Osteosarkomzellen, deren lokale Ausbreitung mittels konventionellen Röntgenaufnahmen kontrolliert wurde (Cole, Ichikawa et al. 2011). Eine weitere nichtinvasive Methode zur Quantifizierung des Tumorwachstums im Mausmodell stellen Comstock et al. vor: Mäusen wurden OS187-Osteosarkomzellen intratibial und subkutan appliziert und das konsekutive Tumorwachstum mittels Biolumineszenzbildgebung (s.u.) dargestellt (Comstock, Hall et al. 2009). Weiterhin wurden bei einigen Mäusen mit dieser Methode Lungenmetastasen detektiert. Eine quantitative Auswertung des Effekts einer Therapie mit Cisplatin war in diesen Mäusen ebenfalls möglich (Comstock, Hall et al. 2009). Edinger et al. schildern ein ähnliches Modell unter der Verwendung von biolumineszenzbildgebend detektierbaren HeLa-Zellen (Edinger, Sweeney et al. 1999). Weitere Arbeitsgruppen berichten von Methoden, welche Modalitäten wie kontrastmittelgestützte μ CT, diffusionsgewichtete MRT und Multispektralanalyse, Hochfrequenzultraschallspektroskopie oder 3D-Hochfrequenzultraschall nutzen, um eine Dynamik im

Wachstum von Tumoren darzustellen (Carano, Ross et al. 2004, Graham, Wirtzfeld et al. 2005, Banihashemi, Vlad et al. 2008, Graham, Ford et al. 2008).

Allen diesen Methoden ist gemein, dass sie mit größerem apparativem, finanziellem und personellem Aufwand verbunden sind. Weiterhin benötigt die Verwendung von Mausmodellen in jedem Fall die Genehmigung der entsprechenden Ethikkommission. Gesellschaftlich wie politisch werden Tierversuche stets kritisch beleuchtet und alternative Versuchsmodelle gefordert (Matthiessen, Lucaroni et al. 2003, Combes and Balls 2014). Eine mögliche Alternative zu konventionellen Tiermodellen bietet der CAM-Assay (Vinardell and Mitjans 2008, Rashidi and Sottile 2009, Kue, Tan et al. 2015).

Der CAM-Assay (chick chorioallantoic membrane assay, s.u.) bedient sich der Chorionallantoismembran von Hühnerembryonen als experimentelle Umgebung *in vivo*. Dabei handelt es sich um eine stark vaskularisierte Membran, welche dem sich entwickelnden Embryo u. A. zum Gasaustausch dient und welche auf Grund ihrer oberflächlichen Lage im Hühnerei für Experimente leicht zugänglich ist (Wangensteen and Rahn 1970, Nowak-Sliwiska, Segura et al. 2014). Der Assay ist ein etabliertes Modell in der Untersuchung von Tumorzellexpansion und -invasion, Angiogeneese sowie in Bereichen des tissue engineering und der regenerativen Medizin, der Infektiologie, Allergologie (Coleman 2008, Deryugina, Quigley et al. 2008, Ribatti 2008, Slodownik, Grinberg et al. 2009, Jacobsen, Große et al. 2010, Moreno-Jiménez, Hulsart-Billstrom et al. 2016).

Um einen Tumor auf der CAM zu induzieren werden mit einer definierten Anzahl Zellen zuvor beladene sog. scaffolds direkt auf die Membran übertragen (Lokman, Elder et al. 2012, Sys, Lapeire et al. 2013, Li, Pathak et al. 2015). In eigenen Vorversuchen, welche in dieser Arbeit nicht aufgeführt sind, stellte die Quantifizierung des Tumorstwachstums den Untersucher im Folgenden vor die Herausforderung, dass die Tumorzellen auf der CAM und innerhalb der Matrix wachsen. Dies erschwert eine rein videomikroskopische Kontrolle und Vermessung der Tumormasse, da sie nicht zwangsläufig vom scaffold zu differenzieren war; es kann also zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen kommen. Weiterhin besteht die Problematik in einer rein visuellen Kontrolle darin, dass ein zweidimensionales Bild zur Abbildung eines dreidimensionalen Vorgangs genutzt und das Tumorstwachstum nicht in allen drei Raumebenen abgebildet wird.

Präzisere Aussagen können durch histologische Aufarbeitung der CAM-Tumore getroffen werden (Lokman, Elder et al. 2012, Sys, Lapeire et al. 2013, Li, Pathak et al. 2015). Diese geht jedoch zwangsläufig mit dem Beenden des Versuchs einher. Um eine sequenzielle, histologische Beurteilung der Entwicklung des Tumorwachstums über mehrere Tage in einem solchen Zusammenhang zu gewährleisten, ist daher eine größere Anzahl an Versuchsansätzen nötig.

Diese Arbeit beschreibt als Erste die nichtinvasive Quantifizierung von Tumorwachstum unter Verwendung eines bildgebenden Verfahrens über einen Zeitraum von mehreren Tagen in einem alternativen Tiermodell, dem CAM-Assay. Dies wurde am Beispiel von Osteosarkom- und Prostatakarzinomzellen unter Integration zweier kommerziell erhältlicher scaffolds (Cultrex® und Gelfoam®, s.u.) demonstriert, welche durch Biolumineszenzbildgebung dargestellt werden konnten. Die Verwendung von Osteosarkomzellen erfolgte vor dem Hintergrund der noch immer teilweise mangelhaften Therapiemöglichkeiten der Erkrankung, welche zudem vorwiegend bei Kindern und Heranwachsenden auftritt. Es bestanden zum Zeitpunkt der Durchführung der hier aufgeführten Experimente bereits Vorversuche mit Prostatakarzinomzellen (hier nicht aufgeführt), sodass diese Zellen als verlässliche Kontrolle fungieren sollten.

Der geringe materielle und finanzielle Aufwand sowie die leichte Zugänglichkeit der Tumore und die einfache Handhabung der Methode machen sie zu einer attraktiven Alternative bei Fragestellungen, welche eine Quantifizierung von Tumoren in vivo erfordern.

2 Material und Methoden

2.1 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Cellstar® 6-Well Multiwell-Platten	Greiner Bio-one
Cellstar® 96-Well Multiwell-Platten	Greiner Bio-one
Cellstar® Polypropylen Röhrchen 15 ml	Greiner Bio-one
Cellstar® Polypropylen Röhrchen 50 ml	Greiner Bio-one
Cellstar® T25 Zellkultur Flaschen 25 cm ²	Greiner Bio-one
Cellstar® T75 Zellkultur Flaschen 75 cm ²	Greiner Bio-one
Cultrex® Basement Membrane Matrix	Trevigen®
Gelfoam® absorbable gelatine compressed sponge	Pfizer®
Parafilm	IDL GmbH & Co. KG
Pipettenspitzen (mit/ohne Filter) 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Greiner Bio-one
Reaktionsgefäß 1,6 ml	Biozym Scientific
Reaktionsgefäß 2,0 ml	Biozym Scientific
Serologische Pipetten 5ml, 10 ml, 25ml, 50ml	Biozym Scientific
Silikonringe 5 mm Außendurchmesser, 4 mm Innendurchmesser	Eigene Herstellung
Zellstoff 5 mm x 5 mm, sterilisiert	Eigene Herstellung

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

2.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Analytische Waage AT250	Mettler Toledo, Gießen, Germany
Axiovert 25 Mikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Einkanalpipette 10 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einkanalpipette 100 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einkanalpipette 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einkanalpipette 20 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACS Vantage	BD Bioscience
FormaTM 900 series	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Fusion FX 7	Peqlab GmbH (VWR Life Science)
Hera Safe HS 12 Werkbank	Kendro Laboratory Products, Langenselbol, Deutschland
Heracell 150 Incubator	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
HERAFreeze BASIC	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Herasafe KS 12 Werkbank	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Neubauer Zählkammer	Marienfeld Laborglaswaren, Lauda-Königshofen, Deutschland
Observer Z1 Mikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Wasserbad	Grant Instruments, Cambridge, UK
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zeiss Axio Vert.A1 Mikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Tabelle 2: Geräte

2.3 Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
Aqua dest. (steril)	B. Braun
D-Luziferin	ZellBio GmbH, Ulm, Germany
Dulbecco's Modified Eagles Medium	Sigma Aldrich
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma Aldrich
Entellan Eindeckmedium	Merck GmbH, Darmstadt
Ethanol	Merck Millipore
FBS (fetal bovine serum)	Biochrom
Lentiviruspartikel LVP402	Amsbio, Abingdon, UK
L-Glutamin 200 mM	Sigma Aldrich
RPMI-1640 Medium	Sigma Aldrich
Trypanblau Lösung	Sigma Aldrich
Trypsin-EDTA-Lösung	Sigma Aldrich
LVP402 Lentiviruspartikel	amsbio

Tabelle 3: Reagenzien

2.4 Software

Software	Hersteller/Entwickler
ImageJ	Wayne Rasband (NIH)
GraphPad Prism V.6	GraphPad Software, Inc.; la Jolla, USA
Axiovision	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Fusion-Capt	Vilber Lourmat Deutschland GmbH
Zen Lite 2012	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Tabelle 4: Software

2.5 Verwendete Zelllinien

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zellen handelte es sich um die Osteosarkomzelllinien MG-63 und HOS sowie um die Prostatakarzinomzelllinie PC-3, welche wir Dank freundlicher Zusammenarbeit mit der Klinik und Poliklinik für Urologie des Universitätsklinikums rechts der Isar, Technische Universität München, erhielten. MG-63 wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen, HOS erhielten wir mit freundlicher Genehmigung des Instituts für Strahlenbiologie am Helmholtz-Zentrum München.

2.6 Zellkultur

Zellkultur beschreibt das Heranzüchten von humanen oder auch tierischen Zellen in aseptischen Kulturgefäßen unter definierten Bedingungen. Es wird unterschieden zwischen Zellen, welche am Kulturgefäß anhaftend wachsen (adhärentes Wachstum) und solchen, welche in Suspension im Gefäß kultiviert werden (nicht-adhärentes Wachstum). Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zellen handelte es sich um adhärent wachsende Zellen.

Diesen Zellen ist gemein, dass Ihnen im Kulturgefäß ein Nährmedium zugesetzt wird. Diese Media enthalten eine Lösung aus anorganischen Salzen, Aminosäuren, Vitaminen und Glukose (Sigma-Aldrich/Merck 2018, Sigma-Aldrich/Merck 2018) und ermöglicht den Zellen somit Wachstum innerhalb des Kulturgefäßes. Das Medium enthält außerdem den pH-Indikator Phenolrot, welcher bei Ansäuerung des Mediums einen Farbumschlag von Rot nach Gelb bewirkt.

Alle Zelllinien wurden mit 20 ml Medium in Kulturgefäßen mit 75 ml Fassungsvermögen bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Das Wachstum der Zellen wurde täglich unter dem Mikroskop betrachtet. Ließ sich ein dichter Zellrasen im Gefäß feststellen (konfluierendes Wachstum), wurden die Zellen subkultiviert (Splitting). Dazu wurde das Kulturmedium zunächst entfernt, die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin benetzt. Trypsin löst die Verbindungen der Zellen untereinander sowie die der Zellen zum Kulturgefäß. Um eine ausreichende Trypsinierung zu erreichen, wurden die Zellen im Folgenden einige Minuten entweder bei Raumtemperatur oder in einem Inkubator bei 37 °C gelagert. Daraufhin wurde die Trypsinierung unter dem Mikroskop überprüft und, wenn diese

ausreichend war, durch Zugabe von 8 ml Kulturmedium gestoppt. Die nun gelösten und in Suspension befindlichen Zellen wurden im Verhältnis von 1:5 auf neue Kulturgefäße verteilt und im Inkubator weiter kultiviert.

MG-63 wurden kultiviert in DMEM, versetzt mit 10% FBS, 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin und 1% L-Glutamin. HOS wurden kultiviert in RPMI-1640, ebenfalls versetzt mit den oben genannten Zusätzen. PC-3-Zellen wurden in RPMI-1640 mit 10% FBS und 1% nicht-essentieller Aminosäuren kultiviert.

2.7 3D-Tumormatrices

2.7.1 Cultrex®

Cultrex® (Trevigen®) stellt eine farblose, lösliche Form von Bestandteilen der Basalmembran dar (Basalmembranextrakt, BME). Die Hauptbestandteile sind Laminin, Kollagen IV, Entactin und Proteoglykane. Eine Wachstumsfaktor-reduzierte Form des BME wurde in dieser Arbeit verwandt. Die gelartige Substanz ist bei 4 °C flüssig und härtet bei Raumtemperatur aus, gelagert wurden die Proben bei -20 °C. Zur Versuchsdurchführung wurden die BME-Proben bis zur Verwendung auf Eis bei etwa 4°C gelegt, so wurde ein ausreichender Viskositätsgrad erreicht, bei dem BME und Zellen in Suspension gebracht werden konnten. Bei der Verwendung im CAM-Assay wurden 10 µl Cultrex® mit den jeweiligen Zellen vermischt und auf die CAM aufgetragen (s.u.).

2.7.2 Gelfoam®

Gelfoam® (Pfizer®) ist eine poröse, schwammartige Gelatinematrix, welche aus aufbereiteter Schweinehaut gewonnen wird. Die Gitterstruktur dieser Matrix bewirkt, dass sie ein Vielfaches ihres Eigengewichts in Form von Flüssigkeiten aufnehmen kann. Zur Verwendung bei der Kultivierung von Zellen wurden unter aseptischen Bedingungen etwa 2 mm x 2 mm messende Würfel aus dem Material geschnitten und mit der entsprechenden Zellsuspension in einer 96-Well-Platte vermengt (s.u.).



Abbildung 1: Gelfoam

2.8 CAM-Assay

2.8.1 Anatomie und Physiologie

Die Chorionallantoismembran beschreibt eine extraembryonale Membran, welche sich im befruchteten Hühnerei am 3. Entwicklungstag des Hühnerembryos auszubilden beginnt und zwischen dem 10. und 13. Tag vollständig entwickelt ist. (Nowak-Sliwinska, Segura et al. 2014) Der Embryo betreibt über diese Membran Gas- und Stoffaustausch (Wangensteen 1972, Tuan 1987).

Der Aufbau der CAM ist dreischichtig und besteht aus Ektoderm, Mesoderm und Endoderm (Fuchs and Lindenbaum 1988). Er ergibt sich aus der Verschmelzung von Chorion- und Allantoismembran im Verlauf der Embryonalentwicklung (Ribatti 2016). In deren mittlerer, mesodermaler Schicht befindet sich nahe des Ektoderms ein prominentes vaskuläres Netzwerk, welches bereits makroskopisch sichtbar wird.

2.8.2 Versuchsablauf

Zur Durchführung des CAM-Assays wurden Eier mit einer Mindestfertilitätsrate von 80% von einer kommerziellen Brüterei bestellt (Brüterei Süd, Regenstauf). Die verwendeten Instrumente wurden im Vorfeld sterilisiert und alle Versuchsschritte unter aseptischen Bedingungen durchgeführt.

Die Entwicklung des Embryos bis zum Schlupf dauert 21 Tage (Hamburger and Hamilton 1992). Unter Laborbedingungen wurden die Eier bei 37 °C inkubiert. Der erste Inkubationstag wurde als embryonaler Entwicklungstag 0 (EET 0) bezeichnet und die darauffolgenden Tage entsprechend aufsteigend beziffert.

Am Tag der Ankunft (Arrival, EET 0) wurden alle Eier zunächst mit der Spitze nach unten zeigend bei 37 °C gelagert und so für vier Tage inkubiert.

Am vierten Tag (EET 4) erfolgte die Eröffnung der Eierschale (Opening): zunächst wurde die äußere Schale mit 70% EtOH desinfiziert und alle Eier gedreht, sodass die Spitze nach oben zeigt. Dies sollte im Folgenden ein Anhaften der CAM an der Innenseite der Eierschale verhindern. Mit einer Kleinbohrmaschine wurde eine Öffnung in die Schale gefräst

und diese dann mit einer Pinzette auf etwa 10 mm Durchmesser weiter vergrößert. Daraufhin wurde die Öffnung mit Parafilm® verschlossen und alle Eier für weitere vier Tage inkubiert.

Am achten Tag der Embryonalentwicklung (EET 8) erfolgte eine Vergrößerung der Öffnung (Enlargement) auf ca. 20 mm Durchmesser, Wiederverschluss mit Parafilm® und weitere Inkubation für 24 Stunden. Tote oder unbefruchtete Eier wurden an dieser Stelle aussortiert.

Am EET 9 fand das Aussäen der Zellen auf die CAM statt (Seeding). Zunächst wurde die CAM mit einem zuvor sterilisierten kleinen Stück Zellstoff lazeriert und so eine kleine Blutung verursacht (Bleeding). Nach Auftragen der Zellen auf die CAM begünstigt dieser Schritt die lokale Ausbildung von Tumoren (Armstrong, Quigley et al. 1982). Auf der Blutung wurde dann ein Silikonring mit einem Außen- und Innendurchmesser von 5 mm, respektive 4 mm platziert. Dieser diente der Fixierung der Zellen auf der CAM und erleichterten Lokalisierung im weiteren Versuchsverlauf.

2.8.2.1 Seeding in BME

Zur Vorbereitung des Seedings in BME wurden pro CAM 2×10^6 Osteosarkomzellen in 10 μ l Medium resuspendiert, 10 μ l Cultrex® hinzugegeben und die Suspension innerhalb des Silikonrings auf die CAM pipettiert. Bei Versuchen mit Prostatakarzinomzellen wurden 2×10^6 und 1×10^6 Zellen pro CAM nach gleichem Protokoll behandelt.

Die in Folge anwachsenden Tumor wurden mit MG-63-RL-BME, HOS-RL-BME und PC-3-GL-BME bezeichnet.

2.8.2.2 Seeding in Gelfoam®

Für das Seeding in Gelfoam® wurden zunächst unter aseptischen Bedingungen etwa 2 mm x 2 mm messende Würfel aus Gelfoam® geschnitten und diese in 96-well-Platten platziert. Pro CAM wurden 2×10^6 Zellen in 20 μ l Medium resuspendiert und auf den Gelfoam®-Würfel aufgetragen. Auf Grund der schwammartigen Konsistenz des Trägers wurde die Suspension innerhalb kurzer Zeit aufgenommen. Anschließend wurde die so mit Zellen „beladene“ Matrix auf der CAM innerhalb des Silikonrings platziert.

Nach erfolgreichem Seeding wurden die Eier wieder mit Parafilm® verschlossen und unter oben genannten Bedingungen weiter inkubiert.

Am EET 16 wurde der Versuch beendet, indem die Eier für 30 Minuten auf Trockeneis gelagert wurden. Die CAM wurde tumornah mit chirurgischem Instrumentarium geschnitten, mit PBS gewaschen, in Petrischalen mit 2 ml 4%iger Formaldehydlösung überführt und bei 4 °C konserviert.

Alle bildgebenden Verfahren wurden im Verlauf des Versuchs wie unten beschrieben durchgeführt.



Abbildung 2: Tumor auf dem ausgedehnten Gefäßbett der CAM.
Zu sehen ist ein Versuchsansatz mit einem Tumor innerhalb des Silikonrings bei 11 Uhr, außerdem eine den Tumor umgebende Blutung. Am linken unteren Rand sind Teile des Embryos sichtbar.



Abbildung 3: Versuchsansatz mit Tumoren auf der CAM.
Die Tumoren sind zu sehen als weißliche Strukturen innerhalb des Silikonrings.



Abbildung 4: Versuchsaufbau im Inkubator.
Mit Parafilm verschlossene Eier werden bei 37 °C inkubiert.

2.9 Lentivirale Transduktion

Transduktion bezeichnet den Vorgang, durch welchen Erbgut mittels eines Virus oder eines Bakteriums in einen Wirt, z.B. eine tierische oder menschliche Zelle, eingebracht und im Folgenden entweder in das Wirtsgenom integriert wird oder frei im Zytoplasma der Wirtszelle vorliegt.

Im Zusammenhang mit viraler Transduktion dient dieser Vorgang primär der Vermehrung des Virus. Dieser greift durch jenes „importierte“ Stück Erbinformation in den Zellzyklus ein und verändert das Proteinexpressionsmuster der Wirtszelle so zu seinen Gunsten. Im klinischen Kontext ist dieser Mechanismus im Rahmen der Pathophysiologie einer Vielzahl an humanpathogenen Viren (z. B. HIV) bekannt.

In der Forschung wird Transduktion genutzt, um mittels eines Viruspartikels eine Zelle mit zusätzlichen Eigenschaften zu versehen. Dadurch wird die Zelle z.B. zur Expression von einem Gen oder mehrerer Gene befähigt, welche diese Zelle von anderen Zellen unterscheidbar macht (Reportergen). Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Transduktion zwei Lentiviren verwendet, welche jeweils ein Reportergen trugen. Osteosarkomzellen wurden mit einem dualen Firefly luciferase-RFP-Reportergen transduziert (LVP402, amsbio), PC-3 Zellen mit einem Firefly luciferase-GFP-Reportergen. Diese Reporter Gene sollten die Zellen zur Expression des Enzyms Luziferase und der fluoreszierenden Proteine RFP, respektive GFP befähigen. Weiterhin enthielt der Reporter ein Gen, welches die transduzierten Zellen mit einer Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Neomycin versah.

Zur Transduktion wurden in 24-well-Platten 50.000 Zellen pro well mit 0,5 ml entsprechendem Medium ausgesät und 16 Stunden inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Exposition gegenüber $\sim 1 \times 10^7$ IFU/ml des jeweiligen Lentivirus und weitere Inkubation für 72 Stunden. Die verwendeten Lentiviren waren dabei nicht replikationsfähig.

Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen zunächst in Neomycin-haltigem Medium kultiviert (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Erfolgreich transduzierte Zellen wurden so selektiert, da alle weiteren Zellen, bei denen die Transduktion nicht geglückt war, in diesem Medium nicht überlebensfähig waren. Eine weitere Differenzierung erfolgte durch Selektion der Zellen nach

der Expression der fluoreszierenden Proteine RFP und GFP mittels FACS-Analyse (BD Bioscience).

Nach diesem Selektionsprozess wurden die selektierten, transduzierten Zellen unter o.g. Bedingungen kultiviert. Die resultierenden Zellreihen wurden mit MG-63-RL, HOS-RL und PC-3-GL bezeichnet. Der Firefly Luciferase-RFP-Reporter wurde kommerziell von der Firma amsbio erstanden; die bereits transduzierten Prostatakarzinomzellen wurden mit freundlicher Genehmigung der Kollegen der Klinik und Poliklinik für Urologie des Universitätsklinikums rechts der Isar, Technische Universität München, zu Verfügung gestellt.

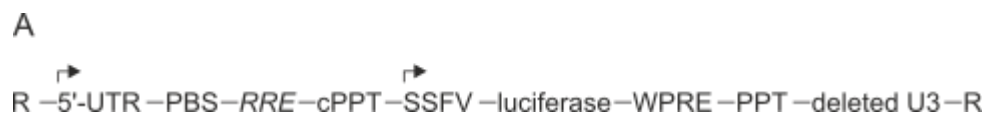


Abbildung 5: Vektorkarte PC-3-GL



Abbildung 6: Vektorkarte HOS-RL, MG-63-RL

2.10 Biolumineszenz

Biolumineszenz beschreibt ein in der Natur weit verbreitetes Phänomen zur Erzeugung von Licht als Folge einer biochemischen Reaktion. Genauer entstehen bei der Reaktion eines Enzyms mit entsprechenden Substraten unter Verbrauch von Sauerstoff Endprodukte, welche in Folge zerfallen und Energie in Form von Photonen freisetzen (Wilson and Hastings 1998). Diese Photonen können als sichtbares Licht mit einer entsprechend sensiblen Kamera detektiert werden.

Bei dem in dieser Arbeit angewandten Enzym handelt es sich um die Luziferase „Firefly luciferase“, das korrespondierende Substrat war D-Luziferin.

2.10.1 Biolumineszenzbildgebung in vitro

6-Well-Platte

1,5 x 10⁶ Zellen wurden pro Well ausgesät und 16 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 4 ml PBS gewaschen, PBS anschließend wieder entfernt. Nach Zugabe von 4 ml Medium mit D-Luziferin zu einer Konzentration von 150 µg/ml erfolgte die Biolumineszenzbildgebung (BLI).

Wildtypkontrollen wurden ebenfalls zu 1,5 x 10⁶ Zellen pro Well ausgesät und auf gleiche Art auf ein Biolumineszenzsignal untersucht.

Verdünnungsreihe in 96-Well-Platte

In einer 96-well-Platte wurden Zellen in dreifacher Verdünnung ausgesät, ausgehend von 39.000 Zellen. Nach 16 Stunden Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 100 µl PBS pro Well gewaschen und PBS im Anschluss wieder entfernt. Nach Zugabe von 100 µl Medium mit D-Luziferin zu einer Konzentration von 150 µg/ml pro Well erfolgte die Biolumineszenzbildgebung. Die entsprechenden Wildtypkontrollen wurden nach gleichem Protokoll behandelt.

2.10.2 Biolumineszenzbildgebung in vivo

Zur Bildgebung der Zellen auf der CAM (s.o.) wurden 30 µl PBS mit D-Luziferin zu einer Konzentration von 30 mg/ml direkt auf die Zellen pipettiert und diese anschließend bildgebend dargestellt. Alle CAMs wurden in Gruppen von vier CAMs – zwei Wildtypkontrollen und zwei CAMs mit Zellen in Trägermaterialien aus den experimentellen Gruppen – der Bildgebung unterzogen. Dies erfolgte ab EET 10, dem ersten Tag nach Seeding der Zellen.

Alle Bilder wurden mit einem Fusion FX7 der Firma peqlab/VWR angefertigt. Die Belichtungszeit betrug 10 Minuten. Die Analyse der Bilder erfolgte mit ImageJ, die statistische Auswertung mit GraphPad PRISM.

2.11 Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopie beschreibt eine Variante der Lichtmikroskopie, bei der Licht einer bestimmten Wellenlänge verwendet wird, um Fluoreszenzfarbstoffe zur Emission von Licht einer anderen Wellenlänge anzuregen. Im Gegensatz zur Biolumineszenzbildgebung bietet die Fluoreszenzmikroskopie die Möglichkeit, Bildgebung in Einzelzellauflösung durchzuführen. Dies ermöglicht das Lokalisieren der einzelnen Zellen innerhalb des gesetzten Tumors und in Relation zu umliegenden Strukturen. Diese „Perspektive“ bietet die Biolumineszenz in der hier angewandten Form nicht, da Letztere stets die Gesamtheit der transduzierten Zellen darstellte.

Die Anregung von RFP und GFP erfolgt bei jeweils 630 nm und 525 nm. Die Darstellung der Zellen in vitro erfolgte mittels Mikroskopie durch das Kulturgefäß. Im Rahmen des CAM-Assays wurden die jeweiligen Tumore nach Versuchsende entnommen, auf einem Objektträger platziert und so mikroskopiert.

2.12 Wiegen der Tumore

Die Tumore wurden zunächst unter einem Zeiss Stemi DV4 Stereomikroskop aus der CAM geschnitten. Im Anschluss wurden die Tumore in zuvor gewogene Reaktionsgefäße mit jeweils 200 µl PBS überführt und einzeln gewogen.

2.13 Histologische Färbung

Zur Färbung wurden die Tumore zunächst über 16 Stunden bei 4 °C in 4%-iger Paraformaldehydlösung fixiert. Im Anschluss wurden die Gewebeproben in 2,5 µm dünne Sektionen geschnitten. Die Schnitte wurden dann mit Xylen und einer Alkoholverdünnungsreihe entparaffiniert und rehydriert, dann für 5 Minuten in Hämatoxylinlösung gefärbt. Nach der Färbung wurden die Proben in Leitungswasser, entionisiertem Wasser und 95%-igem saurem Ethanol für jeweils 5 Minuten, 2 Minuten und 20 Sekunden gewaschen. Danach wurden die Schnitte einer weiteren Färbung mit Eosin B über 2 Minuten unterzogen, mit einer in der Konzentration ansteigenden Reihe von Alkoholbädern dehydriert und schließlich in Entellan Eindeckmedium (Merck GmbH, Darmstadt) eingebettet.

Die Schnitte wurden mit einem Zeiss Axio Vert.A1 Mikroskop begutachtet. Mikroskopiebilder wurden mit der Zen Lite 2012 Software (Carl Zeiss) angefertigt.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis von Biolumineszenz und Fluoreszenz in PC-3-GL-Zellen in vitro

Nach Aussaat von PC-3- und PC-3-GL Zellen in 6-well-Platten ließ sich nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden im Bereich der transduzierten Zellen ein Biolumineszenzsignal detektieren (Abb. 7B); erwartungsgemäß blieb dieses Signal im Bereich der Wildtypzellen aus (Abb. 7A). Des Weiteren konnte die Expression von GFP in transduzierten Zellen fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden (Abb. 7C, Hellfeld-Bild rechts oben eingesetzt). Eine mit PC-3-GL-Zellen angelegte Verdünnungsreihe zeigte ein lineares Verhältnis zwischen Zellzahl und Lichtemission (Abb. 7D, Korrelationskoeffizient nach Pearson: $r = 0,9959$; $p < 0,05$). Diese Ergebnisse suggerierten, dass Biolumineszenz eine geeignete Methode zur Evaluation des Wachstums von PC-3-GL-Zellen sei.

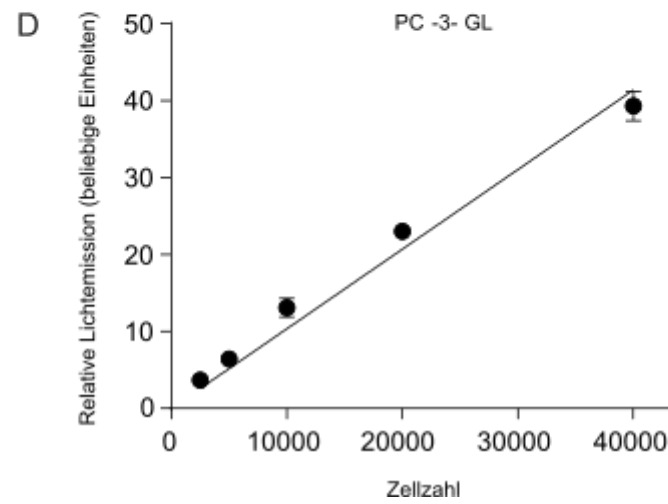
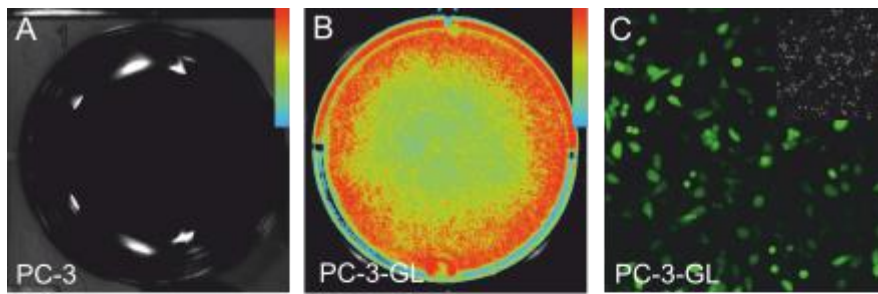


Abbildung 7: Bildgebung von PC-3- und PC-3-GL-Zellen in vitro.

3.2 Biolumineszenzbildgebung von PC-3-GL-BME-Tumoren in vivo

Zur Durchführung der in-vivo-Experimente unter Verwendung eines BME-scaffolds wurden 2×10^6 PC-3-Wildtypzellen als Negativkontrolle ($n = 7$), 1×10^6 PC-3-GL-Zellen ($n = 14$) sowie 2×10^6 PC-3-GL-Zellen ($n = 11$) in BME auf die CAM aufgetragen.

Am 10. embryonalen Entwicklungstag (EET10) erfolgte eine Biolumineszenzbildgebung, welche kein Signal im Bereich von PC-3-BME-Wildtypumoren nachweisen konnte (Abb. 8A). Beide Ansätze, bei denen PC-3-GL-Zellen verwendet wurden, konnten ein Signal wiedergeben (Abb. 8B, 8C). Tumore, welche mit 2×10^6 Zellen gesät wurden, wiesen eine 1,7-fach höhere Lichtemission auf als solche, die ausgehend von 1×10^6 gesäten Zellen auf der CAM wuchsen (Abb. 8D).

Am EET 16 erfolgte eine weitere Biolumineszenzmessung der bis zu diesem Versuchstag verbliebenen PC-3-GL-BME-Tumore. In Folge wurde der Versuch nach oben beschriebenen Protokoll beendet, die CAM tumornah ausgeschnitten und die Präsenz von GFP-exprimierenden Tumorzellen im Gewebeverband mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen (Abb. 8E). Nach histologischer Aufarbeitung ließen sich durch Hämatoxylin-Eosin-Färbung ebenfalls Zellen im Gewebe nachweisen (Abb. 8F). Die Grenze zum umliegenden Stroma der CAM ist in den entsprechenden Abbildungen mit Pfeilen gekennzeichnet.

Im Folgenden wurden die Tumore gewogen. Zwischen der Intensität des BLI-Signals am EET16 und dem Tumorgewicht konnte in diesem Zusammenhang eine positive Korrelation gezeigt werden (Abb. 8G; PC-3-GL-BME 1×10^6 : $n = 3$; PC-3-GL-BME 2×10^6 : $n = 2$; gesamt: $n = 5$; Korrelationskoeffizient nach Pearson: $r = 0,8463$).

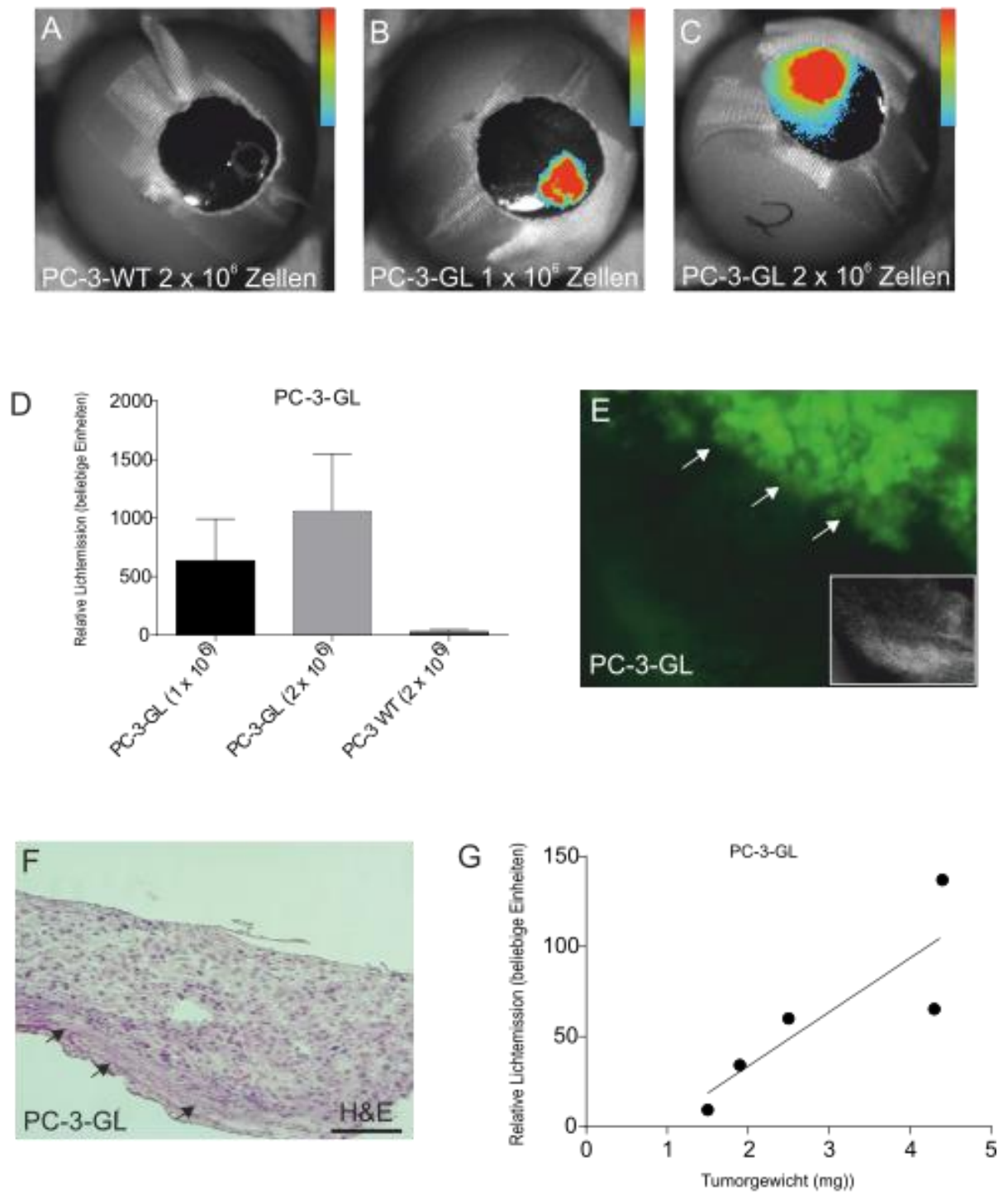


Abbildung 8: Bildgebung von PC-3-BME- und PC-3-GL-BME-Tumoren in vivo.

3.3 Nachweis von Biolumineszenz und Fluoreszenz in MG-63-RL- und HOS-RL-Zellen in vitro

Bildgebung der Wildtypzellen in vitro produzierte kein Biolumineszenzsignal (Abb. 9A, 9D). Sowohl für MG-63-RL als auch für HOS-RL konnte jedoch ein Signal registriert werden (Abb. 9B, 9E), ebenfalls konnte die Expression von RFP unter dem Fluoreszenzmikroskop gezeigt werden (Abb. 9C, 9F). Eine für jeweils beide Zelllinien angefertigte Verdünnungsreihe wies ein lineares Verhältnis von BLI-Signalintensität zu Zellzahl auf (Abb. 9G, 9H, Korrelationskoeffizient nach Pearson: 0,9997 [MG-63-RL], 0,9922 [HOS-RL]; $p < 0,05$). Es wurde auch hier geschlussfolgert, dass Biolumineszenz zur Quantifizierung des Zellwachstums von MG-63 und HOS verwendet werden kann.

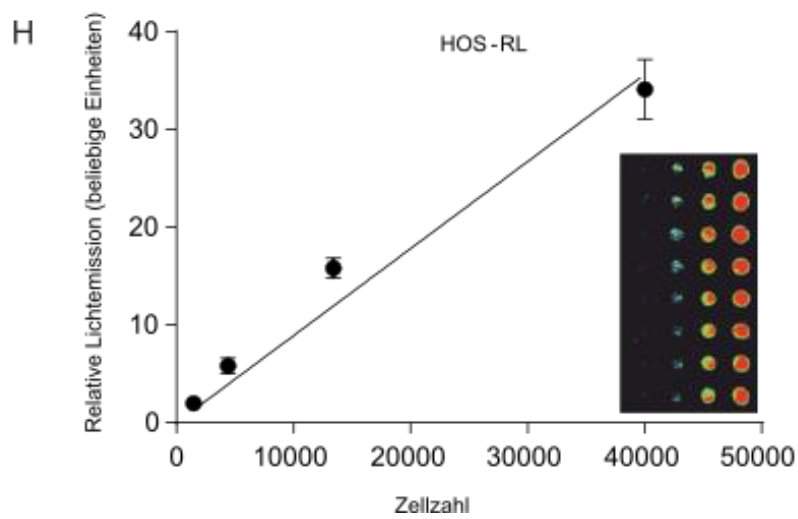
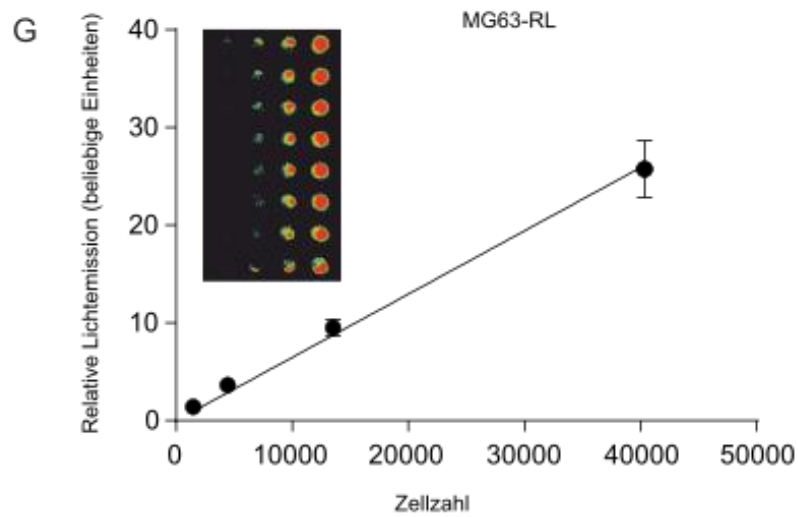
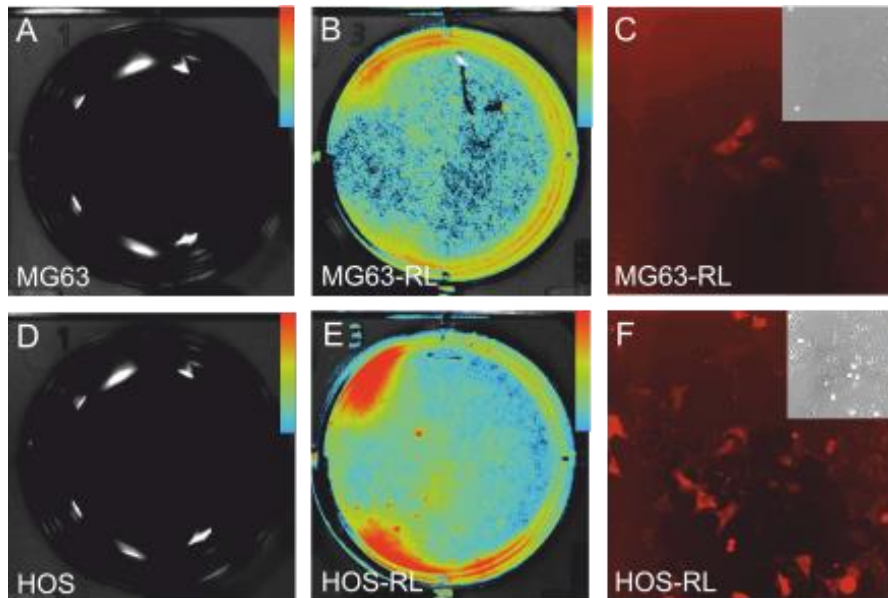


Abbildung 9: Bildgebung von HOS-, MG-63-, HOS-RL-, MG-63-RL-Zellen in vitro.

3.4 Biolumineszenzbildgebung von MG-63-RL-BME- und HOS-RL-BME-Tumoren in vivo

Für beide Zelllinien wurden pro Versuchsansatz je 2×10^6 Zellen in BME auf der CAM kultiviert (MG-63-RL-BME: $n = 5$; HOS-RL-BME: $n = 3$). Als Negativkontrollen wurden, korrespondierend zu oben genannten Experimenten, MG-63-BME- und HOS-BME-Wildtyp-tumore verwendet (MG-63-BME: $n = 5$; HOS-BME: $n = 3$). Keine der Wildtypkontrollen lieferte ein Signal in der Biolumineszenzbildgebung (Abb. 10A, 10G), welche für diese beide Gruppen am EET10 erfolgte.

Die Untersuchung der RL-BME-Tumore auf ein Biolumineszenzsignal erfolgte über einen Zeitraum von vier Tagen von EET10 – EET13. Am EET10 konnte über MG-63-RL-BME- und HOS-RL-BME-Tumoren eine starke Lichtemission registriert werden (Abb. 10B, 10H). Für beide Zelllinien zeigte sich im Folgenden ein ähnlicher Verlauf: die Signalintensität im Bereich von MG-63-RL-BME-Tumoren nahm über die folgenden drei Tage um 20%, 76% und letztlich 86% ab (Abb. 10C-F). HOS-RL-BME-Tumore zeigten eine Verminderung des Signals um 69%, 83% und 86% bis zum EET13 (Abb. 10I-L).

Beide Versuche wurden am EET13 beendet, die CAM tumornah exzidiert und die Tumore fluoreszenzmikroskopisch dargestellt. Sowohl in MG-63-RL-BME- als auch HOS-RL-BME-Tumoren konnten RFP-exprimierende Zellen schwach dargestellt werden (Einschub Abb. 10F, 10L).

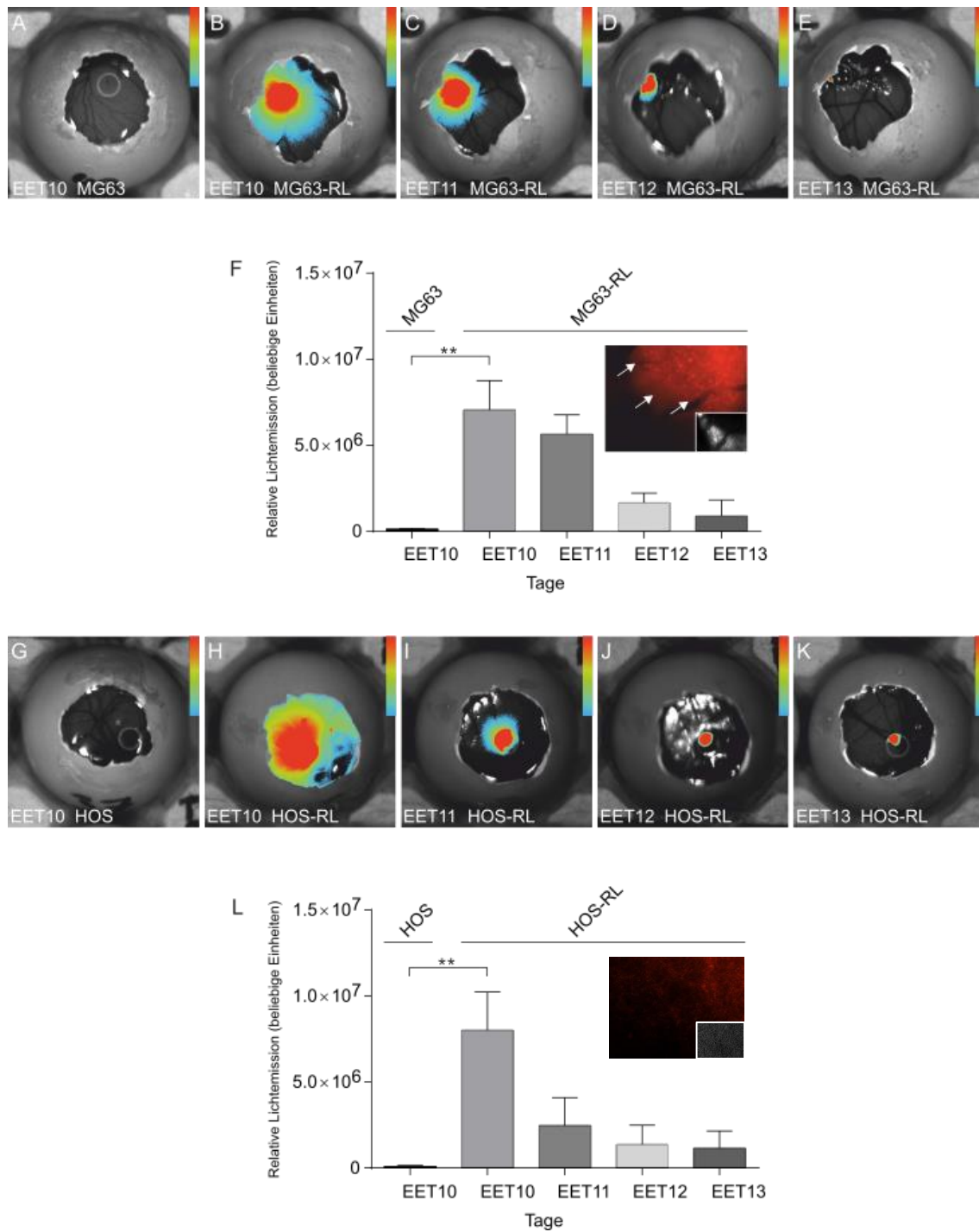


Abbildung 10: Bildgebung von HOS-, MG-63-, HOS-RL-BME-, MG-63-RL-BME-Tumoren in vivo.

3.5 Biolumineszenzbildgebung von MG-63-RL-Gelfoam®- Tumoren in vivo

Als Alternative zum BME wurde im Folgenden ein Gelatinekonstrukt als Matrix für MG-63-RL-Zellen geprüft. Aussaat und Kultivierung der Zellen im Gelfoam® scaffold wurden nach zuvor beschriebenem Protokoll durchgeführt. Die Biolumineszenzbildgebung erfolgte analog zu den bisher geschilderten in-vivo-Versuchen. MG-63-Gelfoam®-Wildtyp-tumore als Negativkontrolle wiesen am EET10 kein Biolumineszenzsignal auf (Abb. 11A, n = 10). Über MG-63-RL-Gelfoam®-Tumoren konnte am EET10 ein Signal registriert werden (Abb. 11B, n = 13), welches im Verlauf der folgenden zwei Tage einen Zuwachs aufwies: EET11 und EET12 zeigten eine Zunahme der Signalintensität um 51%, respektive 84,3% des Ausgangswertes. Am EET13 fiel das Signal auf 75% des maximal gemessenen Wertes vom EET12. Eine weitere konsekutive Abnahme des Signals auf 37,4%, 31,5% und 14,8% des Maximalwertes folgte an den letzten drei Versuchstagen (Abb. 11C-I).

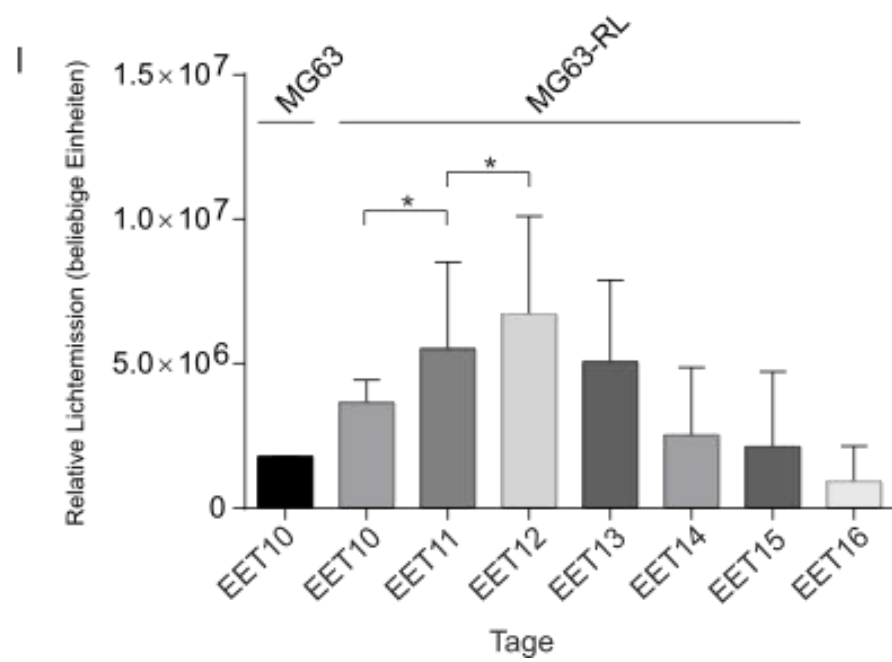
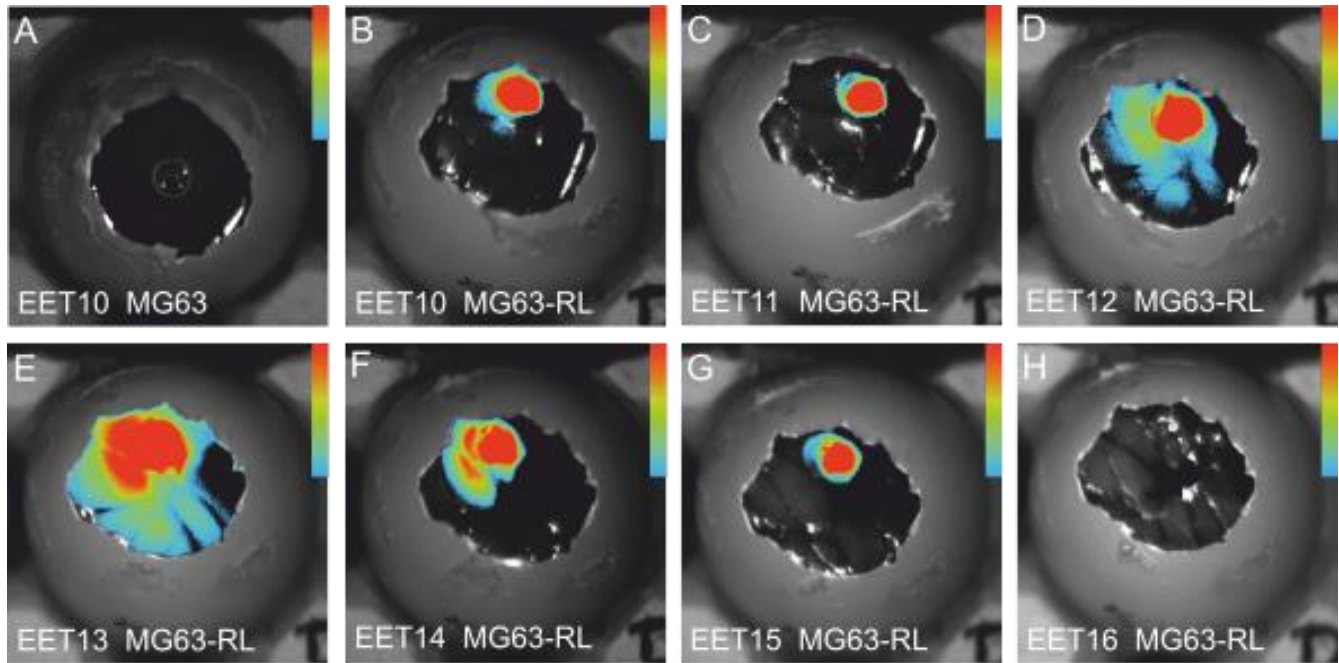


Abbildung 11: Bildgebung von MG-63- Gelfoam[®]-, MG-63-RL-Gelfoam[®]-Tumoren in vivo.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eine Methode zur Quantifizierung des Wachstums von Prostatakarzinom- und Osteosarkomzellen im alternativen Tiermodell unter Verwendung von nichtinvasiven, bildgebenden Verfahren vorgestellt. Weiterhin wurde die Anwendung zweier kommerziell erhältlicher scaffolds in der Kultivierung jener Zellen *in vivo* demonstriert.

Die Anwendung der Biolumineszenz-Bildgebung auf *in vitro* kultivierte Zellen wies für alle verwendeten Zellarten vergleichbare Ergebnisse auf. PC-3-, MG-63- und HOS-Wildtypzellen wiesen erwartungsgemäß kein BLI-Signal auf. Nach lentiviraler Transduktion konnte sowohl in PC-3-GL-Zellen als auch in MG-63-RL- und HOS-RL-Zellen der Nachweis von Biolumineszenz *in vitro* gestellt werden. Jenkins et al. demonstrierten dies bereits für biolumineszente PC-3-Zellen (Jenkins, Oei et al. 2003). Da sich eine positive Korrelation zwischen Zellzahl und Lichtemission zeigte, wurde geschlossen, dass diese Form der Bildgebung in der Quantifizierung von Tumoren auf der CAM geeignet sei.

PC-3-GL-BME-Tumore wiesen *in vivo* eine Steigerung der Signalintensität bei Steigerung der Zellzahl auf. Infolge wurden die Tumore nach Beendigung der entsprechenden Versuche aus der CAM tumornah herausgeschnitten und gewogen. Letzteres stellt eine etablierte Methode zur Quantifizierung von Tumormasse dar (Euhus, Hudd et al. 1986). Zwischen dem Gewicht der Tumore und dem BLI-Signal wurde eine positive Korrelation deutlich.

Die Kultivierung von MG-63-RL- und HOS-RL-Tumoren *in vivo* ermöglichte eine konsekutive bildgebende Darstellung des Tumorwachstums über einen Zeitraum von bis zu acht Tagen. Unter Verwendung von BME als scaffold konnte für beide Zellarten eine kontinuierliche Abnahme des BLI-Signals registriert werden. Nach Beendigung des Versuchs am EET13 wurden die Tumore aus der CAM herausgeschnitten und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Es konnten fluoreszenzmikroskopisch sowohl MG-63-RL- als auch HOS-RL-Zellen im Gewebeverband nur schwach dargestellt werden.

Die Verwendung von Gelfoam® in der Kultivierung von MG-63-RL-Tumoren in vivo ermöglichte ebenfalls eine quantitative Darstellung über mehrere Tage, es zeigte sich jedoch eine andere Dynamik in der Biolumineszenz-Bildgebung. Das BLI-Signal von MG-63-RL-Gelfoam®-Tumoren zeigte eine Steigerung um bis zu 84,3% des Ausgangswertes innerhalb der ersten drei Tage nach Aussaat der Zellen auf der CAM. Im Folgenden zeigte sich auch hier ein Abfall des Signals über die darauffolgenden vier Tage.

Es zeigte sich daher, dass das BLI-Signal unter Verwendung unterschiedlicher scaffolds eine mit der Wahl des scaffolds zusammenhängende Dynamik erfuhr. Da das BLI-Signal unter Verwendung von Gelfoam® einen anfänglichen Anstieg aufwies, ist davon auszugehen, dass sich die entsprechenden Osteosarkomzellen in dieser Phase des Versuchs auf der CAM vermehrten und die Tumoren an Größe zunahmten, wohingegen sich unter Verwendung von BME eine gänzlich andere Entwicklung zeigte. Die Ergebnisse legen daher nahe, dass BME das Wachstum der verwendeten Osteosarkomzellen im CAM-Assay nicht suffizient gewährleistet und daher in einem solchen Versuchsansatz zurückhaltend angewandt werden sollte.

Für die Unterschiede zwischen BME- und Gelfoam®-Tumoren in der Bildgebung gibt es zwei wesentliche Erklärungsversuche: 1) der Abfall des BLI-Signals repräsentiert ein Absterben der auf die CAM aufgetragenen Zellen, oder 2) die Expression des Reportergens wird im Versuchsverlauf herunterreguliert, die Synthese der Luziferase in BME-Tumoren also bei erhaltener Zellvitalität reduziert („silencing“). Erstere These scheint angesichts der Datenlage am wahrscheinlichsten. Versuche mit MG-63-RL-Gelfoam-Tumoren bedienten sich Zellen einer späteren Generation, welche jedoch trotzdem imstande waren, einen initialen Anstieg des BLI-Signals zu generieren. Eine Herunterregulierung des Reportergens in BME-Tumoren erscheint daher unwahrscheinlich, zumal fraglich ist, ob dies innerhalb der verhältnismäßig kurzen Versuchsdauer solch drastische Effekte zeigen würde. Weiterhin konnten nach Beendigung der Versuche mit BME-Tumoren RFP-exprimierende Zellen fluoreszenzmikroskopisch im Gewebeverband nachgewiesen werden. Diese zeigten ein sehr lichtes Verteilungsmuster, was den Schluss zulässt, dass das Zellwachstum in BME auf der CAM nur eingeschränkt möglich war.

El Hilali et al. notierten, dass die Effizienz der Biolumineszenz-Bildgebung mit steigendem Tumolvolumen abnimmt (El Hilali, Rubio et al. 2002): die von den transduzierten Zellen

bei der Luziferasereaktion abgesonderten Photonen müssen ein recht inhomogenes Gewebe durchdringen, ehe sie zum Detektor gelangen und registriert werden (El Hilali, Rubio et al. 2002). Je größer der Tumor, desto eher werden also Photonen, die aus dem Inneren des Tumors abgegeben werden, vom umliegenden Gewebe absorbiert und der Darstellung entzogen. Hierin findet sich ein weiterer möglicher, jedoch in Kenntnis der geringen Tumorgröße eher unwahrscheinlicher Erklärungsansatz für den Abfall des BLI-Signals in MG-63-RL-Gelfoam-Tumoren nach initialem Anstieg.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode bietet den Vorteil, dass das für die bildgebende Reaktion notwendige Substrat Luziferin direkt auf die zu untersuchenden Zellen gegeben wird. Im Gegensatz dazu stehen Versuchsansätze unter Verwendung von Mausmodellen, in denen primär eine intraperitoneale Applikation des Luziferins erfolgt (Edinger, Sweeney et al. 1999, Craft, Bruhn et al. 2005, Comstock, Hall et al. 2009). In solcher Anwendung ist die Effizienz der Biolumineszenz-Bildgebung vom intravaskulären Transport des Substrates sowie von der Gefäßversorgung des Tumors abhängig, welche häufig insuffizient ist (El Hilali, Rubio et al. 2002). Zudem erfordert eine solche Applikationsweise zusätzlichen materiellen und zeitlichen Aufwand. Diese Problematik wird durch die direkte, topische Applikation in der in dieser Arbeit vorgestellten Methodik umgangen.

Eine weitere Optimierung der Biolumineszenzmessung kann darin erreicht werden, die ungehinderte Transmission von Photonen vom Tumor zum Detektor zu verbessern, z.B. durch Erweiterung der Öffnung der Eierschale, so sehr es die Embryonalentwicklung zulässt. Darüber hinaus könnten besser Ergebnisse erzielt werden durch eine verbesserte Platzierung der Zellen auf der CAM in Relation zu besagter Öffnung - in einigen Versuchsansätzen zeigten sich die Tumore in Teilen durch die Eierschale „überdacht“, was eine ungehinderte Passage der Photonen vom Tumor zum Detektor erschwerte.

Die reine Anwendung von Biolumineszenz allein hat in diesem Zusammenhang jedoch den Nachteil, dass sie keine Einzelzellauflösung bietet, sondern „nur“ Daten über die Gesamtheit der Tumormasse auf der CAM liefert. Dieses Defizit wird wiederum durch die Integration eines Fluoreszenzreporters (GFP, RFP) kompensiert, welcher den Nachweis einzelner Zellen im Gewebeverband ermöglicht. Dies ist wünschenswert z.B. in der Darstellung der Zellen in Relation zu umgebenden Blutgefäßen, um in vivo eine mögliche

Invasion der Gefäße durch Tumorzellen darstellen zu können (Condeelis, Wyckoff et al. 2000).

Die Wahl von RFP als Reporter in Osteosarkomzellen wurde getroffen auf Grund von bisherigen Erfahrungen, dass das Fluoreszenzprotein GFP in Osteosarkomzellen die Genexpression beeinflusst und daher die Anwendung dieses Reporters in diesen Zellen kritisch hinterfragt werden sollte (Dass and Choong 2007).

In der hier angewandten Form war die Fluoreszenzbildgebung nur nach Ausschneiden der CAM, also nach Beendigung des Versuches möglich, was die Anwendung von Fluoreszenzmikroskopie mit der Fortsetzung des Versuches nicht vereinbar machte. Aus diesem Grund erfolgte die Fluoreszenzmessung stets am letzten Versuchstag. Eine Möglichkeit, derartige Bildgebung auch bei „laufendem“ Versuch durchführen zu können, bietet sich unter Anwendung eines andersartig konfigurierten Mikroskops. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Mikroskop handelt es sich um ein Zeiss Axio Observer Z1, dessen Lichtquelle zur Anregung der fluoreszierenden Proteine sich unterhalb des zu untersuchenden Präparates befand. Damit war das Untersuchen der CAM, ohne diese vorher zu entnehmen, nicht möglich. Ein Mikroskop, welches eine andere Anordnung der Lichtquellen aufweist, wäre für eine wiederholte Anwendung der Fluoreszenzbildgebung im Versuchsablauf eventuell eher geeignet.

Weiterhin ließe sich die kontinuierliche Fluoreszenzbildgebung unter Durchführung des CAM-Assay als ex-ovo-Variante („shell-less“) verwirklichen. In dieser Form des CAM-Assays wird das gesamte Innere des Hühnereis zu Versuchsbeginn in eine Petrischale überführt und die Versuchsdurchführung im Kulturgefäß anstatt der natürlichen Eierschale vollzogen (Au - Dohle, Au - Pasa et al. 2009). Auf diese Art lässt sich die CAM von oben wie unten durchleuchten, die Notwendigkeit der Resektion der CAM zur Fluoreszenzbildgebung entfällt (Deryugina, Quigley et al. 2008). Da diese Variante des CAM-Assay jedoch mit größerem zeitlichem und materiellem Aufwand verbunden ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit darauf verzichtet.

Analog zur Biolumineszenzbildgebung erfährt die Fluoreszenzbildgebung ebenfalls Einschränkungen in der Aussagekraft bei steigendem Tumorzellvolumen: die anregenden Pho-

tonen müssen von der Lichtquelle ausgehend das Tumorgewebe durchdringen, konsekutiv müssen die von den transduzierten Zellen abgegebenen Photonen diese Strecke ebenfalls unter Durchdringung des Gewebes zurücklegen (El Hilali, Rubio et al. 2002). Da im vorgestellten Modell die Versuchsdauer verhältnismäßig kurz ist, bleibt jedoch fraglich, ob die entstehenden Tumore zu einer solchen Größe heranwachsen könnten, welche eine dieser bildgebenden Verfahren dahingehend signifikant in ihrer Aussagekraft einschränken könnte.

Der primäre Kritikpunkt der hier vorgestellten Methode ist die hohe Sterblichkeitsrate der Hühnerembryonen und die konsekutive teils geringe Anzahl an Wiederholungen je Versuchsansatz, welche zwischen $n = 2$ und $n = 13$ schwankten. In einigen Versuchen wurden Sterblichkeitsraten von bis zu 68% beobachtet, sodass hier von den ursprünglich mit Zellen beimpften CAMs am Ende des Versuchs nur noch wenige in die Auswertung einzubeziehen waren. Es zeigten sich jedoch bereits vor dem seeding der Tumorzellen in dem Intervall zwischen EET4 und EET9 Sterblichkeitsraten von bis zu 24% der Hühnerembryonen. Es ist daher noch endgültig zu klären, ob für diese Verluste die Entstehung von Tumoren auf der CAM oder andere Faktoren maßgebend sind.

Eine Möglichkeit, diese Zahlen zukünftig zu optimieren, liegt in der Verbesserung der Transport- und Inkubationsbedingungen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass vermehrte Erschütterungen der Hühnerembryonen zu höheren Sterblichkeitsraten führen (Shannon, Moran et al. 1994). Eine Verkürzung der Transportwege von der Hühnerzucht zum Labor, so wie eine Optimierung der Transportbedingungen sind daher wichtige Einflussfaktoren. Entsprechende Änderungen dieser Größen dürften bereits signifikant zum Überleben beitragen. Weiterhin böte die Verwendung eines gesonderten Hühnereiinkubators die Möglichkeit, die Inkubationsbedingungen zu verbessern.

Darüber hinaus ist bekannt, dass bestimmte Fremdmaterialien zu Irritationen auf der CAM führen können, unter anderem Gelatineschwämme, wie sie in dieser Arbeit verwendet worden sind (Jakob, Jentsch et al. 1978). Inwiefern andere Materialien wie die zum seeding verwendeten Silikonringe auch eine solche Reaktion hervorrufen können, bleibt zu klären. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zeigten jedoch, dass der Kontakt der CAM mit Silikon keine Irritationen auslöst (Klueh, Dorsky et al. 2003). Weiterhin stellt sich

die grundlegende Frage, ob potentielle Fremdkörperreaktionen mit der Sterblichkeitsrate der Hühnerembryonen oder dem BLI-Signalabfall in vivo in Zusammenhang zu bringen wären. Sicherlich sollte dies im Sinne der weiteren Ausarbeitung der Methode näher untersucht werden.

Außerdem ist die eventuelle „Tauglichkeit“ einiger Zellen für eine Anwendung im CAM-Assay in Frage zu stellen und genauer zu untersuchen. Balke et al. fanden, dass die Osteosarkomzelllinie SaOS-2 im CAM-Assay zu gesteigerten Sterblichkeitsraten der Hühnerembryonen von bis zu 70% führte (Balke, Neumann et al. 2010). Dies stimmt überein mit Beobachtungen aus Vorversuchen mit SaOS-2, die im Rahmen dieser Arbeit vollzogen wurden und welche hier nicht aufgeführt sind. Es wurde daher von einer weiteren Versuchsplanung mit SaOS-2 abgesehen.

Einige etablierte Methoden zur Tumormassequantifizierung könnten im Kontext des in dieser Arbeit präsentierten Modells messfehleranfällig sein. Die Vermessung des Tumors mittels Messschiebelehre und die konsekutive Berechnung des Tumolvolumens ist eine erprobte und einfache Methode, Tumolvolumen zu quantifizieren (Faustino-Rocha, Oliveira et al. 2013). Sie birgt jedoch den Nachteil, dass eine Gesamtaussage über die vermessene Masse getroffen wird, ohne zwischen vitalem Tumorgewebe, Nekrose und Ödem zu differenzieren (Jenkins, Oei et al. 2003). Weiterhin findet sie unter Verwendung von scaffolds Einschränkung, welche ebenfalls zum Gesamtvolumen beitragen: es fehlt darin die Möglichkeit, das scaffold von tatsächlichem Tumorgewebe zu unterscheiden. Gleiches gilt für die videomikroskopische Vermessung des Tumors, was u.a. in Vorversuchen beobachtet werden konnte, welche in dieser Arbeit nicht aufgeführt sind. Die hier vorgestellte Methodik überwindet diese Probleme mittels Biolumineszenz-Bildgebung.

Die Wirtschaftlichkeit des vorgestellten Modells gegenüber anderen Tiermodellen sollte an dieser Stelle ebenfalls Erwähnung finden. Pro Hühnerei beliefen sich die Gesamtversuchskosten auf etwa 4 \$US. Darin enthalten sind der Kaufpreis des Hühnereis und die Kosten für die tägliche Biolumineszenz-Bildgebung über einen Zeitraum von bis zu sieben Tagen. Die Kosten für den Transport der Eier von der Hühnerzucht bis zum Labor sind von dieser Rechnung ausgenommen, da diese je nach Bezugsquelle und Lieferweg eventuell

variieren. Weiterhin lässt sich eine hohe Probenanzahl mit vergleichsweise geringem zeitlichem Aufwand umsetzen. Die mangelnde Notwendigkeit eines Ethikantrages zur Durchführung von CAM-Assays unterstreicht die zeitliche Wirtschaftlichkeit der Methode.

4.2 Ausblick

In Anbetracht der Komplexität der Tumorentstehung und -metastasierung ist ein möglichst ganzheitlich-systemischer Ansatz in präklinischen Forschungsmodellen notwendig, um die daran beteiligten Prozesse insbesondere vor dem Hintergrund des Tumormikromilieus näher verstehen und in diese Prozesse eingreifen zu können (Joyce and Pollard 2009). Hierin sind präklinische bildgebende Verfahren zur Überwachung des Zellverhaltens *in vivo* essenziell (Clark, Ebiana et al. 2017). Die hier vorgestellte Methode stellt eine wertvolle Ergänzung der bekannten präklinischen Quantifizierungsmethoden von Tumorstromung dar.

Die aktuellen Herausforderungen in der Therapie des Osteosarkoms liegen unter anderem in der Überwindung von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika, der Identifizierung von Biomarkern vor dem Hintergrund einer daraus abzuleitenden personalisierten Therapie, sowie in der Ausarbeitung der Immuntherapie des Osteosarkoms (Chou and Gorlick 2006, Luetke, Meyers et al. 2014). Die Rolle von MMPs als mögliches Therapieziel wird hier von verschiedenen Autoren – auch im Kontext anderer Tumorentitäten - betont (Cho, Lee et al. 2007, Chang, Hsieh et al. 2016, Isaacson, Martin Jensen et al. 2017). Weitere Studien legen den Fokus auf die Verwendung modifizierter T-Zellen in der Immuntherapie des Osteosarkoms und verzeichnen Erfolge in der Therapie sowohl des Primärtumors als auch vorhandener Lungenmetastasen (Ahmed, Salsman et al. 2009, Rainusso, Brawley et al. 2011). Bestandteile intrazellulärer Signalwege, sowie Zelloberflächenmoleküle sind als Angriffspunkte für neue Therapien bereits im Rahmen von klinischen Studien in Erprobung oder befinden sich in der Vorbereitung für solche Studien (Kansara, Teng et al. 2014).

In Anbetracht der Wirtschaftlichkeit und der einfachen Handhabung lässt sich das in dieser Arbeit vorgestellte Modell ohne größere Einschränkungen für erste präklinische Wirksamkeitsstudien verschiedener antiproliferativer Pharmaka nutzen und sollte daher als Alternative oder zumindest Ergänzung zu vielfach angewandten Mausmodellen bedacht werden.

Eine weit verbreitete Anwendungsform des CAM-Assay besteht in seiner Verwendung als Angiogeneseassay, d.h. der Untersuchung der Neueinsprossung von Blutgefäßen in den

CAM-Tumor (Li, Wang et al. 2002, Storgard, Mikolon et al. 2005, Ribatti 2008). Die lichtmikroskopische manuelle oder maschinelle Auszählung neugebildeter Gefäße lässt sich ohne Einschränkung mit der hier vorgestellten Methode verbinden. Weiterhin sollte sie sich mit weiteren Verfahren kombinieren lassen, die im Kontext von Studien zur Tumorbio- logie breite Anwendung finden, so z.B. mit immunhistologischer Färbung des Tu- morpräparates, PCR-Amplifikation, oder mit unter 1.5 genannten, technisch aufwändige- ren Untersuchungsmethoden wie μ CT oder 3D-Hochfrequenzultraschallbildgebung.

Die Ergänzung all dieser Verfahren um die hier vorgestellte bildgebende Untersuchsungs- methode sollte in jedem Fall einen höheren Informationsgewinn erwarten lassen.

Des Weiteren sollte die Co-Kultur von Tumorzellen mit anderen Zellarten im vorgestellten Modell ungehindert möglich sein. In der Vergangenheit wurden mehrere Modelle prä- sentiert, welche die Co-Kultur von verschiedenen Krebszellarten mit Zellen des Immun- systems oder mit Fibroblasten in einem scaffold demonstrierten und konsekutiv deren wechselseitige Wirkung untersuchten (Phan-Lai, Florczyk et al. 2013, Bai, Adriani et al. 2015). Dieses Konzept sollte sich ohne Einschränkung auf das in dieser Arbeit vorgestellte Modell übertragen lassen. Da das Immunsystem des Hühnerembryos in der Versuchs- phase des CAM-Assay noch nicht vollständig ausgebildet ist, bietet sich überdies die Mög- lichkeit, derartige Studien ohne höhergradigen Einfluss des embryonalen Immunsystems vorzunehmen (Seto 1981, Janse and Jeurissen 1991).

Ein Teil der Attraktivität des CAM-Assays liegt darin, dass das Nervensystem des Hüh- nerembryos zur Zeit der Versuchsdurchführung noch nicht vollständig ausgebildet ist, der Embryo also auch keinen Schmerz verspürt (Slodownik, Grinberg et al. 2009). Der Versuch wird durch Herunterkühlen des Hühnereis auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ beendet, wodurch die Atmung des Embryos zum Erliegen kommt (Ide, Ide et al. 2017). Diese Herangehensweise findet breite Anwendung, teils wird jedoch darauf verzichtet und die CAM direkt entnommen oder noch im Ei zuvor in Formaldehyd eingebettet (Balke, Neumann et al. 2010, Sys, Lapeire et al. 2013, Li, Pathak et al. 2015). Weitere Untersuchungen legen jedoch nahe, dass das Vermögen zur Schmerzempfindung bereits ab dem siebten embryonalen Entwicklungs- tag sich zu entfalten beginnt (Rosenbruch 1997). Damit geraten die genannten Praktiken zum Versuchsende selbstredend in starke Kritik. Aleksandrowicz et al. demonstrierten daher eine zwar materiell aufwändigere, jedoch ethisch weniger streitbarere Methode,

den CAM-Assay zu beenden (Aleksandrowicz and Herr 2015): nach intravaskulärer Injektion von Pentobarbital, einem Narkosemittel, in die Gefäße der CAM wurde unmittelbar der Herzstillstand sowie ein Erliegen der Zirkulation des Hühnerembryos beobachtet; der Funktionsausfall des Nervensystems wurde durch Ausbleiben verschiedener Reflexe bestätigt (Aleksandrowicz and Herr 2015). Eine Integration dieses Protokolls in die hier geschilderte Methodik ist unter ethischen Gesichtspunkten in Zukunft wünschenswert.

Die drei R-Prinzipien „replacement, reduction, refinement“, welche 1959 von Russel und Burch vorgestellt wurden, plädieren für eine Optimierung der Versuchsbedingungen in Tierversuchen im Sinne ethischer Grundsätze (Tannenbaum and Bennett 2015). Genauer beziehen sie sich auf die größtmögliche Reduktion von Stressfaktoren für das Versuchstier, eine Auswahl von Methoden, welche eine minimale Anzahl an Versuchstieren notwendig machen, sowie ein Verzicht auf Tierversuche, sofern Alternativen dazu praktikabel und sinnvoll sind. In Deutschland befasst sich die „Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch“ mit der Aufgabe, zu diesem Themenkomplex Lösungen zu erarbeiten (ZEBET 2019). Im Jahr 2005 wurden in der EU 12,1 Millionen Tiere für wissenschaftliche Zwecke benutzt, davon 75% Mäuse und Ratten (Liebsch, Grune et al. 2011).

Nach der zuvor genannten Optimierung der Rahmenbedingungen bietet die in dieser Arbeit vorgestellte Methode unter ethischen Gesichtspunkten eine wertvolle Alternative zum „klassischen“ Tierversuch. Sie sollte daher auch bei der Untersuchung anderer Tumorentitäten und deren Proliferationsverhalten in vivo näher untersucht und ausgearbeitet werden.

5 Danksagungen

Zuallererst gilt mein besonderer Dank Univ.-Prof. Dr. med. Rüdiger von Eisenhart-Rothe, Dr. Philipp Mayer-Kuckuk und Dr. med. Florian Lenze, welche es mir ermöglichten, meine Dissertation zu diesem Thema an der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie des Universitätsklinikums rechts der Isar durchzuführen und ohne die dieses Projekt nie Gestalt angenommen hätte.

Weiterhin möchte ich mich in besonderem Maße bedanken bei Jutta Tübel und Carmen Marthen sowie allen weiteren Mitarbeitenden der Forschungsabteilung der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie des Universitätsklinikums rechts der Isar für die tägliche Unterstützung und Beratung im Labor.

Darüber hinaus gilt mein Dank PD Dr. rer. nat. Roman Nawroth und Anuja Sathe MD, PhD, ohne deren freundliche Unterstützung und unkomplizierte Zusammenarbeit große Teile der Experimente nicht möglich gewesen wären.

Ich möchte mich bei meinen Doktorandenkolleginnen und -kollegen für die inspirierende und unterhaltsame Zusammenarbeit bedanken, insbesondere bei Antonia Thiel für ihre Mithilfe in der Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie.

Bei Louise Platen und Laura Schwerdt bedanke ich mich herzlichst für ein kritisches Auge und viele hilfreiche Anmerkungen, ohne die diese Arbeit deutlich weniger verständlich wäre.

Letztlich möchte ich mich bei meiner Familie für die kontinuierliche Unterstützung und stets offene Ohren bedanken.

6 Literaturverzeichnis

Aguado, B. A., J. R. Caffè, D. Nanavati, S. S. Rao, G. G. Bushnell, S. M. Azarin and L. D. Shea (2016). "Extracellular matrix mediators of metastatic cell colonization characterized using scaffold mimics of the pre-metastatic niche." Acta Biomater **33**: 13-24.

Ahmed, N., V. S. Salsman, E. Yvon, C. U. Louis, L. Perlaky, W. S. Wels, M. K. Dishop, E. E. Kleinerman, M. Pule, C. M. Rooney, H. E. Heslop and S. Gottschalk (2009). "Immunotherapy for Osteosarcoma: Genetic Modification of T cells Overcomes Low Levels of Tumor Antigen Expression." Molecular Therapy **17**(10): 1779-1787.

Aleksandrowicz, E. and I. Herr (2015). "Ethical euthanasia and short-term anesthesia of the chick embryo." Altex **32**(2): 143-147.

Anninga, J. K., H. Gelderblom, M. Fiocco, J. R. Kroep, A. H. Taminiau, P. C. Hogendoorn and R. M. Egeler (2011). "Chemotherapeutic adjuvant treatment for osteosarcoma: where do we stand?" Eur J Cancer **47**(16): 2431-2445.

Armstrong, P. B., J. P. Quigley and E. Sidebottom (1982). "Transepithelial invasion and intramesenchymal infiltration of the chick embryo chorioallantois by tumor cell lines." Cancer Res **42**(5): 1826-1837.

Au - Dohle, D. S., S. D. Au - Pasa, S. Au - Gustmann, M. Au - Laub, J. H. Au - Wissler, H. P. Au - Jennissen and N. Au - Dünker (2009). "Chick ex ovo Culture and ex ovo CAM Assay: How it Really Works." JoVE(33): e1620.

Bacci, G., M. Rocca, M. Salone, A. Balladelli, S. Ferrari, E. Palmerini, C. Forni and A. Briccoli (2008). "High grade osteosarcoma of the extremities with lung metastases at presentation: treatment with neoadjuvant chemotherapy and simultaneous resection of primary and metastatic lesions." J Surg Oncol **98**(6): 415-420.

- Bai, J., G. Adriani, T. M. Dang, T. Y. Tu, H. X. Penny, S. C. Wong, R. D. Kamm and J. P. Thiery (2015). "Contact-dependent carcinoma aggregate dispersion by M2a macrophages via ICAM-1 and beta2 integrin interactions." *Oncotarget* **6**(28): 25295-25307.
- Balke, M., A. Neumann, C. Kersting, K. Agelopoulos, C. Gebert, G. Gosheger, H. Buerger and M. Hagedorn (2010). "Morphologic characterization of osteosarcoma growth on the chick chorioallantoic membrane." *BMC Res Notes* **3**: 58.
- Banerjee, S., V. Thayanithy, V. Sangwan, T. N. Mackenzie, A. K. Saluja and S. Subramanian (2013). "Minnelide reduces tumor burden in preclinical models of osteosarcoma." *Cancer Lett* **335**(2): 412-420.
- Banihashemi, B., R. Vlad, B. Debeljevic, A. Giles, M. C. Kolios and G. J. Czarnota (2008). "Ultrasound Imaging of Apoptosis in Tumor Response: Novel Preclinical Monitoring of Photodynamic Therapy Effects." **68**(20): 8590-8596.
- Bay, S. B., R. Kebudi, A. Iribas, O. Gorgun, F. Agaoglu, F. Gun, A. Celik and E. Darendeliler (2018). "Osteosarcoma of the rib: A rare presentation." *Turk Pediatri Ars* **53**(1): 57-60.
- Berner, K., T. B. Johannesen, A. Berner, H. K. Haugland, B. Bjerkehagen, P. J. Bohler and O. S. Bruland (2015). "Time-trends on incidence and survival in a nationwide and unselected cohort of patients with skeletal osteosarcoma." *Acta Oncol* **54**(1): 25-33.
- Bill-Axelson, A., L. Holmberg, M. Ruutu, M. Häggman, S.-O. Andersson, S. Bratell, A. Spångberg, C. Busch, S. Nordling, H. Garmo, J. Palmgren, H.-O. Adami, B. J. Norlén and J.-E. Johansson (2005). "Radical Prostatectomy versus Watchful Waiting in Early Prostate Cancer." **352**(19): 1977-1984.
- Bosse, Y., A. Miqdad, D. Fournier, A. Pepin, P. Pibarot and P. Mathieu (2009). "Refining molecular pathways leading to calcific aortic valve stenosis by studying gene expression profile of normal and calcified stenotic human aortic valves." *Circ Cardiovasc Genet* **2**(5): 489-498.

Bostwick, D. G., H. B. Burke, D. Djakiew, S. Euling, S. M. Ho, J. Landolph, H. Morrison, B. Sonawane, T. Shifflett, D. J. Waters and B. Timms (2004). "Human prostate cancer risk factors." Cancer **101**(10 Suppl): 2371-2490.

Calvert, G. T., R. L. Randall, K. B. Jones, L. Cannon-Albright, S. Lessnick and J. D. Schiffman (2012). "At-risk populations for osteosarcoma: the syndromes and beyond." Sarcoma **2012**: 152382.

Candelario-Jalil, E., Y. Yang and G. A. Rosenberg (2009). "Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia." Neuroscience **158**(3): 983-994.

Carano, R. A. D., A. L. Ross, J. Ross, S. P. Williams, H. Koeppen, R. H. Schwall and N. Van Bruggen (2004). "Quantification of tumor tissue populations by multispectral analysis." **51**(3): 542-551.

Carney, S. L. and H. Muir (1988). "The structure and function of cartilage proteoglycans." Physiol Rev **68**(3): 858-910.

Castillejos-Molina, R. A. and F. B. Gabilondo-Navarro (2016). "Prostate cancer." Salud Publica Mex **58**(2): 279-284.

Chang, P. Y., M. J. Hsieh, Y. S. Hsieh, P. N. Chen, J. S. Yang, F. C. Lo, S. F. Yang and K. H. Lu (2016). "Tricetin inhibits human osteosarcoma cells metastasis by transcriptionally repressing MMP-9 via p38 and Akt pathways." Environ Toxicol.

Chen, C., Z. Y. Wang, J. Weng, Z. B. Wang, J. Mei, X. H. Du and L. Wang (2017). "[Effect of two different acellular lung matrices on alpha-SMA expression in A549 cells]." Zhonghua Yi Xue Za Zhi **97**(4): 303-307.

Cho, H., T. Lee, J. Park, K. Park, J. Choe, D. Sin, Y. Park, Y. Moon, K. Lee and J. Yeo (2007). "Disulfiram suppresses invasive ability of osteosarcoma cells via the inhibition of MMP-2 and MMP-9 expression." Journal of biochemistry and molecular biology **40**(6): 1069.

Chou, A. J., D. S. Geller and R. Gorlick (2008). "Therapy for osteosarcoma: where do we go from here?" Paediatr Drugs **10**(5): 315-327.

Chou, A. J. and R. Gorlick (2006). "Chemotherapy resistance in osteosarcoma: current challenges and future directions." Expert Rev Anticancer Ther **6**(7): 1075-1085.

Clark, P. M., V. A. Ebian, L. Gosa, T. F. Cloughesy and D. A. Nathanson (2017). "Harnessing Preclinical Molecular Imaging to Inform Advances in Personalized Cancer Medicine." J Nucl Med **58**(5): 689-696.

Clarke, B. (2008). "Normal Bone Anatomy and Physiology." **3**(Supplement 3): S131-S139.

Cole, H. A., J. Ichikawa, D. C. Colvin, L. O'Rear and J. G. Schoenecker (2011). "Quantifying intra-osseous growth of osteosarcoma in a murine model with radiographic analysis." **29**(12): 1957-1962.

Coleman, C. M. (2008). "Chicken embryo as a model for regenerative medicine." Birth Defects Res C Embryo Today **84**(3): 245-256.

Combes, R. D. and M. Balls (2014). "The Three Rs--opportunities for improving animal welfare and the quality of scientific research." Altern Lab Anim **42**(4): 245-259.

Comstock, K. E., C. L. Hall, S. Daignault, S. A. Mandlebaum, C. Yu and E. T. Keller (2009). "A bioluminescent orthotopic mouse model of human osteosarcoma that allows sensitive and rapid evaluation of new therapeutic agents In vivo." In Vivo **23**(5): 661-668.

Condeelis, J. S., J. Wyckoff and J. E. Segall (2000). "Imaging of cancer invasion and metastasis using green fluorescent protein." European Journal of Cancer **36**(13): 1671-1680.

Craft, N., K. W. Bruhn, B. D. Nguyen, R. Prins, L. M. Liao, E. A. Collisson, A. De, M. S. Kolodney, S. S. Gambhir and J. F. Miller (2005). "Bioluminescent Imaging of Melanoma in Live Mice." Journal of Investigative Dermatology **125**(1): 159-165.

Dass, C. R. and P. F. Choong (2007). "GFP expression alters osteosarcoma cell biology." DNA Cell Biol **26**(8): 599-601.

Dean, D. D., J. Martel-Pelletier, J. P. Pelletier, D. S. Howell and J. F. Woessner, Jr. (1989). "Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage." J Clin Invest **84**(2): 678-685.

Deryugina, E. I., J. P. J. H. Quigley and C. Biology (2008). "Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis." **130**(6): 1119-1130.

Docking, S., T. Samiric, E. Scase, C. Purdam and J. Cook (2013). "Relationship between compressive loading and ECM changes in tendons." Muscles Ligaments Tendons J **3**(1): 7-11.

Durfee, R. A., M. Mohammed and H. H. Luu (2016). "Review of Osteosarcoma and Current Management." Rheumatol Ther.

EAU. (2015). "Guidelines on Prostate Cancer."

Echchikhi, Y., H. Loughlimi, A. Touil, T. Kebdani and N. Benjaafar (2016). "Radiation-induced osteosarcoma of the skull base after radiation therapy in a patient with nasopharyngeal carcinoma: a case report and review of the literature." J Med Case Rep **10**(1): 334.

Edinger, M., T. J. Sweeney, A. A. Tucker, A. B. Olomu, R. S. Negrin and C. H. Contag (1999). "Noninvasive assessment of tumor cell proliferation in animal models." Neoplasia **1**(4): 303-310.

Eftekhari, F. (2009). "Imaging assessment of osteosarcoma in childhood and adolescence: diagnosis, staging, and evaluating response to chemotherapy." Cancer Treat Res **152**: 33-62.

El Hilali, N., N. Rubio, M. Martinez-Villacampa and J. Blanco (2002). "Combined Noninvasive Imaging and Luminometric Quantification of Luciferase-Labeled Human Prostate Tumors and Metastases." Laboratory Investigation **82**: 1563.

Euhus, D. M., C. Hudd, M. C. Laregina and F. E. Johnson (1986). "Tumor measurement in the nude mouse." **31**(4): 229-234.

Faustino-Rocha, A., P. A. Oliveira, J. Pinho-Oliveira, C. Teixeira-Guedes, R. Soares-Maia, R. G. da Costa, B. Colaço, M. J. Pires, J. Colaço, R. Ferreira and M. Ginja (2013). "Estimation of rat mammary tumor volume using caliper and ultrasonography measurements." Lab Animal **42**: 217.

Ferrari, S., S. Smeland, M. Mercuri, F. Bertoni, A. Longhi, P. Ruggieri, T. A. Alvegard, P. Picci, R. Capanna, G. Bernini, C. Muller, A. Tienghi, T. Wiebe, A. Comandone, T. Bohling, A. B. Del Prever, O. Brosjo, G. Bacci and G. Saeter (2005). "Neoadjuvant chemotherapy with high-dose Ifosfamide, high-dose methotrexate, cisplatin, and doxorubicin for patients with localized osteosarcoma of the extremity: a joint study by the Italian and Scandinavian Sarcoma Groups." J Clin Oncol **23**(34): 8845-8852.

Fragkandrea, I., J. A. Nixon and P. Panagopoulou (2013). "Signs and symptoms of childhood cancer: a guide for early recognition." Am Fam Physician **88**(3): 185-192.

Fuchs, A. and E. S. Lindenbaum (1988). "The two- and three-dimensional structure of the microcirculation of the chick chorioallantoic membrane." Acta Anat (Basel) **131**(4): 271-275.

Garnero, P., O. Borel, I. Byrjalsen, M. Ferreras, F. H. Drake, M. S. McQueney, N. T. Foged, P. D. Delmas and J. M. Delaisse (1998). "The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases." J Biol Chem **273**(48): 32347-32352.

Garnero, P., E. Sornay-Rendu, M.-C. Chapuy and P. D. Delmas (1996). "Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis."

11(3): 337-349.

Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie, H. (2010). S1-Leitlinie Osteosarkome, AWMF-Register Nr. 025/005 AWMF Online - das Portal der wissenschaftlichen Medizin, Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie: 1-14.

Giannini, L., F. Incandela, M. Fiore, A. Gronchi, S. Stacchiotti, C. Sangalli and C. Piazza (2018). "Radiation-Induced Sarcoma of the Head and Neck: A Review of the Literature."

Front Oncol **8**: 449.

Glavey, S. V., A. Naba, S. Manier, K. Clauser, S. Tahri, J. Park, M. R. Reagan, M. Moschetta, Y. Mishima, M. Gambella, A. Rocci, A. Sacco, M. E. O'Dwyer, J. M. Asara, A. Palumbo, A. M. Roccaro, R. O. Hynes and I. M. Ghobrial (2017). "Proteomic characterization of human multiple myeloma bone marrow extracellular matrix."

Leukemia.

Gogakos, A. I., J. H. Duncan Bassett and G. R. Williams (2010). "Thyroid and bone." Arch Biochem Biophys **503**(1): 129-136.

Graham, K. C., N. L. Ford, L. T. MacKenzie, C. O. Postenka, A. C. Groom, I. C. MacDonald, D. W. Holdsworth, M. Drangova and A. F. Chambers (2008). "Noninvasive Quantification of Tumor Volume in Preclinical Liver Metastasis Models Using Contrast-Enhanced X-Ray Computed Tomography." **43**(2): 92-99.

Graham, K. C., L. A. Wirtzfeld, L. T. MacKenzie, C. O. Postenka, A. C. Groom, I. C. MacDonald, A. Fenster, J. C. Lacefield and A. F. Chambers (2005). "Three-dimensional High-Frequency Ultrasound Imaging for Longitudinal Evaluation of Liver Metastases in Preclinical Models." **65**(12): 5231-5237.

Gray, H. (1918). Anatomy of the human body. Anatomy of the human body W. H. Lewis. **20**.

Grimer, R. J. (2005). "Surgical options for children with osteosarcoma." Lancet Oncol **6**(2): 85-92.

Gulia, A., A. Puri, S. Chorge and P. K. Panda (2016). "Epidemiological data and case load spectrum of patients presenting to bone and soft tissue disease management group at a tertiary cancer center." Indian J Cancer **53**(2): 333-338.

Hamburger, V. and H. L. Hamilton (1992). "A series of normal stages in the development of the chick embryo." **195**(4): 231-272.

Hay, E. D. (1993). "Extracellular matrix alters epithelial differentiation." Curr Opin Cell Biol **5**(6): 1029-1035.

Heino, T. J. and T. A. Hentunen (2008). "Differentiation of Osteoblasts and Osteocytes from Mesenchymal Stem Cells." Current Stem Cell Research & Therapy **3**(2): 131-145.

Hruska, K. A. and S. L. Teitelbaum (1995). "Renal Osteodystrophy." **333**(3): 166-175.

Hsing, A. W. and A. P. Chokkalingam (2006). "Prostate cancer epidemiology." Front Biosci **11**: 1388-1413.

Hua, H., M. Li, T. Luo, Y. Yin, Y. J. C. Jiang and M. L. Sciences (2011). "Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm." **68**(23): 3853-3868.

Ide, R., S. T. Ide and J. P. Mortola (2017). "The cessation of breathing in the chicken embryo during cold-hypometabolism." Respir Physiol Neurobiol **242**: 19-29.

Isaacson, K. J., M. Martin Jensen, N. B. Subrahmanyam and H. Ghandehari (2017). "Matrix-metalloproteinases as targets for controlled delivery in cancer: An analysis of upregulation and expression." J Control Release **259**: 62-75.

Jacobsen, I. D., K. Große, S. Slesiona, B. Hube, A. Berndt and M. Brock (2010). "Embryonated Eggs as an Alternative Infection Model To Investigate *Aspergillus fumigatus* Virulence." **78**(7): 2995-3006.

Jakob, W., K. D. Jentsch, B. Mauersberger and G. Heder (1978). "The chick embryo choriallantoic membrane as a bioassay for angiogenesis factors: reactions induced by carrier materials." Exp Pathol (Jena) **15**(5): 241-249.

Janse, E. M. and S. H. Jeurissen (1991). "Ontogeny and function of two non-lymphoid cell populations in the chicken embryo." Immunobiology **182**(5): 472-481.

Jee, W. S. (2000). "Principles in bone physiology." J Musculoskelet Neuronal Interact **1**(1): 11-13.

Jenkins, D. E., Y. Oei, Y. S. Hornig, S.-F. Yu, J. Dusich, T. Purchio, P. R. J. C. Contag and E. Metastasis (2003). "Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of tumor growth and metastasis." **20**(8): 733-744.

Ji, J. and K. Hemminki (2006). "Familial risk for histology-specific bone cancers: an updated study in Sweden." Eur J Cancer **42**(14): 2343-2349.

Joyce, J. A. and J. W. Pollard (2009). "Microenvironmental regulation of metastasis." Nat Rev Cancer **9**(4): 239-252.

Kaatsch, P. (2010). "Epidemiology of childhood cancer." Cancer Treat Rev **36**(4): 277-285.

Kager, L., A. Zoubek, U. Potechger, U. Kastner, S. Flege, B. Kempf-Bielack, D. Branscheid, R. Kotz, M. Salzer-Kuntschik, W. Winkelmann, G. Jundt, H. Kabisch, P. Reichardt, H. Jurgens, H. Gadner and S. S. Bielack (2003). "Primary metastatic osteosarcoma: presentation and outcome of patients treated on neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group protocols." J Clin Oncol **21**(10): 2011-2018.

Kansara, M., M. W. Teng, M. J. Smyth and D. M. Thomas (2014). "Translational biology of osteosarcoma." Nature Reviews Cancer **14**: 722.

Kessenbrock, K., V. Plaks and Z. Werb (2010). "Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment." Cell **141**(1): 52-67.

Kim, J. B. (2005). "Three-dimensional tissue culture models in cancer biology." Semin Cancer Biol **15**(5): 365-377.

Kim, S. H., J. Turnbull and S. Guimond (2011). "Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor." J Endocrinol **209**(2): 139-151.

Klein-Scory, S., M. M. Tehrani, C. Eilert-Micus, K. A. Adamczyk, N. Wojtalewicz, M. Scholzer, S. A. Hahn, W. Schmiegel and I. Schwarte-Waldhoff (2014). "New insights in the composition of extracellular vesicles from pancreatic cancer cells: implications for biomarkers and functions." Proteome Sci **12**(1): 50.

Klein, M. J. and G. P. Siegal (2006). "Osteosarcoma: anatomic and histologic variants." Am J Clin Pathol **125**(4): 555-581.

Klueh, U., D. I. Dorsky, F. Moussy and D. L. Kreutzer (2003). "Ex ova chick chorioallantoic membrane as a novel model for evaluation of tissue responses to biomaterials and implants." Journal of Biomedical Materials Research Part A **67A**(3): 838-843.

Krakauer, J. C., M. J. McKenna, N. Fenn Buderer, D. S. Rao, F. W. Whitehouse and A. M. Parfitt (1995). "Bone Loss and Bone Turnover in Diabetes." **44**(7): 775-782.

Kue, C. S., K. Y. Tan, M. L. Lam and H. B. Lee (2015). "Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM): an alternative predictive model in acute toxicological studies for anti-cancer drugs." Exp Anim **64**(2): 129-138.

Kundu, Z. S. (2014). "Classification, imaging, biopsy and staging of osteosarcoma." Indian J Orthop **48**(3): 238-246.

Kurt, A. M., K. K. Unni, R. A. McLeod and D. J. Pritchard (1990). "Low-grade intraosseous osteosarcoma." Cancer **65**(6): 1418-1428.

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D. K., AWMF) (2018). Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Deutsche Gesellschaft für Urologie.

Li, M., R. R. Pathak, E. Lopez-Rivera, S. L. Friedman, J. A. Aguirre-Ghiso and A. G. Sikora (2015). "The In Ovo Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay as an Efficient Xenograft Model of Hepatocellular Carcinoma." J Vis Exp(104).

Li, Y., D. Wang and F. Gao (2002). "[Experimental study of therapy effects of anti -VEGF antibody on osteosarcoma]." Zhonghua Wai Ke Za Zhi **40**(3): 225-227.

Liebsch, M., B. Grune, A. Seiler, D. Butzke, M. Oelgeschlager, R. Pirow, S. Adler, C. Riebeling and A. Luch (2011). "Alternatives to animal testing: current status and future perspectives." Arch Toxicol **85**(8): 841-858.

Lin, C. Q. and M. J. Bissell (1993). "Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix." **7**(9): 737-743.

Litwin, M. S. and H. J. Tan (2017). "The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review." Jama **317**(24): 2532-2542.

Lokman, N. A., A. S. F. Elder, C. Ricciardelli and M. K. Oehler (2012). "Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay as an In Vivo Model to Study the Effect of Newly Identified Molecules on Ovarian Cancer Invasion and Metastasis." International Journal of Molecular Sciences **13**(8): 9959-9970.

Longhi, A., C. Errani, M. De Paolis, M. Mercuri and G. Bacci (2006). "Primary bone osteosarcoma in the pediatric age: State of the art." Cancer Treatment Reviews **32**(6): 423-436.

Luetke, A., P. A. Meyers, I. Lewis and H. Juergens (2014). "Osteosarcoma treatment - where do we stand? A state of the art review." Cancer Treat Rev **40**(4): 523-532.

Lukashev, M. E. and Z. Werb (1998). "ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour." Trends Cell Biol **8**(11): 437-441.

Malemud, C. J. (2006). "Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview." Front Biosci **11**: 1696-1701.

Marieb, E. N. (2015). Essentials of Human anatomy & physiology.

Marko, T. A., B. J. Diessner and L. G. Spector (2016). "Prevalence of Metastasis at Diagnosis of Osteosarcoma: An International Comparison." Pediatr Blood Cancer **63**(6): 1006-1011.

Mathias, R. A., Y. S. Chen, B. Wang, H. Ji, E. A. Kapp, R. L. Moritz, H. J. Zhu and R. J. Simpson (2010). "Extracellular remodelling during oncogenic Ras-induced epithelial-mesenchymal transition facilitates MDCK cell migration." J Proteome Res **9**(2): 1007-1019.

Matsuo, K. and N. Irie (2008). "Osteoclast-osteoblast communication." Arch Biochem Biophys **473**(2): 201-209.

Matthiessen, L., B. Lucaroni and E. Sachez (2003). "Towards responsible animal research." Addressing the ethical dimension of animal experimentation and implementing the 'Three Rs' principle in biomedical research **4**(2): 104-107.

Mirabello, L., R. J. Troisi and S. A. Savage (2009). "International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons." Int J Cancer **125**(1): 229-234.

Mirabello, L., R. J. Troisi and S. A. Savage (2009). "Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program." Cancer **115**(7): 1531-1543.

Moreno-Jiménez, I., G. Hulsart-Billstrom, S. A. Lanham, A. A. Janeczek, N. Kontouli, J. M. Kanczler, N. D. Evans and R. O. C. Oreffo (2016). "The chorioallantoic membrane (CAM) assay for the study of human bone regeneration: a refinement animal model for tissue engineering." Scientific Reports **6**: 32168.

Mujtaba, B., S. M. Nassar, R. Aslam, N. Garg, J. E. Madewell, A. Taher, A. K. Hanafy and G. Whitman (2019). "Primary Osteosarcoma of the Breast: Pathophysiology and Imaging Review." Curr Probl Diagn Radiol.

Murshed, M., T. Schinke, M. D. McKee and G. Karsenty (2004). "Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins." J Cell Biol **165**(5): 625-630.

Naba, A., K. R. Clauser, H. Ding, C. A. Whittaker, S. A. Carr and R. O. Hynes (2016). "The extracellular matrix: Tools and insights for the "omics" era." Matrix Biol **49**: 10-24.

Naba, A., S. Hoersch and R. O. Hynes (2012). "Towards definition of an ECM parts list: an advance on GO categories." Matrix Biol **31**(7-8): 371-372.

Nazemi, K. J. and S. Malempati (2009). "Emergency department presentation of childhood cancer." Emerg Med Clin North Am **27**(3): 477-495.

Nelson, C. M. and M. J. Bissell (2006). "Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer." Annu Rev Cell Dev Biol **22**: 287-309.

Nesbitt, S. A. and M. A. Horton (1997). "Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts." Science **276**(5310): 266-269.

- Nowak-Sliwinska, P., T. Segura and M. L. Iruela-Arispe (2014). "The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering." Angiogenesis **17**(4): 779-804.
- Nyberg, P., T. Salo and R. Kalluri (2008). "Tumor microenvironment and angiogenesis." Front Biosci **13**: 6537-6553.
- Ottaviani, G. and N. Jaffe (2010). The Epidemiology of Osteosarcoma. Pediatric and Adolescent Osteosarcoma. N. Jaffe, O. S. Bruland and S. Bielack. Boston, MA, Springer US: 3-13.
- Parkin, D. M., F. Bray, J. Ferlay and P. Pisani (2005). "Global cancer statistics, 2002." CA Cancer J Clin **55**(2): 74-108.
- Parkin, D. M., C. A. Stiller, G. J. Draper and C. A. Bieber (1988). "The international incidence of childhood cancer." Int J Cancer **42**(4): 511-520.
- Phan-Lai, V., S. J. Florczyk, F. M. Kievit, K. Wang, E. Gad, M. L. Disis and M. Zhang (2013). "Three-Dimensional Scaffolds to Evaluate Tumor Associated Fibroblast-Mediated Suppression of Breast Tumor Specific T Cells." Biomacromolecules **14**(5): 1330-1337.
- Picci, P. J. O. J. o. R. D. (2007). "Osteosarcoma (Osteogenic sarcoma)." **2**(1): 6.
- Pienta, K. J. and P. S. Esper (1993). "Risk factors for prostate cancer." Ann Intern Med **118**(10): 793-803.
- Post, T. M., S. C. L. M. Cremers, T. Kerbusch and M. J. C. P. Danhof (2010). "Bone Physiology, Disease and Treatment." **49**(2): 89-118.
- Rainusso, N., V. S. Brawley, A. Ghazi, M. J. Hicks, S. Gottschalk, J. M. Rosen and N. Ahmed (2011). "Immunotherapy targeting HER2 with genetically modified T cells eliminates tumor-initiating cells in osteosarcoma." Cancer Gene Therapy **19**: 212.

- Raisz, L. G. (1999). "Physiology and pathophysiology of bone remodeling." Clin Chem **45**(8 Pt 2): 1353-1358.
- Ralston, S. H., A. L. Langston and I. R. Reid (2008). "Pathogenesis and management of Paget's disease of bone." Lancet **372**(9633): 155-163.
- Rashidi, H. and V. Sottile (2009). "The chick embryo: hatching a model for contemporary biomedical research." **31**(4): 459-465.
- Ribatti, D. (2008). "The chick embryo chorioallantoic membrane in the study of tumor angiogenesis." Rom J Morphol Embryol **49**(2): 131-135.
- Ribatti, D. (2016). "The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay." Reprod Toxicol.
- Ritter, J. and S. S. Bielack (2010). "Osteosarcoma." Ann Oncol **21** Suppl 7: vii320-325.
- Roodman, G. D. (1999). "Cell biology of the osteoclast." Exp Hematol **27**(8): 1229-1241.
- Rosenbruch, M. (1997). "[The sensitivity of chicken embryos in incubated eggs]." Altex **14**(3): 111-113.
- Sajadi, K. R., R. K. Heck, M. D. Neel, B. N. Rao, N. Daw, C. Rodriguez-Galindo, F. A. Hoffer, G. S. Stacy, T. D. Peabody and M. A. Simon (2004). "The incidence and prognosis of osteosarcoma skip metastases." Clin Orthop Relat Res(426): 92-96.
- Salmela, M. T., M. L. Karjalainen-Lindsberg, P. Puolakkainen and U. Saarialho-Kere (2001). "Upregulation and differential expression of matrilysin (MMP-7) and metalloelastase (MMP-12) and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-3 in Barrett's oesophageal adenocarcinoma." Br J Cancer **85**(3): 383-392.
- Savage, S. A. and L. Mirabello (2011). "Using Epidemiology and Genomics to Understand Osteosarcoma Etiology." Sarcoma **2011**.

Seto, F. (1981). "Early Development of the Avian Immune System1." Poultry Science **60**(9): 1981-1995.

Shannon, S. G., A. W. Moran, L. C. Shackelford and K. T. Mason (1994). Effect of Vibration Frequency and Amplitude on Developing Chicken Embryos, ARMY AEROMEDICAL RESEARCH LAB FORT RUCKER AL.

Sigma-Aldrich/Merck (2018). "Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DME) Formulation."

Sigma-Aldrich/Merck (2018). "RPMI-1640 Media Formulation."

Slodownik, D., I. Grinberg, R. M. Spira, Y. Skornik and R. S. Goldstein (2009). "The human skin/chick chorioallantoic membrane model accurately predicts the potency of cosmetic allergens." Exp Dermatol **18**(4): 409-413.

Sneppen, O. and L. M. Hansen (1984). "Presenting symptoms and treatment delay in osteosarcoma and Ewing's sarcoma." Acta Radiol Oncol **23**(2-3): 159-162.

Song, I. and A. Dityatev (2017). "Crosstalk between glia, extracellular matrix and neurons." Brain Res Bull.

Storgard, C., D. Mikolon and D. G. Stupack (2005). Angiogenesis Assays in the Chick CAM. Cell Migration: Developmental Methods and Protocols. J.-L. Guan. Totowa, NJ, Humana Press: 123-136.

Sys, G. M., L. Lapeire, N. Stevens, H. Favoreel, R. Forsyth, M. Bracke and O. De Wever (2013). "The in ovo CAM-assay as a xenograft model for sarcoma." J Vis Exp(77): e50522.

Tannenbaum, J. and B. T. Bennett (2015). "Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose." J Am Assoc Lab Anim Sci **54**(2): 120-132.

- Tuan, R. S. (1987). "Mechanism and regulation of calcium transport by the chick embryonic chorioallantoic membrane." J Exp Zool Suppl **1**: 1-13.
- Valery, P. C., M. Laversanne and F. Bray (2015). "Bone cancer incidence by morphological subtype: a global assessment." Cancer Causes Control **26**(8): 1127-1139.
- van den Berg, H. and J. H. Merks (2014). "Incidence and grading of cranio-facial osteosarcomas." Int J Oral Maxillofac Surg **43**(1): 7-12.
- Vinardell, M. P. and M. Mitjans (2008). "Alternative methods for eye and skin irritation tests: an overview." J Pharm Sci **97**(1): 46-59.
- Wang, M., J. Zhao, L. Zhang, F. Wei, Y. Lian, Y. Wu, Z. Gong, S. Zhang, J. Zhou, K. Cao, X. Li, W. Xiong, G. Li, Z. Zeng and C. Guo (2017). "Role of tumor microenvironment in tumorigenesis." J Cancer **8**(5): 761-773.
- Wangensteen, O. D. (1972). "Gas exchange by a bird's embryo." Respiration Physiology **14**(1): 64-74.
- Wangensteen, O. D. and H. Rahn (1970). "Respiratory gas exchange by the avian embryo." Respir Physiol **11**(1): 31-45.
- Weir, H. K., M. J. Thun, B. F. Hankey, L. A. Ries, H. L. Howe, P. A. Wingo, A. Jemal, E. Ward, R. N. Anderson and B. K. Edwards (2003). "Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2000, featuring the uses of surveillance data for cancer prevention and control." J Natl Cancer Inst **95**(17): 1276-1299.
- Weis, S. M. and D. A. Cheresch (2011). "Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets." Nat Med **17**(11): 1359-1370.
- Whiteside, T. L. (2008). "The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth." Oncogene **27**(45): 5904-5912.

WHO (2002). World Health Organization Classification of Tumours - Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone.

Wilson, T. and J. W. Hastings (1998). "Bioluminescence." Annu Rev Cell Dev Biol **14**: 197-230.

Wittig, J. C., J. Bickels, D. Priebat, J. Jelinek, K. Kellar-Graney, B. Shmookler and M. M. Malawer (2002). "Osteosarcoma: a multidisciplinary approach to diagnosis and treatment." Am Fam Physician **65**(6): 1123-1132.

Yu, L. and S. J. Yang (2018). "Primary Osteosarcoma of the Liver: Case Report and Literature Review." Pathol Oncol Res.

ZEBET, Z. z. E. u. B. v. E.-u. E. z. T. (2019). Retrieved 21.04.2019, 2019, from <https://www.bfr.bund.de/de/zebet-1433.html>.

Zhu, W., F. Hu, T. Zhao, C. Wang and Q. Tao (2016). "Clinical Characteristics of Radiation-Induced Sarcoma of the Head and Neck: Review of 15 Cases and 323 Cases in the Literature." J Oral Maxillofac Surg **74**(2): 283-291.