

Aus der Kinderchirurgischen Klinik und Poliklinik im  
Dr. von Haunerschen Kinderspital Ludwig-Maximilians-Universität  
München

Direktor: Prof. Dr. med. Dietrich von Schweinitz

**Von Mann und Maus**

—

**Translationale präklinische Plattformen für solide Tumore  
des Kindes- und Jugendalters**



Kumulative Habilitationsschrift

zum Erlangen der Venia Legendi für das Fach Kinderchirurgie, Medizinische Fakultät

vorgelegt von Dr. med. Ferdinand Wagner

München, 02. September 2019

## **Fachmentorat**

Prof. Dr. med. Dietrich von Schweinitz

Prof. Dr. med. Irene Schmid

Prof. Dr. rer. nat. Roland Kappler

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Hintergrund .....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Arbeitsfelder der schriftlichen Habilitationsleistung.....</b>	<b>7</b>
2.1	Arbeitsfeld 1: Untersuchung der Effekte von Rapamycin auf das Hepatoblastom am Mausmodell .....	8
2.2	Arbeitsfeld 2: Ein ektopes humanisiertes Knochenmodell als Plattform für die Erforschung von malignen primären Knochentumoren.....	11
2.3	Arbeitsfeld 3: Die Translation präklinischer Daten aus einem ektopen humanisiertem Knochenmodell identifiziert HIF2 $\alpha$ als potentiellen Osteosarkommarker .....	17
2.4	Arbeitsfeld 4: Ein modulares humanisiertes orthotopes Knochenmodell zur präklinischen Forschung an primären Knochentumoren.....	23
<b>3</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>31</b>
4.1	Curriculum vitae.....	31
4.2	Aktualisiertes Verzeichnis wissenschaftlicher Abhandlungen .....	32
4.3	Bisher abgehaltene Lehrveranstaltungen .....	38
4.4	Versicherung an Eides Statt über die selbständige Verfassung der Habilitationsleistung....	39
4.5	Versicherung an Eides Statt, dass bisher keine Ablehnung eines Habilitationsverfahren erfolgt ist. ....	40
4.6	Vorschläge für mögliche Gutachter .....	41
4.7	Danksagung .....	42
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>43</b>

# 1 Hintergrund

Zweihundertundelf Kinder sind im Jahre 2015 laut dem statistischen Bundesamt aufgrund maligner Erkrankungen verstorben (1). Dies entspricht etwa einem Fünftel aller Todesursachen in der Altersgruppe von 1 bis 15 Jahren. Die Mehrzahl betrifft Patienten mit Leukämien. Fünfzehn Kinder waren aufgrund von bösartigen Erkrankungen ausgehend von Knochen- und Knorpelgewebe und 5 Fälle aufgrund von bösartigen Lebertumoren verstorben. Für das Hepatoblastom, dem häufigsten malignen Lebertumor des Kindesalters, wird eine Inzidenz von 0,7-1 Fall pro 1 Million beschrieben (2). Verglichen mit der Gesamtbevölkerung spiegeln diese Zahlen die Seltenheit solider Malignome im Kindesalter wieder. Daher ist es nicht verwunderlich, dass nur ein sehr limitiertes Patientenkollektiv zur wissenschaftlichen Überprüfung der heute angewandten Therapieansätze zur Verfügung steht.

Internationale Studiengemeinschaften, wie etwa die SIOPEL (Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique – Epithelial Liver Tumor Study Group) versuchen daher durch einen Zusammenschluss die Generierung eines möglichst großen, homogenen Patientenkollektiv zu erreichen (3). Die interdisziplinäre Zusammenarbeit von Grundlagenwissenschaftlern, Pathologen, Radiologen, Kinderchirurgen und Onkologen soll hier maximale Kräfte bündeln und angewandte Therapiekonzepte entwickeln. Durch die dadurch erhaltenen Daten konnte die chemotherapeutische und onkochirurgische Strategie in den letzten Jahren so optimiert werden, dass die Überlebenschance der oft noch sehr jungen Patienten auf über 90 Prozent in der Standard-Risiko-Gruppe gesteigert wurden (4). Jedoch verbleibt bei dieser Erkrankung eine Hoch-Risiko-Patientengruppe mit weiterhin schlechten Überlebensraten von nur 45-80% (4, 5).

Trotz intensiver internationaler Bemühungen sind auch für den häufigsten malignen primären Knochentumor, dem Osteosarkom, weiterhin schlechte Überlebensraten beschrieben (6). Neue neoadjuvante Therapieansätze und chirurgische Techniken machen eine Amputation der betroffenen Extremität meist nicht mehr notwendig wodurch die Lebensqualität der jungen Patienten deutlich verbessert werden konnte. Dennoch stagnierte die Gesamtüberlebensrate vor etwa 20 Jahren und liegt seither unverändert bei 60 bis 70% (7-13). Mittlerweile hat sich die Forschungsgemeinschaft zu einem transatlantischen Bündnis zusammengeschlossen um mit Hilfe der EURAMOS (European and American Osteosarcoma Study Group) das Patientenkollektiv nochmals zu erweitern und neue Wege zu finden (14-17). Häufige Krebsarten wie Brust- und Colonkarzinom wecken naturgemäß ein größeres wirtschaftliches Interesse bei Wissenschaftlern und der Chemotherapeutika-produzierenden



Industrie. Für seltenere Malignome stehen dagegen nur wenig finanzielle Mittel zur Verfügung um an der Entwicklung neuer wirksamer therapeutischer Substanzen zu arbeiten. Obwohl es auf chirurgischer Ebene bezüglich Patientensicherheit und der Einführung neuer hoch-technologisierter Implantaten zur Extremitätenrekonstruktion zu einer kontinuierlichen Weiterentwicklung und Erhöhung der Lebensqualität kam, gibt es für das Osteosarkom keinerlei Neuentwicklungen auf dem medikamentösen Sektor. Die aktuell verwendeten Chemotherapeutika stehen seit Jahrzehnten zur Verfügung und neue Arzneimittelgruppen finden kaum Ihren Weg in die klinische Anwendung (13).

Als weiteres Problem sind die aktuellen konventionellen präklinischen *in vivo* Modelle, welche kein adäquates Mittel zur Detektion neuer wirksamer therapeutischer Substanzen darstellen (13, 18). Im Jahre 2014 bestätigte Perrin *et al.* in einem Beitrag für *Nature*, dass letztendlich 80% aller im Tiermodell wirksam getesteten Arzneimittel im Menschen keinen Mehrwert zeigen (19). Hackam *et al.* haben in einer Analyse aller in *Science*, *Nature*, *Cell*, *Nature Medicine*, *Nature Genetics*, *Nature Immunology* und *Nature Biotechnology* publizierter präklinischer Studien gezeigt, dass diese in nur 30% je in eine zuverlässige randomisierte kontrollierte klinische Studie übertragen werden (20). Insgesamt werden weniger als 10% aller vielversprechenden in der Grundlagenwissenschaft gewonnen Erkenntnisse innerhalb von 20 Jahren überhaupt an einem Patienten getestet (21). Als Hauptgrund wird genannt, dass für viele der klinischen Fragestellungen schlichtweg die falschen, nicht-übertragbaren präklinischen Modelle verwendet werden (22). Aufgrund dieser Bedenken versuchen sogenannte „transnationale“ Forschungsansätze experimentelle Laborergebnisse besser in die Klinik zu übertragen (13).

Die am weitesten verbreitete *in-vivo*-Plattform zur präklinischen Testung von neuen Therapeutika ist der Mausorganismus. Trotz der kostengünstigen und standardisierbaren Anwendbarkeit von Mausmodellen zur Suche möglicher wirksamer Substanzen ist mittlerweile klar, dass schon kleinste Unterschiede in den Aminosäuresequenzen der Proteine oder in der Basenpaarabfolge der Genkodierung zu erheblichen Konsequenzen in der intra- und interzellulären Signaltransduktion führen (13). Dies ist vor allem entscheidend, wenn versucht wird diese mit sogenannten „targeted therapeutics“ gezielt zu beeinflussen (23, 24). Obwohl gewisse therapeutische Zielproteine wie zum Beispiel der vascular endothelial growth factor (VEGF) in Maus und Mann gleich benannt sind, sind deren Zieleffekte gegebenenfalls unterschiedlich.

Ein aktuell klinisches Beispiel für diesen Konflikt ist Denosumab. Diese Substanz hemmt durch Bindung an den Receptor Activator NF- $\kappa$ B Liganden (RANKL) die Resorption

von Knochen und wird daher in der Antiosteoporosetherapie eingesetzt (25). Es hat sich in ersten Studien herausgestellt, dass dieser Inhibitor nur an das humane Proteinprodukt bindet, jedoch nicht an das murine Gegenstück (26). Somit konnte dieses Medikament nie an den standardisierten präklinischen Mausmodellen getestet werden. Potenziell wirksame Substanzen können somit den üblichen standardisierten murinen Screening-Plattformen zur Medikamentenfindung entgehen und daher nie weiter untersucht werden (13).

Ein neuer Ansatz ist die sogenannte „Humanisierung“ von Mausorganismen um diese Inkompatibilität zwischen den verschiedenen Spezies zu umgehen (13, 27-30). Die „Humanisierung“ beschreibt die Technik der Integration von menschlichem Zielgewebe in den Mausorganismus um entsprechende Pathologien wie etwa humane Knochentumore in einer humanen Mikroumgebung zu untersuchen. Dadurch können die zu untersuchenden menschlichen Tumore in ihrer originären Umgebung mit den angrenzenden zellulären und extrazellulären Gewebekomponenten auf der gleichen humanen Gen- und Proteinebene kommunizieren und entsprechend interagieren. Dies hat zum Ziel die gesehenen Resultate mit höherer Wahrscheinlichkeit richtig auf das klinische Setting übertragen zu können(13).

Ziel dieser Arbeit war es verschiedene präklinische *in-vivo*-Modelle für die Anwendung an soliden Tumoren des Kindes- und Jugendalters zu etablieren und die Translation der Ergebnisse in die Klinik zu bewerten.

## 2 Arbeitsfelder der schriftlichen Habilitationsleistung

**Im Wesentlichen wurden 4 Arbeitsfelder bearbeitet:**

1. **Arbeitsfeld 1** beschreibt die präklinische *in-vitro*- und *in-vivo*-Testung von Rapamycin (Sirolimus) und dessen Effekte auf das Wachstum des Hepatoblastoms. Dieses Medikament wird im Rahmen der Organtransplantation als Immunsuppressivum verwendet und kann somit im Falle des Leberersatzes bei nicht resezierbarem Hepatoblastombefall der Leber dienen. (F.Wagner *et al.* Rapamycin blocks hepatoblastoma growth in vitro and in vivo implicating new treatment options in high-risk patients. *European Journal of Cancer*. 2012 Oktober; 48(15):2442-50.) (31).
2. Ein **zweites Arbeitsfeld** beschreibt die Entwicklung eines ektopen humanisierten Knochenmodells zur Anwendung am Osteosarkom (F. Wagner *et al.* A Validated Preclinical Animal Model for Primary Bone Tumor Research. *Journal of Bone and Joint Surgery Am.* (Juni 2016;98(11):916-25.)) (30).
3. **Arbeitsfeld 3** untersucht das unter 2. entwickelte Modell näher und versucht die Übertragung der gewonnen präklinischen Daten in die Klinik (F. Wagner *et al.* A humanized bone microenvironment uncovers HIF2 alpha as a latent marker for osteosarcoma. *Acta Biomaterialia* (April 2019;89:372-381)) (32).
4. **Arbeitsfeld 4** beschreibt die Entwicklung eines aufwendigeren orthotopen und modularen humanisierten tissue-engineerten Knochenmodells am Mausfemur. Dieses wird im Anschluss auf die Anwendbarkeit im Osteosarkom überprüft und die gewonnenen Daten auf den Menschen übertragen (F. Wagner *et al.* Humanization of bone and bone marrow in an orthotopic site reveals new potential therapeutic targets in osteosarcoma. *Biomaterials* 2018 Juli;171:230-246)) (33).

**Im Folgenden werden die Arbeitsfelder detaillierter beschrieben und die genannten Publikationen des Habilitanden zusammengefasst:**

## **2.1 Arbeitsfeld 1: Untersuchung der Effekte von Rapamycin auf das Hepatoblastom am Mausmodell**

Sirolimus wurde ursprünglich auf der Osterinsel „Rapa Nui“ entdeckt. Zunächst wurde es für die Applikation als Antimykotikum getestet und daher Rapamycin genannt (34). Im Laufe der folgenden Jahre hat sich Rapamycin jedoch vor Allem als wirksames Immunsuppressivum erwiesen und somit seine Anwendung in der Organtransplantation gefunden (35). Guba *et al.* konnten schließlich zeigen, dass Rapamycin im Gegensatz zu anderen klassischen Immunsuppressiva einen ausgeprägten Antitumor-Effekt aufweist (36). Dieser wurde insbesondere auf einen antiangiogenetischen Effekt zurückgeführt. Im Anschluss zeigten mehrere Studien, dass Rapamycin und seine Analoga - die sogenannten mTOR-Inhibitoren oder Rapaloga – das Wachstum von verschiedensten Tumorentitäten wie etwa Bronchial- und Mammakarzinom hemmen (36). Die Studien zeigten aber auch, dass die Hemmung des mTOR-Signalwegs nicht nur die Tumorangiogenese, sondern auch die allgemeine Proliferation von Tumorzellen unterdrückt (34) (Abb. 2.1.1). 2009 wurde Everolimus als erster mTOR-Inhibitor zur Anwendung im Nierenzellkarzinom in Deutschland zugelassen (37, 38). Auch in der pädiatrischen Patientenpopulation bestehen bereits Anwendungen im Falle von benignen Neoplasien wie der Tuberösen Hirnsklerose (39, 40).

Hepatoblastompatienten werden üblicherweise in Standard-Risiko- und Hoch-Risiko-Gruppen eingeteilt. Zur letzteren Gruppe gehören auch die sogenannten PRETEXT-IV-Tumore welche alle 4 Lebersegmente betreffen und oft multifocal die Leber befallen. In diesen Fällen besteht meist die Indikation zur Transplantation (2, 41). Da hier im Anschluss eine medikamentöse Langzeit-Immunsuppression notwendig wird, liegt es nahe ein Immunsuppressivum zu wählen, welches auch Antitumor-Effekte besitzt. Rapamycin bringt aufgrund seiner oralen Applikationsform eine besser akzeptierte Anwendbarkeit in Kindern mit sich. Daher stellte sich die Frage, ob diese Substanz das Wachstum von Hepatoblastomen hemmen kann und so gegebenenfalls auch als Langzeit-Rezidivprophylaxe dienen kann.

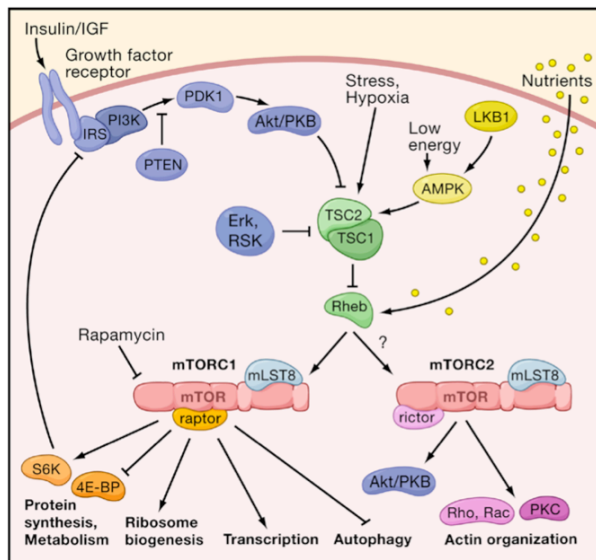


Abbildung 2.1.1. Rapaloga hemmen das sog. mTOR-1 (mamillian Target of Rapamycin-1) und damit den IGF/AKT/mTOR-Signalweg. Durch Bindung an den IGF-Rezeptor kommt es in der Signalkaskade zur Phosphorylierung und Aktivierung von AKT und im Verlauf zur Aktivierung von mTOR. Durch Rapaloga kann an mTOR die Phosphorylierung bzw. Aktivierung von p70S6-Kinase (p70S6K) und 4E-binding protein 1 (4EBP1) verhindert werden. In verschiedensten Tumoren konnte über diesen Mechanismus eine Hemmung der Angiogenese, Zellproliferation und eine Induktion von Apoptose erreicht werden. (Abbildung aus Wullschlegler et al., Cell 2006 (34).

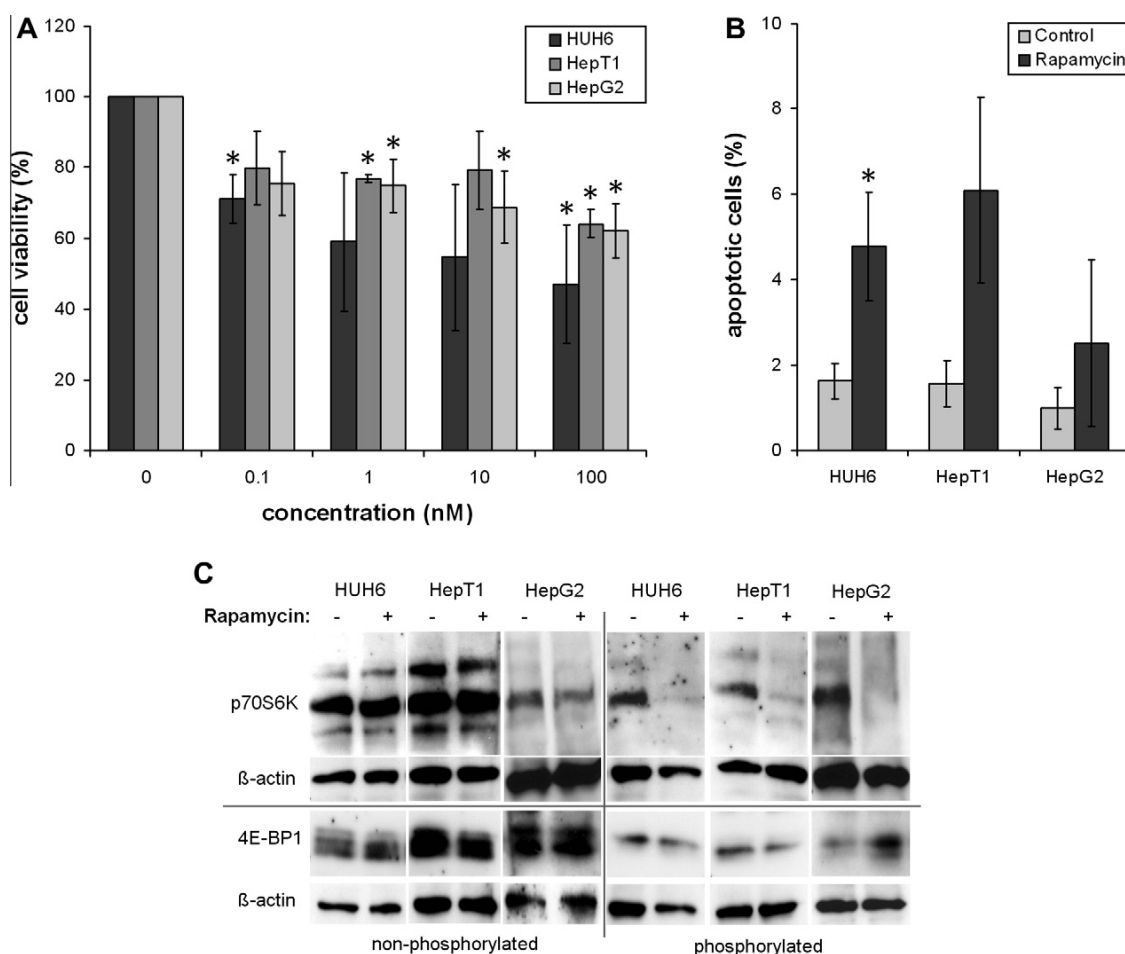
In der von uns durchgeführten Studie erfolgte zunächst die *in-vitro*-Testung von Rapamycin in Bezug auf eine potentielle Wachstumsinhibierung von Hepatoblastomzellen. Hierfür erfolgten MTT-Proliferations-Assays mit den drei bekanntesten humanen Hepatoblastomzelllinien HUH6, HepT1 und HepG2. In diesen Assays konnte mit ansteigender Rapamycin-Konzentration im Zellmedium eine zunehmend signifikante Wachstumshemmung belegt werden (Abb. 2.1.2A). Genauere Untersuchungen ergaben, dass Rapamycin in allen 3 Zelllinien den sogenannten „programmierten Zelltod“ (= Apoptose) induziert (Abb. 2.1.2B) und die Phosphorylierung - und damit die Aktivierung - der p70s6Kinase hemmt (Abb. 2.1.2C). Dies beweist eine direkte Hemmung des mTOR-Signalwegs (Abb. 2.1.1).

Daraufhin erfolgte die *in-vivo*-Testung von subkutan etablierten HUH-6-Hepatoblastomen in der immunsupprimierten *nu/nu*-Balb/c-Maus. Hier konnte nach oraler Rapamycingabe über einen Therapiezeitraum von 21 Tagen ein signifikant kleineres Tumolvolumen in den behandelten Mäusen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Abb. 2.1.3). Dabei ergaben sich bereits ab Tag 5 signifikante Unterschiede. In weiteren Analysen zeigte sich auch hier eine Dephosphorylierung und somit Deaktivierung der p70s6Kinase. Dies ist mit einer Hemmung der Proliferation in diesen Tumoren verbunden. Die detaillierten Ergebnisse dieser Arbeit konnten im *European Journal of Cancer* publiziert werden (F. Wagner, B. Henningsen *et al.* Rapamycin blocks hepatoblastoma growth *in vitro* and *in vivo* implicating new treatment options in high-risk patients. *European Journal of Cancer*. 2012;48(15):2442-50.) (31).

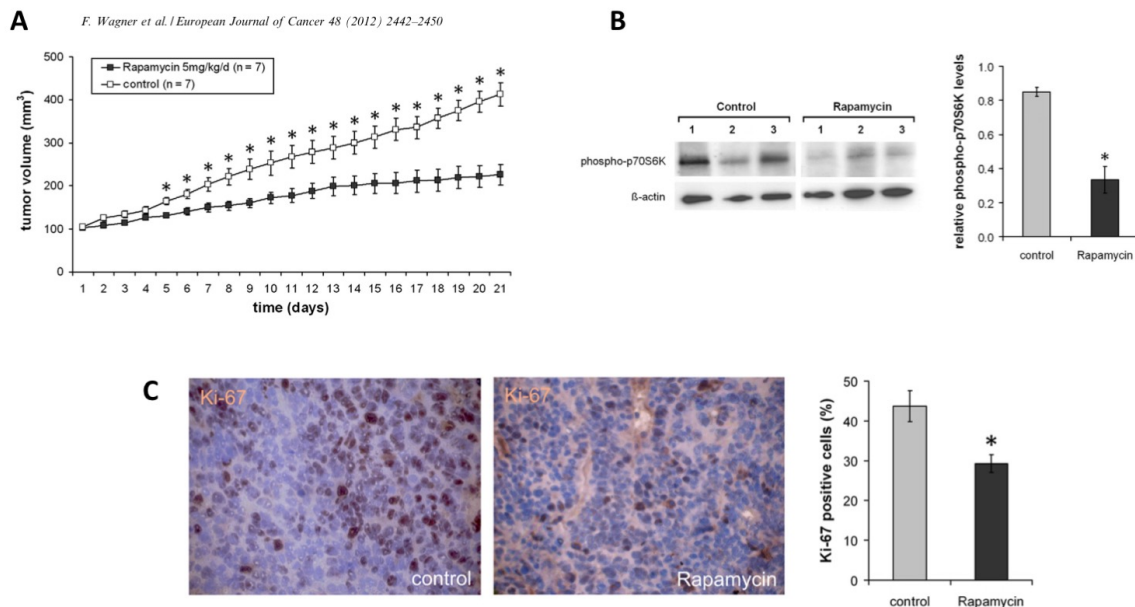
Als Konsequenz dieser Arbeit ist Rapamycin in das Studienprotokoll der aktuellen Hepatoblastom-Studie aufgenommen worden und wird in Fällen der Lebertransplantation als Immunsuppressivum empfohlen (42-44). Somit konnte durch die Ergebnisse dieser Arbeit eine Translation der präklinischen Ergebnisse in die Klinik erfolgen. Erste klinische Fälle werden bereits mit Rapamycin oder anderen mTOR-Inhibitoren behandelt. Langzeitstudien werden den Erfolg dieses Regimes beweisen müssen (44).

F. Wagner et al. / *European Journal of Cancer* 48 (2012) 2442–2450

2445



**Abbildung 2.1.2.** (A) Hemmung des Tumorwachstums durch Rapamycin. Die Zelllinien HUH6, HepT1 und HepG2 wurden über 48h mit aufsteigender Rapamycinkonzentration behandelt. Zellvitalitäts-Analysen (cell viability) mittels MTT-Assay belegten eine konzentrationsabhängige Hemmung des Tumorwachstums. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten ( $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte (SEM)) dargestellt. \* = signifikante Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (0 nM) mit einem p-Wert  $< 0.05$ . (B) Induktion der Apoptose durch Rapamycin. Cleaved Caspase-3-positive Zellen (= apoptotische Zellen) wurden nach 48-stündiger Inkubation mit 100nM Rapamycin gezählt und der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen ermittelt (apoptotic cells (%)  $\pm$ SEM). \*  $p < 0.05$ . (C) Hemmung des mTOR Signalwegs. Western blot Analyse von nicht-phosphoryliertem und phosphoryliertem p70S6K und 4E-BP1 in Rapamycin-behandelten (100nM für 24h) und unbehandelten Hepatoblastomzellen.  $\beta$ -actin diente als Kontrolle für eine gleich verteilte Proteinkonzentration im Western blot-Gel. Abbildung modifiziert nach Wagner et al. 2012 (31)



**Abbildung 2.1.3.** (A) Hemmung des Hepatoblastomwachstums *in vivo*. Mäuse mit humanen subkutanen HUH6-Tumoren wurden für 21 Tage oral mit 5mg/kg/Tag Rapamycin behandelt. Eine Kontrollgruppe erhielt nur Wasser. Das mittlere Tumorgewicht ( $\pm$ SEM) war durch die Behandlung deutlich kleiner als die unbehandelten Tumore; \*  $p < 0.05$ . (B) Mittels Western Blot konnte erneut eine Hemmung der phosphorylierten p70SK nachgewiesen werden (links). Die Quantifizierung des relativen phospho-p70S6K-Proteingehalts im Vergleich zum  $\beta$ -actin-Gehalt (Kontrollprotein) zeigte hier eine signifikante Hemmung (Graph rechts; \*  $p < 0.05$ ). (C) Immunhistochemische Färbungen der Tumore belegten einen geringeren Anteil an Ki67-positiven Zellen (braun) nach Rapamycinbehandlung, entsprechend einer geringeren Proliferationsrate in den Tumoren. Nach Quantifizierung zeigte sich die Proliferation durch Rapamycin signifikant gehemmt (Graph rechts; \*  $p < 0.05$ ). Abbildung modifiziert nach Wagner *et al.* 2012 (31).

## 2.2 Arbeitsfeld 2: Ein ektopes humanisiertes Knochenmodell als Plattform für die Erforschung von malignen primären Knochentumoren.

Bei der Untersuchung von Knochentumoren liegt es nahe als humanisiertes Zielgewebe eine humane Knochenmikroumgebung zu schaffen in welcher die Biologie dieser Neoplasie naturgetreuer untersucht werden kann. In Vorarbeiten haben Holzapfel, Wagner und Thibaudaeu et al. ein humanisiertes Knochenmodell auf tissue-engineerter Scaffold-Basis etabliert (13, 27-29, 45, 46). Hierbei wurden Scaffolds, welche mit humanen Osteoblasten besiedelt waren, zusammen mit rekombinantem humanem bone morphogenetic protein 7 (rhBMP-7) subkutan in immunsupprimierte Mäuse implantiert. In den folgenden Wochen

kam es zu einer Bildung von Knochenorganen, welche nicht nur humane Knochenmatrixbestandteile sondern auch humane vitale mesenchymale Zellen enthielten. In mehreren Studien wurden Knochenmetastasenmodelle entwickelt in welchen sich humane Mammakarzinom- und Prostatakarzinomzellen nach systemischer intravenöser Applikation bevorzugt in den implantierten humanisierten Knochenorganen ansiedelten und dort Metastasen bildeten. Es konnte gezeigt werden, dass die humane Knochenstruktur und deren interzellulären Interaktionen mit den Tumorzellen der menschlichen Natur nachgestellt werden kann. Diese präklinische Forschungsplattform wurde nun bereits intensiv untersucht und kürzlich im genauesten Detail unter anderem in *Nature Protocols* publiziert (29).

Das soeben beschriebene Modell entspricht dem sogenannten „Bottom-up“-Ansatz (13, 33). Dieser Ansatz definiert das Aufbereiten und Zusammenfügen aller einzelnen Gewebsbestandteile unter extrakorporalen Zellkulturbedingungen vor der Implantation. Die weitere Etablierung eines Knochenorgans ist dann wesentlich von der *in-vivo*-Differenzierung der implantierten Zelltypen während der ersten Wochen nach Implantation abhängig.

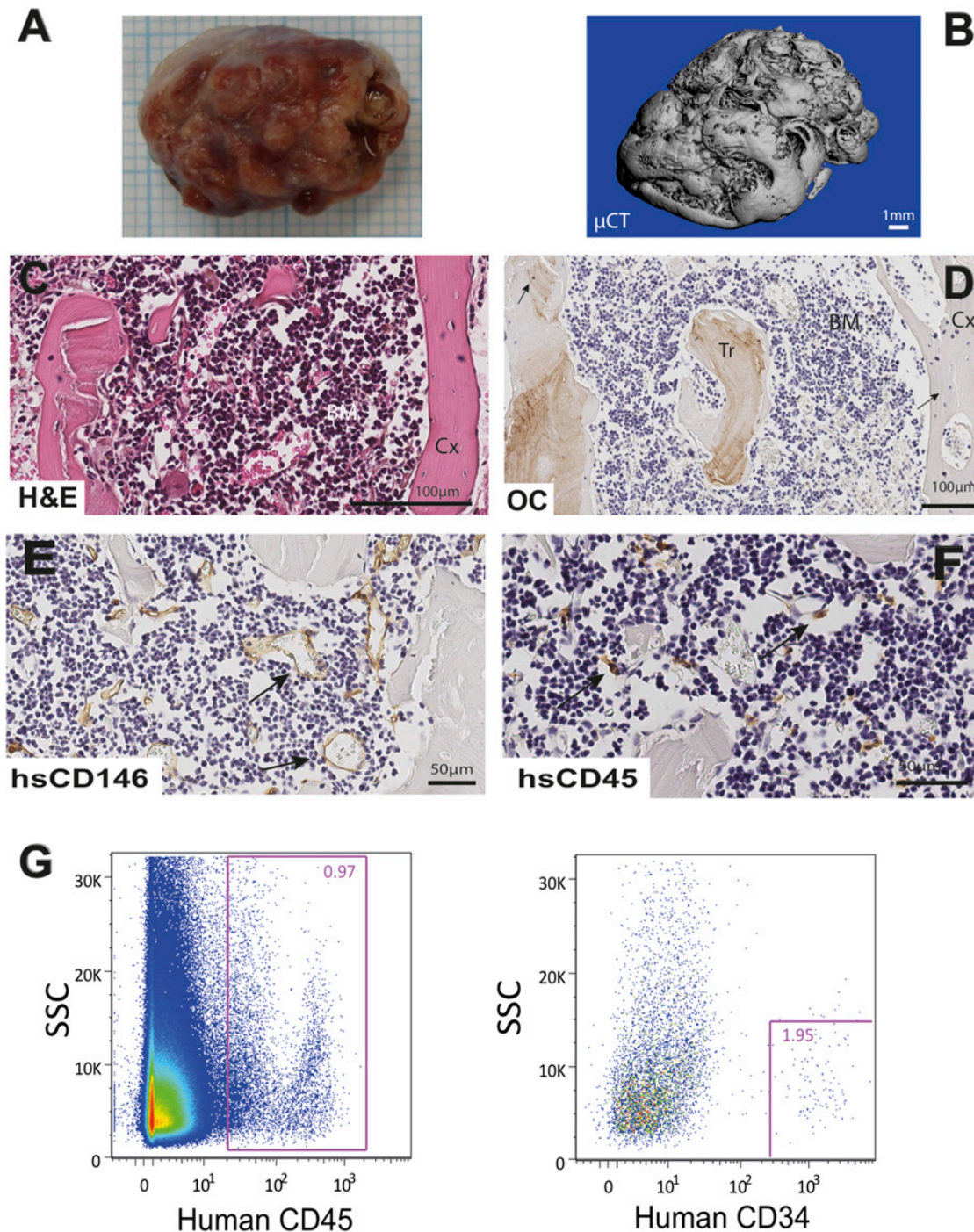
Um eine möglichst vollständige Humanisierung aller Gewebeanteile zu erreichen erfolgte in der nun beschriebenen Studie ein sogenannter „Top-down“-Approach (13, 30). Dieser Tissue-Engineering-Begriff ist definiert als die Implantation vollständiger Gewebestücke in einen immunsupprimierten Wirt. Hierbei werden möglichst viele ausgereifte Komponenten eines Gewebetyps integriert. In der nun beschriebenen Studie wurde im Rahmen von Hüftendoprothetischen Operationen Knochen aus dem Acetabulum von Patienten gewonnen. Während der Ausfräsung der Hüftpfanne fällt zerkleinertes Knochenmaterial an, welches normalerweise verworfen wird. Da das Becken auch im höheren Alter das blutbildende Organ des Menschen darstellt enthält das gewonnene Knochenmaterial zusätzlich hämatopoetisch aktives Knochenmark (47). Dieses Material wurde zu Zylindern geformt und mittels Fibrinkleber in seiner Form fixiert. Zusätzlich wurde bei der subkutanen Implantation der Konstrukte unter die Rückenhaut von immunsupprimierten NOD-*scid* Mäusen rhBMP-7 zugesetzt. Dies fördert zum einen die Knochenbildung, andererseits wurde bewiesen, dass es die Ansiedelung von hämatopoetischen Zellen induziert (48-51).

Zehn Wochen nach Implantation hatten sich unter der Haut der Versuchstiere Knochenorgane (sog. „humanized tissue-engineered bone organs“, hTEBO) gebildet. In den darauffolgenden Analysen zeigte sich, dass diese zum eine vitale humane zelluläre und extrazelluläre Knochenmatrixanteile, aber auch humane hämatopoetische Zellen beinhalteten (Abb. 2.2.1). Um diese humanisierte Knochenmikroumgebung für die Forschung an Knochtumore zu nutzen, erfolgte 10 Wochen nach hTEBO-Implantation die direkte



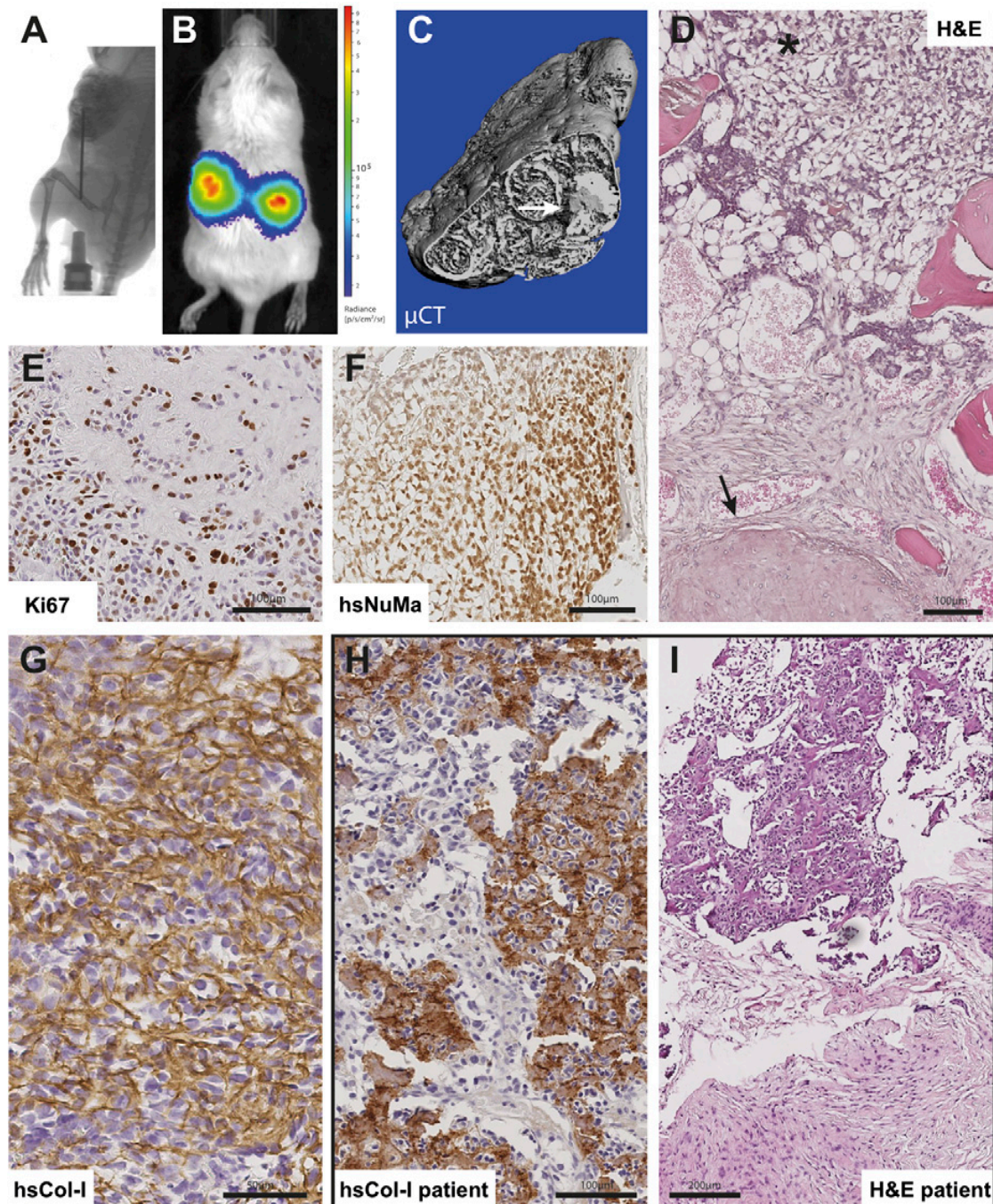
Injektion von humanen Osteosarkomzellen (Luc-SAOS-2) in die Konstrukte (Abb. 2.2.2A). Das Wachstum der Tumore konnte mittels Biolumineszenz-Imaging (BLI) verfolgt werden. Die etablierten Osteosarkome zeigten nicht nur den häufigsten histologischen Subtyp des Osteosarkoms - den osteoblastischen Subtyp - sie bildeten zudem in der Mehrzahl Lungenmetastasen. Da die Präsenz von Lungenmetastasen entscheidend für die Prognose des Patienten ist, ist dieses Ergebnis von erheblicher Bedeutung für die klinische Relevanz des Modells.

Bei der anschließenden immunhistochemischen Analyse konnten zusätzlich VEGF und Periostin im humanisierten Osteosarkomen nachgewiesen werden. Diese sind als wesentliche Proteinmarker für das Osteosarkom beschrieben und sollen prognostische Relevanz für den Verlauf der Erkrankung besitzen (52-54). Zusätzlich wurde erstmals HIF2 $\alpha$  in diesen humanisierten Osteosarkomen detektiert. Bei der Analyse einer Patientenprobe zeigte sich ein ähnliches Expressionsmuster, wie im humanisierten präklinischen Osteosarkom (Abb. 2.3.3). In einer Kontrollgruppe von Mäusen, in welcher Osteosarkomwachstum durch die klassische intratibiale Injektion von Luc-SAOS-2 induziert wurde, konnten diese Marker in den generierten Tumoren nicht nachgewiesen werden. Dies legt den Schluss nahe, dass das neu entwickelte humanisierte Osteosarkommodell der Erkrankung im Menschen auftretenden Erkrankung eher entspricht. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden im *Journal of Bone and Joint Surgery (Am)* publiziert (F. Wagner, BM. Holzapfel *et al.*; A Validated Preclinical Animal Model for Primary Bone Tumor Research. *J Bone Joint Surg Am.* 2016;98(11):916-25.) (13, 30).



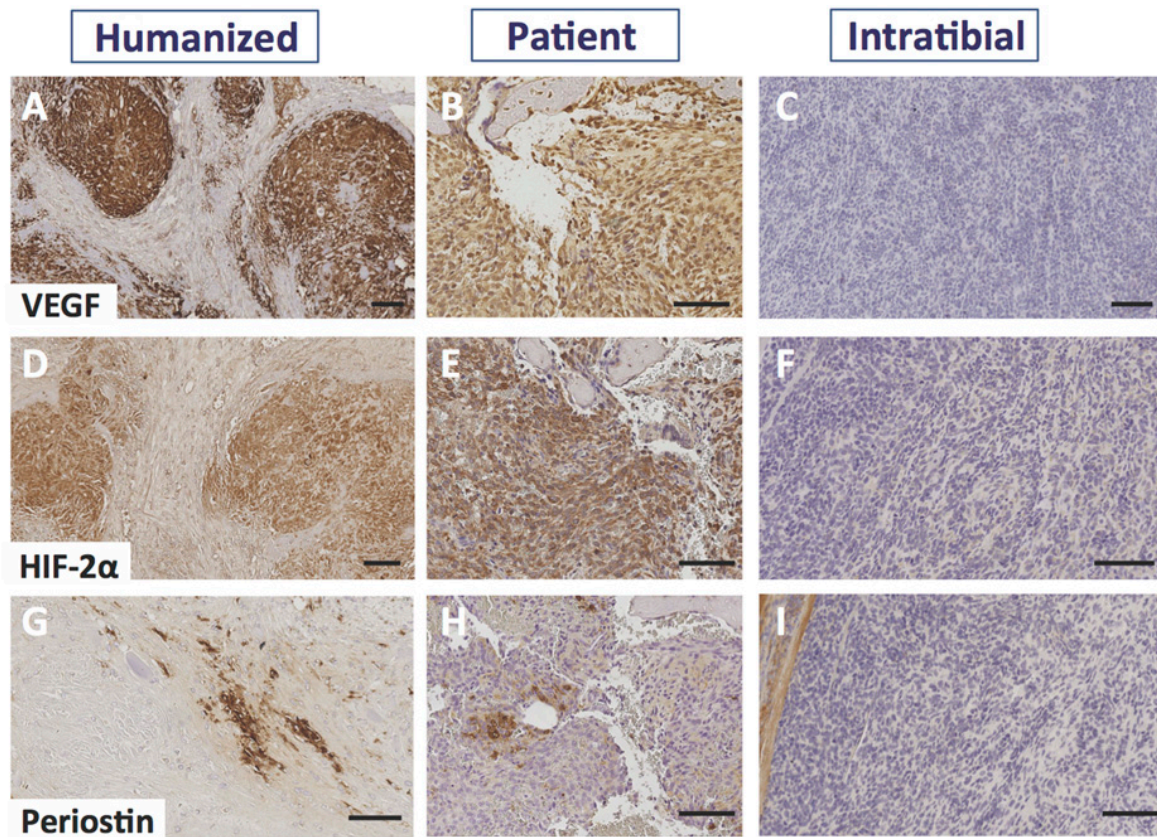
**Abb. 2.2.1.** Etablierung von „humanized tissue-engineered bone organs“ (hTEBO). Zehn Wochen nach subkutanem *in-vivo*-Wachstum in NOD-*scid*-Mäusen entwickelten sich makroskopisch Knochenorgane (A). Mikrocomputertomographien ( $\mu$ CT) zeigten trabekuläre Strukturen umgeben von einem äußeren Knochenkortex (B). Histologische H&E-Färbungen zeigten zusätzlich vitale Knochenmarkbestandteile (C). In den Knochenlakunen fanden sich vitale Osteozyten (Pfeile in D). Wie durch die positive immunohistochemische Färbung für humanes Osteocalcin (OC) dargestellt, war die Knochenbildung noch immer aktiv (D). Weitere Färbungen mit humanspezifischen (hs) Antikörpern gegen CD146 zeigte entsprechend positive Zellen (braun) in der Nachbarschaft zu Sinusoiden und wurden dadurch als mesenchymale Stammzellen (MSZs) identifiziert (Pfeile in E). Ein Anti-hsCD45-Antikörper wies humane Leukozyten nach (Pfeile in F). Durchflusszytometrische Analysen des Knochenmarks der hTEBOs für humanes CD45 und CD34 konnten humane hämatopoetische Stammzellen nachweisen (E). Tr = Trabekel; Cx = Kortex; BM = Knochenmark; SSC = Side Scatter. Abbildung modifiziert nach Wagner *et al.* 2016 und 2018 (13, 30).





**Abbildung 2.2.2.** Etablierung eines humanisierten OS-Modells. Fünf Wochen nach Injektion von Luc-SAOS-2-Zellen in die hTEBOs (unter radiologischer Kontrolle (A)) zeigte sich im Biolumineszenz-Imaging in 11 von 12 Mäusen ein Osteosarkom (B).  $\mu$ CT-Analysen zeigten eine osteoblastische Formation (C, Pfeil). In der histologischen Aufarbeitung zeigte sich schließlich eine Neoplasie, welche humanes Kollagen I (hsCol-I) produzierte (G). H&E-Färbungen zeigten Areale mit extensiver Bildung von extrazellulärer Matrix und Osteoid (D; Pfeil) benachbart zu Regionen mit hoher Zelldichte (Stern). Mittels Ki67-Färbungen konnte in diesen Regionen eine erhöhte Zellproliferation (E) nachgewiesen werden. Diese Zellen zeigten sich hsNuMa-positiv und damit humanen Ursprungs (F). Die Gewebemorphologie zeigte sich ähnlich wie im humanen OS (5H&I). Abbildung modifiziert nach Wagner *et al.* 2016 und 2018 (13, 30).





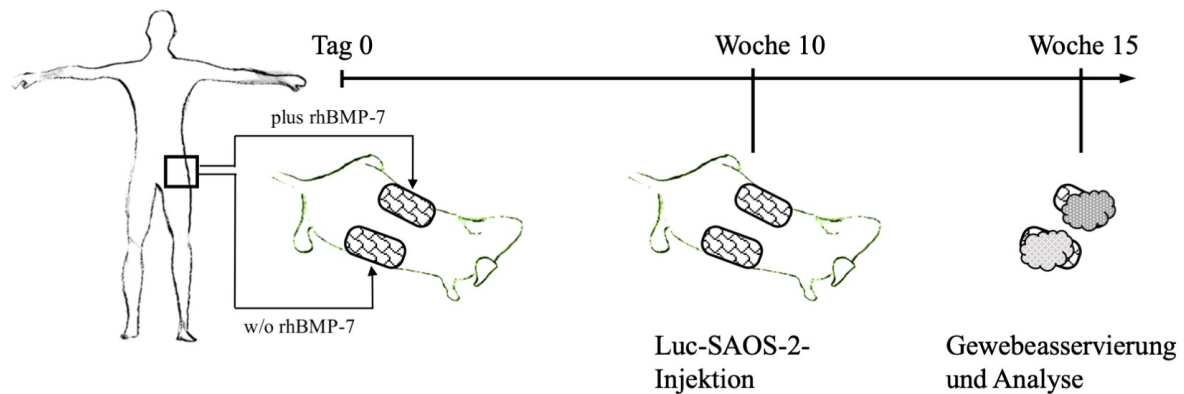
**Abbildung 2.2.3.** Evaluation der Markerexpression in den verschiedenen Modellen und im Menschen. Immunohistochemische Färbungen zeigten im humanisierten Osteosarkom Inseln mit erhöhter VEGF-Expression (A). Dies war verbunden mit einer hohen Expression von HIF2 $\alpha$  in diesen Arealen (D). Ebenso konnte Periostin im humanisierten Osteosarkom nachgewiesen werden (G). Die Expression dieser Marker war vergleichbar mit einer Osteosarkompatientenprobe (B&E&H). In den intratibialen Tumoren konnten diese Marker nicht nachgewiesen werden (C&F&I). Skalierungsbalken entsprechen 100 $\mu$ m. Abbildung modifiziert nach Wagner *et al.* 2016 und 2018 (13, 30).

### **2.3 Arbeitsfeld 3: Die Translation präklinischer Daten aus einem ektopen humanisierten Knochenmodell identifiziert HIF2 $\alpha$ als potentiellen Osteosarkommarker**

Um sich selbst ausreichend mit Nährstoffen versorgen zu können, benötigt ein solider Tumor zum progressiven Wachstum die Bildung von neuen Blutgefäßen (sog. Tumorangiogenese). Im Zentrum eines rasch wachsenden Tumors entsteht chronischer Sauerstoffmangel (Hypoxie). Hypoxie ist dabei ein wesentlicher Induktor für die Bildung neuer Gefäße (sog. „Neoangiogenese“) (55). Die Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren (HIF) initiieren dabei eine Signalkaskade, welche zur Neubildung von Gefäßen führt. Für eine Reihe von Tumorentitäten ist die Wichtigkeit von HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  belegt (13, 56-58). Zum Beispiel führt eine Expressionssteigerung dieser Transkriptionsfaktoren zu einer Aktivierung des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF). Dieser ist einer der potentesten derzeit bekannten pro-angiogenetischen Faktoren (59). HIF1 $\alpha$  wird dabei früh in der „akuten Tumorwachstumsphase“ exprimiert und leitet die ersten Schritte zur Induktion der angiogenetischen Signalkaskade ein. HIF2 $\alpha$  steigt später in das Geschehen ein und hat multiple Einflüsse auf Proliferation, Invasion und Zellinfiltration eines Tumors. HIF2 $\alpha$  scheint zusätzlich auf die Regulation der Proliferation und der Differenzierung adulter mesenchymaler Stammzellen Einfluss zu nehmen (55, 56).

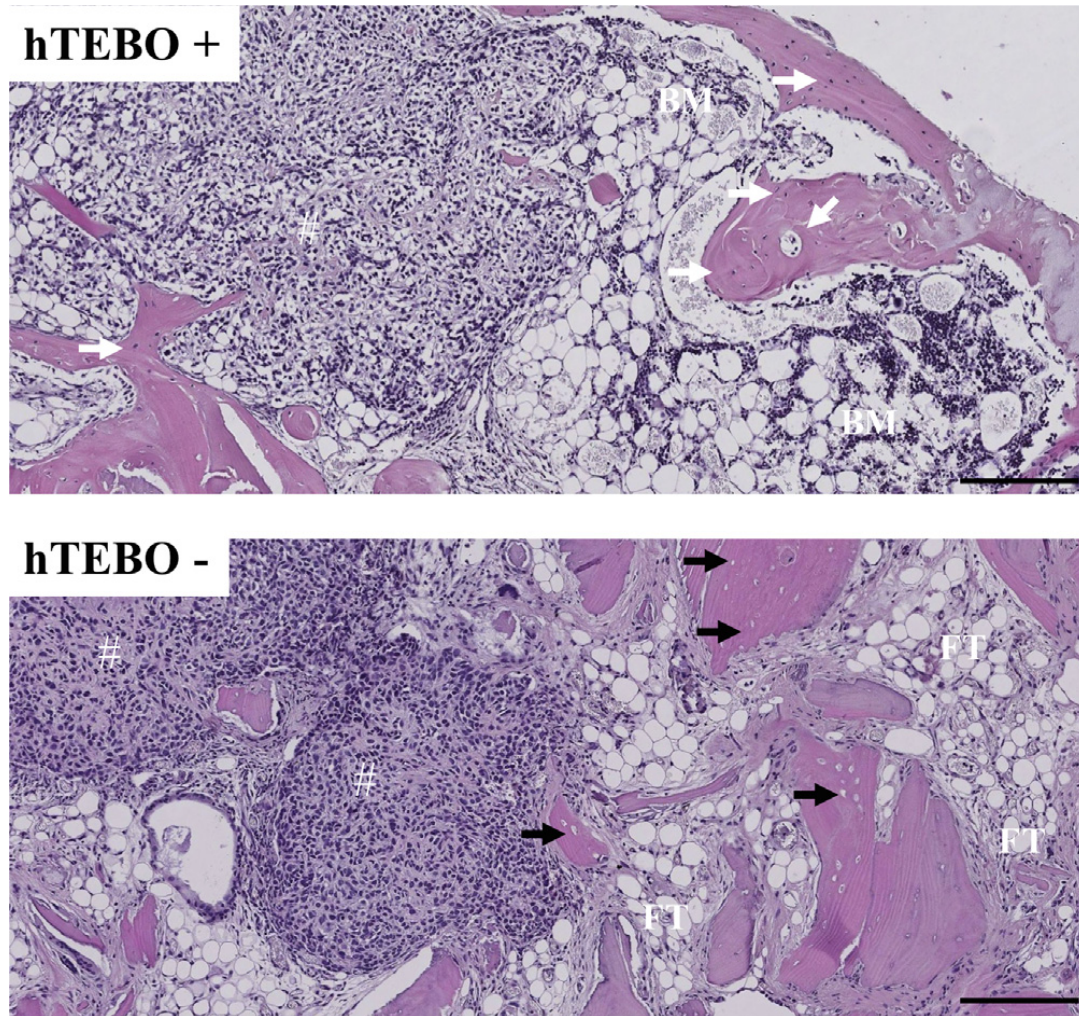
Da die Expression von HIF2 $\alpha$  im Osteosarkom bisher nicht beschrieben wurde, lag es im Hinblick der vorausgehenden Studie nahe, die Expression dieses Markers im Osteosarkom näher zu untersuchen (13). Zunächst galt es die Frage zu klären, ob die Expression von HIF2 $\alpha$  von der umgebenen Mikroumgebung abhängig ist. Knochenkonstrukte mit unterschiedlicher ossärer Mikroumgebung zu generieren wurden erneut hTEBOs in Mäuse implantiert (Abb. 2.3.1 für Versuchsablauf). Dabei wurde in die linke Flanke der Mäuse ein Knochenkonstrukt mit rhBMP-7 (hTEBO+) und in die rechte Flanke ein Konstrukt ohne rhBMP-7 (hTEBO-) implantiert. Wie schon in der vorausgehenden Studie zeigten sich die Konstrukte mit rhBMP-7 nach 10-wöchiger, subkutaner *in-vivo*-Integration vital mit neu gebildetem Knochengewebe, die Konstrukte ohne rhBMP-7 stellten sich als Knochenreste ohne vitaler Knochenmatrix und avitalem Knochenmark dar. Somit wurde davon ausgegangen, dass der Grad der vitalen Humanisierung durch die Zugabe von rhBMP-7 erhöht werden kann und folglich die hTEBO+ als „humanisiert“, die hTEBO- als „kaum oder nicht humanisiert“ bezeichnet. Es wurden erneut Luc-SAOS-2-Zellen injiziert (Abb. 2.3.2).

Mittels PCR-Analysen und immunhistochemischer Quantifizierung wurde die Expression der in der Literatur beschriebenen osteosarkomspezifischen Marker Ezrin, VEGF, HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  und Periostin bestimmt (Abb. 2.3.3.). Hier zeigte sich deutlich, dass HIF2 $\alpha$  in den Osteosarkomen, welche von humanisierten hTEBO+ umgeben waren, signifikant höher exprimiert wurde als in den Osteosarkomen in den nicht-humanisierten hTEBO-.

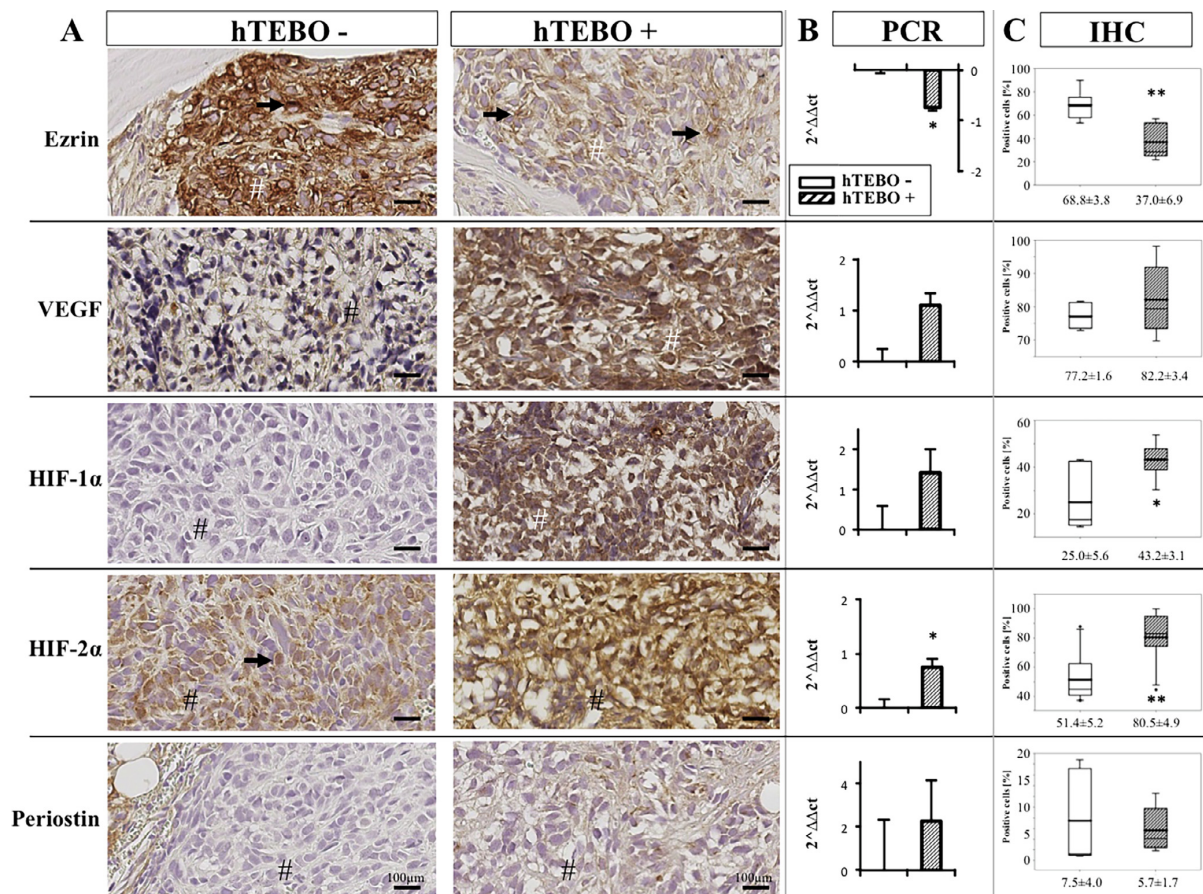


**Abbildung 2.3.1.** Versuchsablauf. Erläuterungen siehe Text. Modifiziert nach Wagner et al. 2018 und 2019 (13, 32).





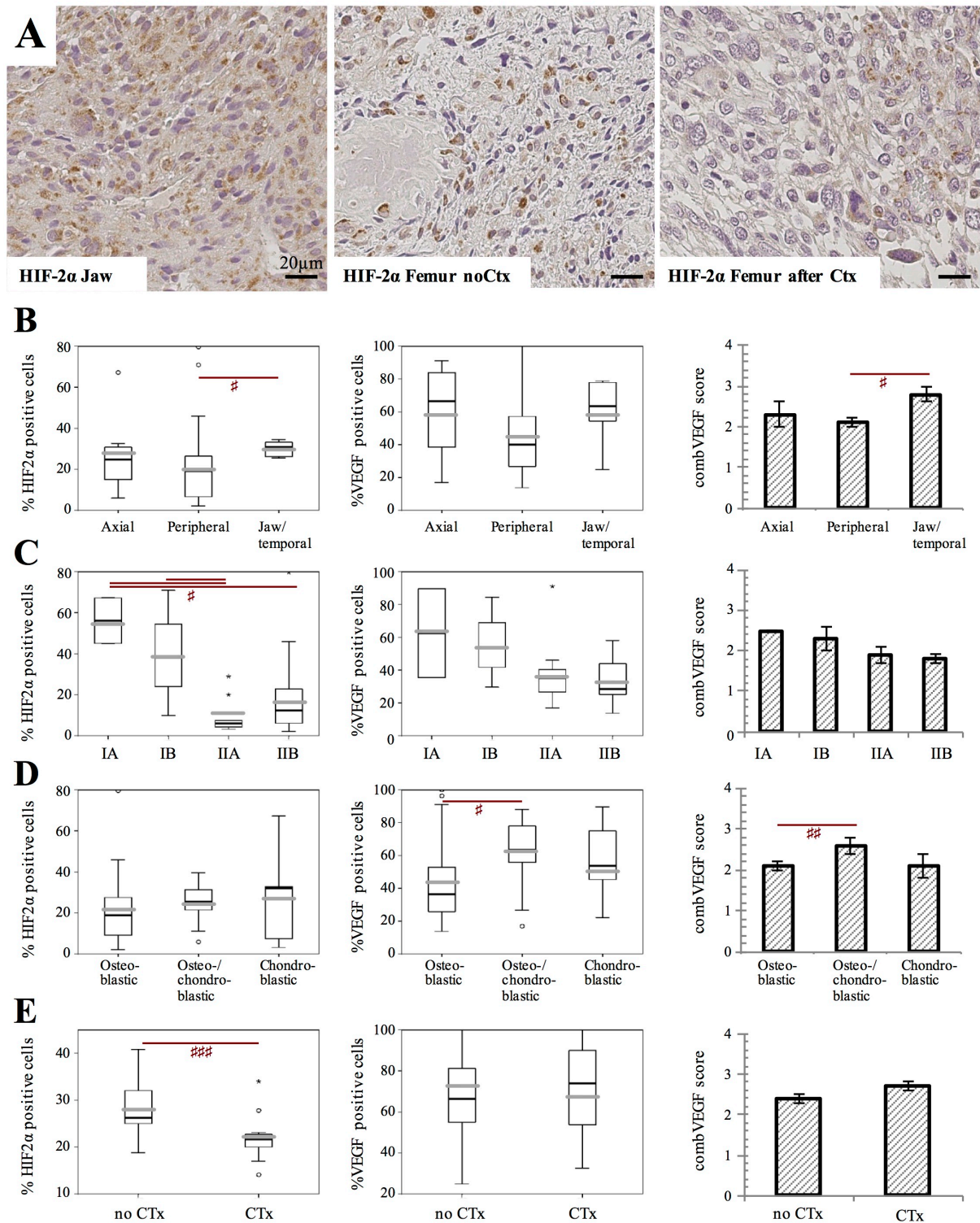
**Abb. 2.3.2.** H&E-Färbungen zeigen Unterschiede in der Knochenmikroumgebung innerhalb der hTEBOs. In der hTEBOs+ Gruppe zeigten sich die Tumore (#) umgeben von Knochenmark (BM) und vitaler Knochenmatrix. Dies zeigte sich an vitalen Osteozyten innerhalb der Knochenlakunen (weiße Pfeile). Tumore innerhalb hTEBO- waren nicht von Knochenmark, sondern von fibrösem Gewebe oder Fett (FT) und toter Knochenmatrix (leere Knochenlakunen ohne Osteozyten; schwarze Pfeile) umgeben. Modifiziert nach Wagner et al. 2018 und 2019 (13, 32).



**Abbildung 2.3.3.** (A) Representative immunohistochemische Abbildungen von Osteosarkomen innerhalb hTEBOs. (B) Die Genexpression von *EZRIN*, *VEGF*, *HIF1α*, *HIF2α* und *PERIOSTIN* wurde als  $2^{\Delta\Delta Ct}$  relative zur Kontrolle (hTEBO-)  $\pm$  SEM ausgedrückt (hTEBO- -Genexpression wurde kalibriert zum "house keeping gene" RPLA13A und als Null gesetzt). (C) Mittlerer prozentualer Anteil positivgefärbter Zellen je Gruppe der entsprechenden Marker dargestellt als Boxplots. Zahlen innerhalb der Graphen geben den Mittelwert  $\pm$  SEM je Gruppe an. Modifiziert nach Wagner et al. 2018 und 2019 (13, 32).

Nun stellte sich als zweite Frage, ob eine Expression von HIF2 $\alpha$  in Osteosarkompatienten zu finden ist, und ob sich hier eine klinische Relevanz für die HIF2 $\alpha$ -Expression ergibt. Hierfür standen – auch in Zusammenarbeit mit den Kollegen der Orthopädie und Pathologie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München - mittels Tissue Micro-Arrays histologische Proben von 70 Osteosarkompatienten vor Chemotherapie zu Verfügung (Abb. 2.3.4.).





**Abbildung 2.3.4.** TMA-Analyse von 70 Patienten (A) Representative immunohistochemische Färbung für HIF2α eines Patienten mit Osteosarkom des Kiefer (jaw, links) und eines Patienten mit Osteosarkom am Femur (Mitte) vor Chemotherapie (noCtx) und nach Chemotherapie (after Ctx, rechts). Die Graphen zeigen die quantitative Ergebnis der immunohistochemischen Analysen bezüglich Lokalisation des Primärtumors (B), UICC Stadium (C), histologischem Subtyp (D) und Ansprechen auf Chemotherapie (E). Die Ergebnisse für den mittleren prozentualen Anteil an HIF2α- bzw. VEGF-positive Zellen (% HIF2α and VEGF positive cells) sind als Boxplots dargestellt. Die graue breite Linie innerhalb der Boxplots gibt den Mittelwert an, die dünne schwarze Linie den Median. Der kombinierte VEGF-Score nach Saponaro and Schirosi et al. (CombVEGF score) ist als Mittelwert je Gruppe dargestellt (± SEM). # p < 0.050, ## p ≤ 0.01, ### p ≤ 0.001. Modifiziert nach Wagner et al. 2018 und 2019 (13, 32).

HIF2 $\alpha$  war durchgängig in Osteosarkompatienten nachzuweisen. Der durchschnittliche prozentuale Anteil an HIF2 $\alpha$ -positiven Zellen in der immunhistochemischen Analyse (%HIF2 $\alpha$ ) betrug 27,4%  $\pm$  11,1% in allen Patienten vor Chemotherapie. Die Proteinexpression von HIF2 $\alpha$  war in Osteosarkomen erhöht, welche primär am Kiefer lokalisiert waren (Abb. 2.3.4B). In Patienten mit einem UICC-Stadium I zeigte sich ebenfalls eine Erhöhung der HIF2 $\alpha$ -Expression im Vergleich zu Stadium-II-Patienten (Abb. 2.3.4C). Kein Unterschied ergab sich dagegen zwischen T1- und T2-Tumoren.

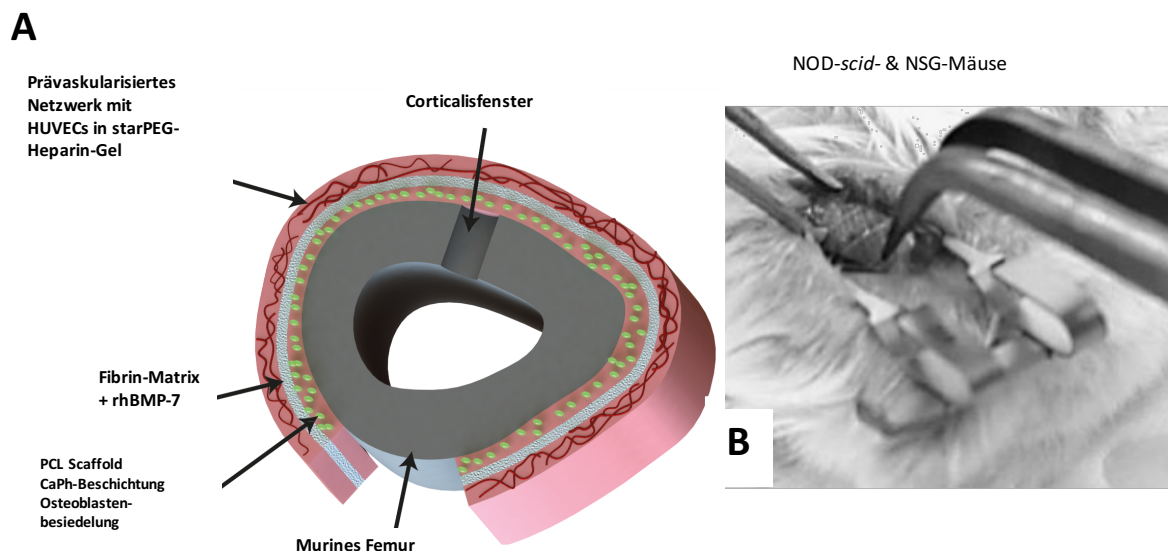
Von anderen Tumoren des Kindesalter ist bekannt, dass eine niedrigere Expression von Tumormarkern mit einer ungünstigeren Prognose einhergeht. Eine niedrigere Expression von  $\alpha$ -feto-protein (AFP) bei Hepatoblastompatienten korreliert zum Teil mit einer schlechteren Prognose (60-62). Dies könnte auch für Osteosarkompatienten im UICC Stadium II – mit typischerweise schlechterem Krankheitsverlauf – der Fall sein. Gleichzeitig kann die Höhe des AFP-Spiegels als Monitoring für die Therapie verwendet werden, da nach Chemotherapie und Resektion dieses Lebertumors typischerweise die AFP-Spiegel im Serum abfallen.

Zwischen den histologischen Subtypen war kein Unterschied in der HIF2 $\alpha$ -Expression zu erkennen (Abb. 2.3.4D). Jedoch war %HIF2 $\alpha$  bei Patienten, welche Chemotherapie erhielten signifikant niedriger als vor Chemotherapie ( $p < 0.001$ ; Abb. 2.3.4E). Dennoch sind weitere Untersuchungen notwendig, um zu klären, in wie weit dieses Ergebnis von klinischem Stellenwert ist.

## **2.4 Arbeitsfeld 4: Ein modulares humanisiertes orthotopes Knochenmodell zur präklinischen Forschung an primären Knochentumoren**

In einem weiteren Schritt wurde ein modulares orthotopes humanisiertes Knochenmodell entwickelt. Mittels Scaffold-basierter Technik wurde *in vitro* aus mehreren variablen Bestandteilen ein Knochenkonstrukt erzeugt, welches am Femur der Maus platziert wurde um im weiteren Verlauf eine *in-vivo*-Differenzierung durchzumachen.

Dabei wurden humane mesenchymalen Progenitorzellen (MPZ) im Rahmen von Knieprothesen-Operationen isoliert und ein 3-dimensionales resorbierbares tubuläres  $\epsilon$ -Policaprolactonsäure-(PCL)-Gerüst (Scaffold) mittels Elektromelt-Spinning generiert. Im Anschluss wurden diese mit Ca-Phosphat beschichtet und mit MPZ besiedelt. Nach 2-wöchiger Proliferationsphase unter Standard-Zellkultivierungsbedingungen erfolgte die osteogene Differenzierung der MPZ in Osteoblasten für weitere 4 Wochen um zusätzlich weitere Knochenmatrixbestandteile zu produzieren (8). Im Anschluss erfolgte die Aufbringung eines präkapillarisierten Gefäßnetzwerkes aus humanen umbilikalen venösen Endothelzellen (HUVEC) innerhalb eines star-PEG-Heparin-Geles (Abb. 8A). Für die Versuche wurden immunsupprimierte non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD-*scid*) und NOD-*scid*-gamma (NSG) Mäuse verwendet. Es erfolgte am rechten Oberschenkel ein seitlicher Längsschnitt entlang des Femurverlaufs. Nach Spaltung des Tractus iliotibialis wurde das Femur von der umgebenden Muskulatur befreit. Mittels einer Kanüle wurde eine Corticalisfenster geschaffen und somit der Knochenmarkraum in Richtung Scaffold eröffnet. Im Anschluss wurden die vorbereiteten Scaffolds um das exponierte Femur platziert (Abb. 2.4.1B). Es folgte die Versiegelung mittels einer Fibrinmatrix (TISSEEL). Das verwendete Fibrin wurde direkt vor Applikation mit 20 $\mu$ g rekombinantem humanem bone morphogenetic Protein-7 (rhBMP-7) vermengt. Im Anschluss erfolgte der schichtweise Wundverschluss.



**Abbildung 2.4.1.** Konstruktion ohTEBCs. Erläuterungen siehe Text und (13).

6 Wochen nach Scaffold-Implantation erfolgte die Euthanasie eines Teiles der Mäuse. Das orthotope Knochenmaterial wurde zur weiteren Analyse in allen untersuchten Mäusen neu gebildeter Knochen am Femur konserviert. Dies konnte zum einen mittels Röntgen, aber auch mit  $\mu$ CT bestätigt werden (Abb. 2.4.2A). Dabei konnte die Neuformierung von Trabekeln und einer äußeren Neokortikalis (Cx) gefunden werden. In der histologischen Analyse mittels H&E-Färbung (Abb. 9B) zeigte sich das Mausfemur (MF) zirkulär von neuem Knochen umschlossen, die Trabekelzwischenräume waren mit Blutmark (BM) und Fettmark (FM) gefüllt. Das bei Implantation geschaffene Kortikalisfenster, welches einen Zellaustausch erlauben soll, konnte ebenfalls dargestellt werden (schwarzer Pfeil).

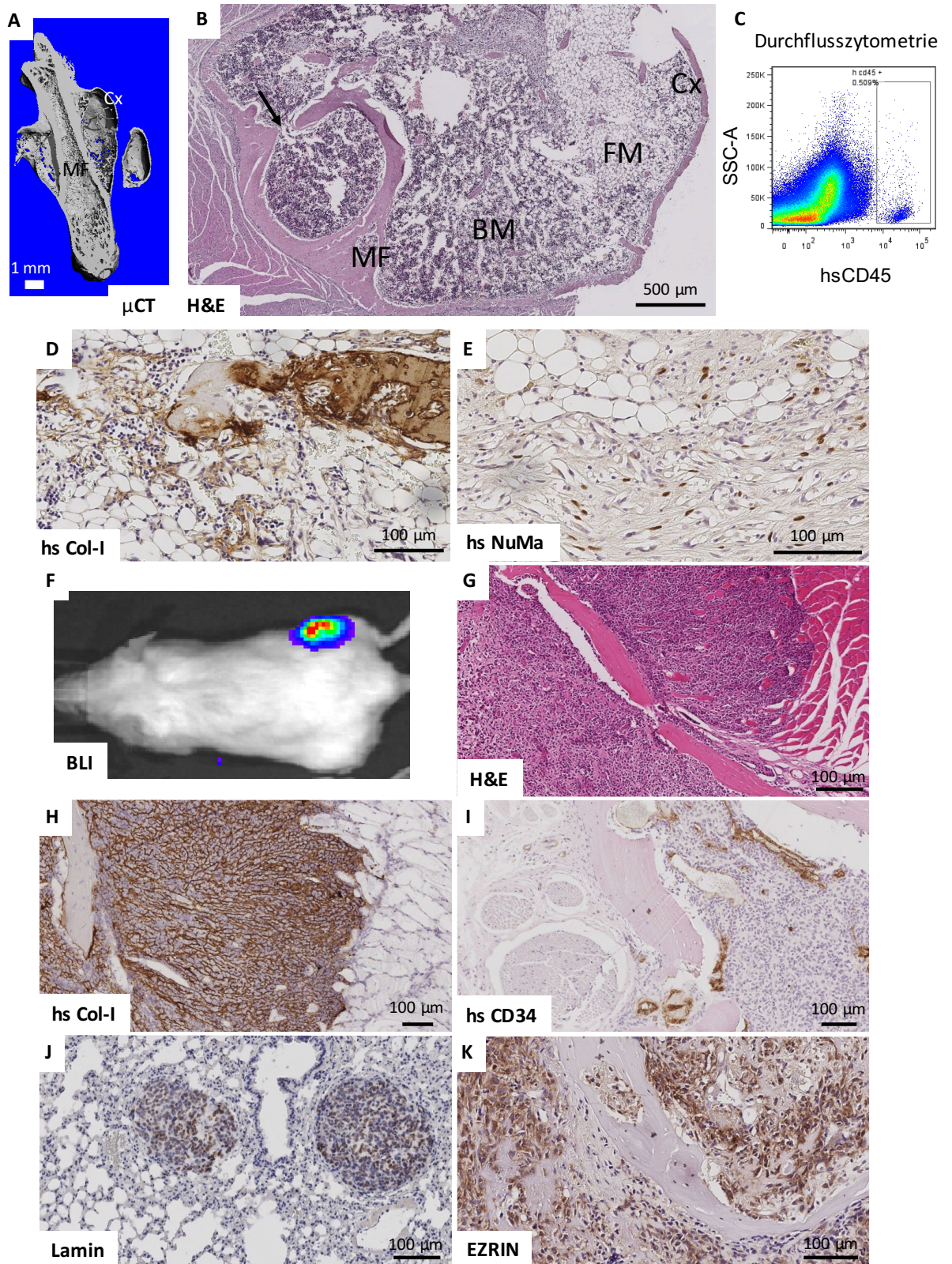
Im Falle der NSG Mäuse erfolgte zunächst die *in-vivo*-Formierung des orthotopen Knochens für 5 Wochen. Um eine zusätzliche Humanisierung des Knochenmarks zu erreichen erfolgte im Anschluss daran eine Knochenmarktransplantation mittels retrobulbärer Injektion von humanen CD34 positiven hämatopoetischen Stammzellen (HSZ, Lonza). 15 Wochen nach Transplantation wurde ein Teil der Mäuse euthanasiert und das geerntete Knochenmark mittels Flow-Zytometrie auf den Grad der Humanisierung untersucht. Immunhistochemische Färbungen für CD34 bestätigten, dass sich im Knochenmarksraum HSZ befinden (Abb. 2.4.2I). In der Durchflusszytometrie konnten auch noch 15 Wochen nach Knochenmarktransplantation humane hämatopoetische CD45 positive Zellen im geernteten Knochenmark nachgewiesen werden (Abb. 2.4.2C und im Detail (33)). Färbungen für humanspezifisches Kollagen Typ I (hsCol-I) und Nuclear mitotic apparatus protein 1 (hsNuMa) bestätigten, dass Teile der neu gebildeten Knochenmatrix und zelluläre

mesenchymale Bestandteile menschlichen Ursprungs waren (Abb. 2.4.2D&E).

Bei einem Teil der Tiere erfolgte nach *in-vivo*-Integration des humanen Knochens und Knochenmarks dagegen die Injektion von  $5 \times 10^5$  Luc-SAOS-2-Zellen direkt in die ohTBECs. 8 Wochen nach orthotoper Luc-SAOS-2-Zellinjektion in NOD-*scid*-Mäusen zeigte sich mittels BLI (Abb. 2.4.2F) eine Etablierung von Tumoren im orthotopen Knochen und in der Lunge in jeweils nur 10,0%. Bei der Verwendung von NSG-Mäusen zeigte sich dagegen bereits 7 Wochen nach Tumorzellinjektion eine Etablierung von orthotopen Osteosarkomen in 100% und Lungenmetastasen in 50% der Fälle. Histomorphologisch zeigten sich alle Aspekte eines Osteosarkoms (Abb. 2.4.2G). Die Tumore bildeten pathognomonisches Tumorosteoid und infiltrierten die Knochenkortikalis sowie die umgebende Muskulatur. Immunhistochemische Färbungen zeigten, dass die Tumorzellen hsCol-I bildeten (Abb. 2.4.2H). Weiterhin zeigten Färbungen für hsCD34, hsCol-4 und GFP, dass die mit dem Scaffold implantierten HUVEC nach 27 Wochen noch immer in den ohTBECs präsent waren und der Tumor diese zur Neoangiogenese zu nutzen scheint (Abb. 2.4.2I und im Detail (33)).

In den Lungen der Tiere zeigten sich ebenfalls Läsionen, welche Osteoid und humanes nukleäres Lamin A/C bildeten (Abb. 2.4.2J). Die proliferierenden Zellen waren somit ebenfalls humanen Ursprungs. Damit konnten diese als klare Metastasen des orthotopen Primärtumors zugeordnet werden. Es erfolgte zusätzlich die Suche nach immunhistochemischen relevanten Markern für das Osteosarkom. Hier konnte GFAP, VEGF und HIF2 $\alpha$  und EZRIN (Abb. 2.4.2K) nachgewiesen werden.

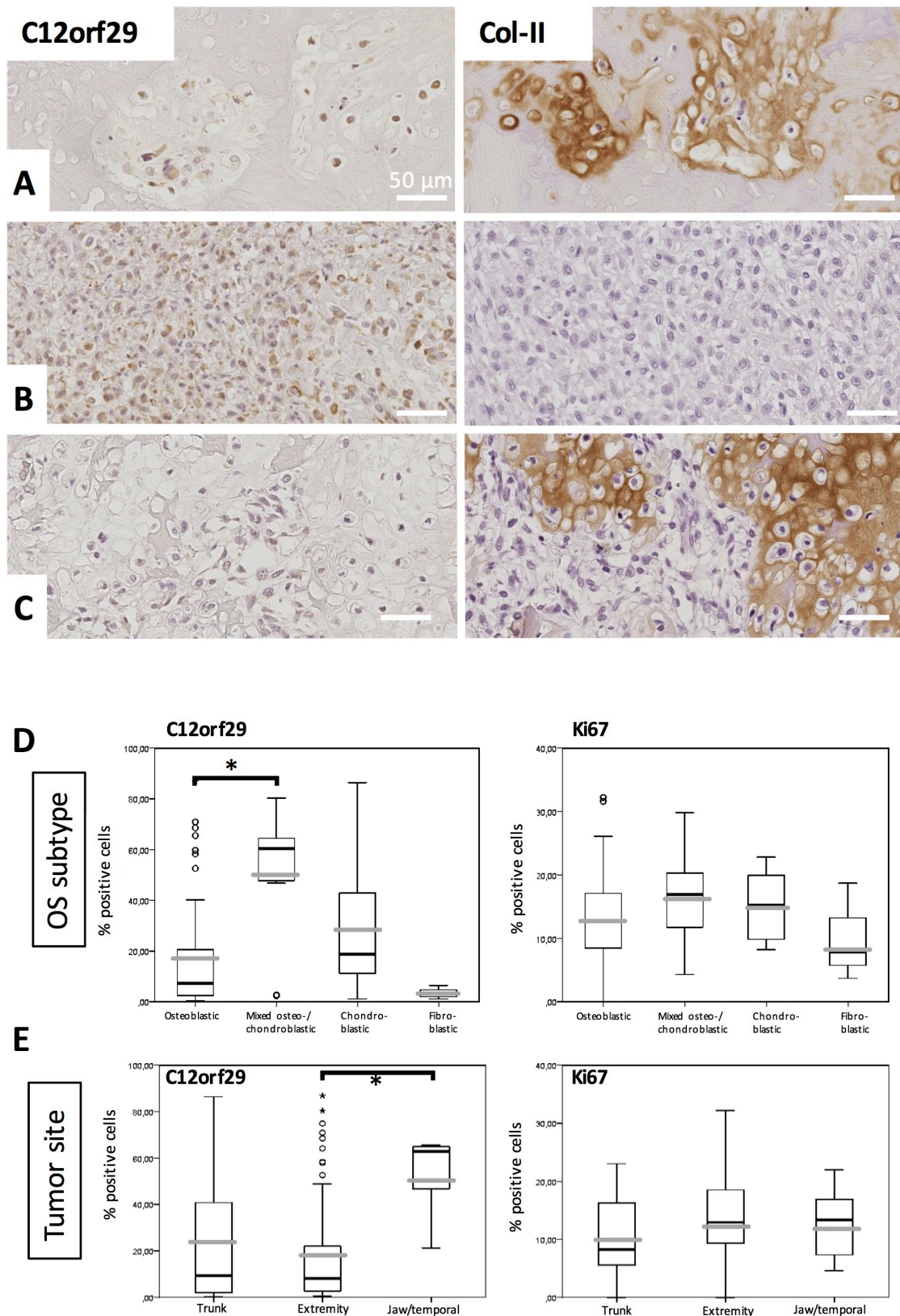




**Abbildung 2.4.2.** Analyse des humanisierten Knochens (A-E) und des humanisierten Osteosarkoms (F-K). Erläuterungen siehe Text. Abbildung modifiziert nach Wagner *et al.* 2018 (13, 33).

Des Weiteren konnte das Gen *C12orf29* erstmals im Osteosarkom nachgewiesen werden. Dieses Gen wurde bisher in verschiedenen Geweben des muskuloskelettalen Systems nachgewiesen und scheint eine Rolle in der Entwicklung des Bewegungsapparates zu spielen (13, 63). In unseren humanisierten Osteosarkomen zeigte sich die Genexpression signifikant höher als in ohTEBCs ohne Tumore und höher als in unveränderten Kontrollfemora der Maus. Daraufhin erfolgte die immunhistochemische Analyse von Osteosarkomproben von 68 Patienten (Abb. 2.4.3). Die initial beschriebene Co-Expression von Kollagen-Typ-II (Col-II) konnte in den untersuchten Osteosarkompatienten nicht gefunden werden. In Abbildung 2.4.3A-C sind links immunhistochemische Färbungen für *C12orf29* dargestellt, rechts sich die korrespondierenden Schnitte mit einem Antikörper für Col-II gefärbt. Während bei einigen Patienten in den korrespondierenden Arealen Col-II gefunden wurde (Abb. 2.4.3A), gab es gleichwohl Tumore welche *C12orf29* exprimierten, jedoch kein Col-II bildeten (Abb. 2.4.3B). Gegensätzliche Färbungsmuster konnten ebenfalls gefunden werden (Abb. 2.4.3C). Dennoch konnte vor allem bei Osteosarkom Patienten mit chondroblastischem und osteoblastischem Subtyp eine regelmäßige Expression von *C12orf29* nachgewiesen werden. Am höchsten war die Expression jedoch in den gemischt osteo-chondroblastischen Osteosarkomen (Abb. 2.4.3D). Diese Subtypen stellen auch die häufigsten Osteosarkomentitäten dar. Außerdem konnte eine vermehrte *C12orf29*-Expression in Tumoren gefunden werden, welche primär im Kopfhalsbereich lokalisiert waren (Abb.10E). Zusätzlich erfolgten Korrelationsanalysen bezüglich einer vermehrten Ki67-Expression (als Maß für eine erhöhte Zellteilung in den Tumoren) in den untersuchten Osteosarkomen. Es konnte hier jedoch keine Korrelation mit einer vermehrten *C12orf29*-Expression gefunden werden (Abb. 2.4.3D&E).





**Abbildung 2.4.3.** Expression von C12orf29, Col-II und Ki67 in Osteosarkompatienten. Erläuterungen siehe Text. Abbildung modifiziert nach Wagner *et al.* 2018 (13, 33).



Somit konnte man in der beschriebenen Studie zeigen, dass durch einen Tissue-engineering-Ansatz eine humanisierte Knochenumgebung an orthotoper Stelle generiert werden kann. Neben der knochentypischen Matrixarchitektur konnte zusätzlich eine Knochenmarknische geschaffen werden. Durch eine Knochenmarktransplantation der NSG-Mäuse konnte diese zusätzlich mit humanen hämatopoetischen Zellen aller Differenzierungslinien besiedelt werden. Von herausragender Bedeutung ist ebenfalls die humanisierte vaskuläre Nische, die wir mit unserem ohTEBC generieren konnten und welche der etablierte Tumor zur Angiogenese zu nutzen scheint. Diese Mikroumgebung zeigt sich ideal als Plattform für ein humanisierten Osteosarkommodell, welches nicht nur pathomorphologische Eigenschaften, sondern durch das Vorhandensein von Lungenmetastasen und die Expression von prognostischen Tumormarkern klinische Relevanz besitzt. Die detaillierten Ergebnisse wurden im April 2018 in der Zeitschrift *Biomaterials* mit dem Titel „*Humanization of bone and bone marrow in an orthotopic site reveals new potential therapeutic targets in osteosarcoma*“ veröffentlicht (33). Die allgemeine Systematik dieses und anderer malignomassoziierter Knochenmodelle wurde 2017 von Martine, Holzapfel, McGovern und Wagner et al. in *Nature Protocols* und im Rahmen eines PhD-Projektes an der Queensland University of Technology veröffentlicht (13, 29).

### 3 Ausblick

Das vorgestellte Projekt hatte sich zum einen das Ziel gesetzt neue humanisierte Plattformen für die Knochentumorforschung im Kindes- und Jugendalters zu schaffen und eine Translation von präklinischen Modellen zu ermöglichen.

Die beide beschriebenen Osteosarkom-Modelle können prinzipiell für breite Aspekte der Osteosarkomforschung genutzt werden. Insbesondere das in Arbeitsfeld 2 und 3 verwendete Modell ist für die simple Medikamententestung anzuwenden. Das zweite Tissue-engineering-Modell ist vor allem durch die mögliche Einbringung von gentechnisch veränderten Tumor-, Knochenmatrix- oder Knochenmarkzellen für die Untersuchung molekularer Mechanismen der Knochenbildung und Osteosarkomentwicklung inklusive Metastasierungskaskaden ideal (13).

Die Anwendung des Modells kann prinzipiell auf die Erforschung sekundärer Knochentumore wie etwa Mamma- und Prostatakarzinometastasen ausgedehnt werden. Zusätzlich könnten andere knochenassoziierte Malignome wie das Plasmozytom untersucht werden. Speziell im Kindesalter wäre die Untersuchung der Leukämie, des Ewing-Sarkoms sowie die Knochenmarkmetastasierung beim Neuroblastom in der neu geschaffenen humanisierten Knochenmarknische als ideale Anwendung zu sehen.

Für ein aktuelles weiterführendes Projekt wurde ein Doxorubicin-beschichtetes PCL-Scaffold entwickelt. Im oben genannten orthotopen Osteosarkommodell wird dabei eine Tumorresektion simuliert und das generierte Scaffold als Defektfüller eingesetzt. Dieses resorbiert sich über mehrere Jahre hinweg. Simultan wirkt Doxorubicin als lokales Chemotherapeutikum. Bisher haben die Analysen eine reduzierte systemische Toxizität von Doxorubin gegenüber systemisch behandelten Kontrolltieren gezeigt. Der Effekt auf eine langfristige Tumorunterdrückung ist derzeit Gegenstand der Analysen.

Bezüglich der beschriebenen Hepatoblastom-Studie werden bereits Patienten nach Lebertransplantation aufgrund nicht-resektabler Tumore mit Rapamycin oder anderen mTOR-Inhibitoren behandelt. Der klinische Verlauf dieser Patienten muss nun beobachtet werden. Zu hoffen ist, dass diese Patienten aufgrund dieser Medikation langfristig tumor- sowie nebenwirkungsfrei bleiben.

## 4 Anhang

### 4.1 *Curriculum vitae*

In der elektronischen Version wurde auf den Lebenslauf verzichtet.

## 4.2 Aktualisiertes Verzeichnis wissenschaftlicher Abhandlungen



KINDERCHIRURGISCHE KLINIK  
UND POLIKLINIK  
IM DR. v. HAUNERSCHEN KINDERSPITAL  
Direktor: Professor Dr. med. D. v. Schweinitz



Klinikum der Universität München · Kinderchirurgische Klinik im Dr. v. Haunerschen Kinderspital ·  
Lindwurmstr. 4 · D-80337 München ·

An Herrn  
Prof. Dr. med. R. Hickel  
Dekanat der medizinischen Fakultät  
Bavariaring 19  
80336 München



Dr. med. Ferdinand Wagner  
Telefon +49 (0)89 4400 7 3930

[www.klinikum.uni-muenchen.de](http://www.klinikum.uni-muenchen.de)

Ihr Zeichen:

Unser Zeichen:

München, den 1. September 2019

### Publikationsliste Ferdinand Wagner

#### 1. Originalarbeiten als Erst- oder Letztautor

##### 1. Rapamycin blocks hepatoblastoma growth in vitro and in vivo implicating new treatment options in high-risk patients.

**Wagner F**, Henningsen B, Lederer C, Eichenmüller M, Gödeke J, Müller-Höcker J, von Schweinitz D, Kappler R

*European Journal of Cancer*. 2012 Oktober; 48(15):2442-50. IF: 5.42

##### 2. A Validated Preclinical Animal Model for Primary Bone Tumor Research.

**Wagner F**, Holzapfel BM, Thibaudeau L, Straub M, Ling M, Grifka J, Loessner D, Lévesque JP, Huttmacher DW

*Journal of Bone and Joint Surgery (Am)*. 2016 Juni; 98(11):916-25. IF: 4.840

##### 3. A humanized bone microenvironment uncovers HIF2 alpha as a latent marker for osteosarcoma.

**Wagner F**, Holzapfel BM, Martine L, McGovern J, Lahr CA, Boxberg M, Proding PM, Grässel S, Loessner D, Huttmacher DW.

*Acta Biomaterialia*. 2019 Apr 15;89:372-381.. IF: 6.319

#### **4. Humanization of bone and bone marrow in an orthotopic site reveals new potential therapeutic targets in osteosarcoma**

**Wagner F**, Holzapfel BM, McGovern JA, Shafiee A, Baldwin JG, Martine LC, Lahr CA, Wunner FM, Friis T, Bas O, Boxberger M, Prodinge PM, Shokoohmand A, Moi D, Mazzieri R, Loessner D, Hutmacher DW

*Biomaterials*. 2018 April; 171:230-246. IF: 10.273

## **2. Originalarbeiten als Co-Autor zu den Arbeitsfeldern**

### **1. Engineering a humanized bone organ model in mice to study bone metastases.**

Martine LC, Holzapfel BM, McGovern JA, **Wagner F**, Quent VM, Hesami P, Wunner FM, Vaquette C, De-Juan-Pardo EM, Brown TD, Nowlan B, Wu DJ, Hutmacher CO, Moi D, Oussenko T, Piccinini E, Zandstra PW, Mazzieri R, Lévesque JP, Dalton PD, Taubenberger AV, Hutmacher DW

*Nature Protocols*. 2017 April; 12(4):639-663. IF: 12.423

### **2. Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 7 Exerts Osteo-Catabolic Effects on Bone Grafts That Outweigh Its Osteo-Anabolic Capacity.**

Lahr CA, **Wagner F**, Shafiee A, Rudert M, Hutmacher DW, Holzapfel BM.

*Calcif Tissue Int*. 2019 Sep;105(3):331-340. doi: 10.1007/s00223-019-00574-5. Epub 2019 Jun 18. IF: 3.265

### **3. Tissue engineering and regenerative medicine in musculoskeletal oncology.**

Holzapfel BM, **Wagner F**, Martine LC, Reppenhagen S, Rudert M, Schuetz M, Denham J, Schantz JT, Hutmacher DW.

*Cancer and metastasis reviews*. 2016 September; 35(3):475-87. IF: 7.79

### **4. Immune System Augmentation via Humanization Using Stem/Progenitor Cells and Bioengineering in a Breast Cancer Model Study**

Shafiee A, McGovern JA, Lahr CA, Meinert C, Moi D, **Wagner F**, Landgraf M, De-Juan-Pardo E, Mazzieri R, Hutmacher DW.

*International Journal of Cancer*. 2018 April; DOI 10.1002/ijc.31528. IF: 6.51

**5. Humanization of the Prostate Microenvironment Reduces Homing of PC3 Prostate Cancer Cells to Human Tissue-Engineered Bone.**

McGovern JA, Shafiee A, **Wagner F**, Lahr CA, Landgraf M, Meinert C, Williams ED, Russell PJ, Clements JA, Loessner D, Holzapfel BM, Risbridger GP, Huttmacher DW.

*Cancers*. 2018 Nov 13;10(11). IF: 5.326

**6. A 3D tumor microenvironment regulates cell proliferation, peritoneal growth and expression patterns.**

Loessner D, Rockstroh A, Shokoohmand A, Holzapfel BM, **Wagner F**, Baldwin J, Boxberg M, Schmalfeldt B, Lengyel E, Clements JA, Huttmacher DW.

*Biomaterials*. 2019 Jan;190-191:63-75. IF: 10.273

**7. Lycopene reduces ovarian tumor growth and intraperitoneal metastatic load.**

Holzapfel NP, Shokoohmand A, **Wagner F**, Landgraf M, Champ S, Holzapfel BM, Clements JA, Huttmacher DW, Lössner D.

*American Journal of Cancer Research*. 2017 Juni; 7(6):1322-1336. IF: 3.26

**8. Periosteum tissue engineering in an orthotopic in vivo platform.**

Baldwin JG, **Wagner F**, Martine LC, Holzapfel BM, Theodoropoulos C, Bas O, Savi FM, Werner C, De-Juan-Pardo EM, Huttmacher DW.

*Biomaterials*. 2017 März. 121:193-204. IF: 10.273

**9. Species-specific homing mechanisms of human prostate cancer metastasis in tissue engineered bone.**

Holzapfel BM, **Wagner F**, Loessner D, Holzapfel NP, Thibaudeau L, Crawford R, Ling MT, Clements JA, Russell PJ, Huttmacher DW.

*Biomaterials*. 2014 April; 35(13):4108-15. IF: 10.273

### 3. Weitere Originalarbeiten mit Erst- und Seniorautorschaften des Bewerbers

**1. A knee size independent parameter for malalignment of the distal patellofemoral joint in children**

**Wagner F**, Maderbacher G, Matussek J, Holzapfel BM, Kammer B, Hubertus J, Anders S, Winkler S, Grifka J, Keshmiri A.

*Advances in Orthopedics, Volume 2019, Akzeptiert zur Publikation am 12ten August 2019, Article ID 3496936. IF: 0.800*

**2. Patients under 4 years old treated with overhead extension for isolated femoral fractures - lessons learned concerning parents' satisfaction.**

**Wagner F**, Schütz V, Hubertus J.

Klinischen Pädiatrie. 2019 May 9. doi: 10.1055/a-0892-4365. [Epub ahead of print], IF: 0.698

**3. [Disease-specific Knowledge in Conservative Treatment of Adolescent Idiopathic Scoliosis] Krankheitsspezifisches Wissen in der konservativen Therapie der idiopathischen Adoleszentskoliose**

**Wagner F**, Brendel J, Dingeldey E, Winkler S, Grifka J, Matussek J

*Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie; 2018 Januar; DOI 10.1055/s-0043-125091, IF: 0.572*

**4. The impact of hypoxia on mesenchymal progenitor cells of human skeletal tissue in the pathogenesis of heterotopic ossification.**

Winkler S, Niedermair T, Füchtmeier B, Grifka J, Grässel S, Anders S, Heers G, **Wagner F**.

*International Orthopaedics. 2015 Dezember; 39(12):2495-501. IF: 2.39*

### 4. Weitere Co-Autorschaften in Original- und Übersichtsarbeiten des Bewerbers

**1. Concise review: humanized models of tumor immunology in the 21st century: convergence of cancer research and tissue engineering.**

Holzapfel BM, **Wagner F**, Thibaudeau L, Levesque JP, Huttmacher DW.

*Stem Cells. 2015 Juni; 33(6):1696-704. IF: 6.52 (Übersichtsarbeit)*

**2. CME: [Flexible flatfoot in children: Variation within normal range or need for treatment?]**

Der kindliche Knick-Senk-Fuß.

Wagner F, Hofbauer R, Matussek J.

*Der Orthopäde*. 2013 Juni; 42(6):455-68. IF: 0.632 (Übersichtsarbeit)

**3. Mycophenolate mofetil inhibits tumor growth and angiogenesis in vitro but has variable antitumor effects in vivo, possibly related to bioavailability.**

Koehl GE, Wagner F, Stoeltzing O, Lang SA, Steinbauer M, Schlitt HJ, Geissler EK.

*Transplantation*. 2007 März; 15;83(5):607-14. IF: 3.83

**4. Prolonged storage of osteochondral allografts: does the addition of fetal bovine serum improve chondrocyte viability?**

Pennock AT, Wagner F, Robertson CM, Harwood FL, Bugbee WD, Amiel D.

*Journal of Knee Surgery*. 2006 Oktober; 19(4):265-72. IF: 1.44

**5. Does subchondral bone affect the fate of osteochondral allografts during storage?**

Pennock AT, Robertson CM, Wagner F, Harwood FL, Bugbee WD, Amiel D.

*American Journal of Sports Medicine*. 2006 April; 34(4):586-91. IF: 6.057

**6. Presence of rotational errors in long leg radiographs after total knee arthroplasty and impact on measured lower limb and component alignment.**

Maderbacher G, Baier C, Benditz A, Wagner F, Greimel F, Grifka J, Keshmiri A.

*International Orthopaedics* 2017 Januar; DOI:10.1007/s00264-017-3408-3. IF: 2.39

**7. Perioperative blood loss and gastrointestinal tolerability of etoricoxib and diclofenac in total hip arthroplasty (ETO-DIC study): a single-center, prospective double-blinded randomized controlled trial.**

Winkler SH, Barta S, Kehl V, Schröter C, Wagner F, Grifka J, Springorum HR, Craiovan B.

*Current Medical Research and Opinion*. 2015 November; 19:1-11. IF: 2.65



**8. Current therapeutic strategies of heterotopic ossification - a survey amongst orthopaedic and trauma departments in Germany.**

Winkler S, Wagner F, Weber M, Matussek J, Craiovan B, Heers G, Springorum HR, Grifka J, Renkawitz T.

*BMC Musculoskeletal Disorders*. 2015 Oktober; 16:313. IF: 1.72

**9. Pathogenesis and prevention strategies of heterotopic ossification in total hip arthroplasty: a narrative literature review and results of a survey in Germany.**

Winkler S, Craiovan B, Wagner F, Weber M, Grifka J, Renkawitz T.

*Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*. 2015 April; 135(4):481-9. IF: 1.60

**10. CME: [Conservative Treatment of idiopathic scoliosis with effective braces: Early response to trunk asymmetry may avoid curvature progress.]  
Konservative Therapie der idiopathischen Skoliose mit dem Korsett.**

Matussek J, Dingeldey E, Wagner F, Rezai G, Nahr K.

*Der Orthopäde*. 2014 Juli; 43(7):689-700. IF: 0.632 (Übersichtsarbeit)

**11. An 18-Month old patient with pronounced Blount-Barber Syndrome**

Keshmiri A, Matussek J, Wagner F, Springorum H-R

*Osteologie/Osteology*. 2013 Januar; 22(2):140-142. IF: 0.42 (Übersichtsarbeit)

03. September 2019:

---

Ferdinand Wagner

### **4.3 *Bisher abgehaltene Lehrveranstaltungen***

In der elektronischen Version wurde auf dieses Dokument verzichtet.

#### ***4.4 Versicherung an Eides Statt über die selbständige Verfassung der Habitationsleistung***

In der elektronischen Version wurde auf dieses Dokument verzichtet.

***4.5 Versicherung an Eides Statt, dass bisher keine Ablehnung eines Habilitationsverfahren erfolgt ist.***

In der elektronischen Version wurde auf dieses Dokument verzichtet.

## **4.6 *Vorschläge für mögliche Gutachter***

In der elektronischen Version wurde auf dieses Dokument verzichtet.

## 4.7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt dem Ordinarius für Kinderchirurgischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Herrn Prof. Dr. med. Dietrich von Schweinitz, für die kontinuierliche Unterstützung und Fürsorge als Fachmentor im Rahmen dieses Projektes. Die positiven Eindrücke, die ich im Rahmen meiner Tätigkeit am Dr. von Haunerschen Kinderspital sammeln durfte haben mich nicht nur für mein berufliches, sondern auch für mein privates Leben geprägt. Außerdem danke ich Prof. Irene Schmid und Prof. Roland Kappler für die kontinuierliche Unterstützung im Rahmen des Fachmentorats und der täglichen Arbeit. Ich habe viel gelernt.

Herrn Prof. Dietmar Hutmacher danke ich außerordentlich für die Supervision meines DFG-Research-Fellowships und PhD-Projektes am Institute of Health and Biomedical Engineering, der Queensland University Technology. Prof. Hutmacher ist mir über die Jahre auch ein guter Freund geworden.

Außerordentlich Danke ich auch meinem sehr guten Freund Prof. Boris Holzapfel der Universität Würzburg und seiner Ehefrau Nina. Gemeinsam haben wir einige Projekte in Deutschland sowie in Australien erdacht und mit der Unterstützung Prof. Hutmachers und seinem logistischen Background in die Tat umgesetzt.

Vielen Kollegen/-innen des Dr. von Haunerschen Kinderspitals -der Kinderchirurgie sowie der Pädiatrie- und insbesondere Dr. Florian Bergmann, Dr. Claudia Menzel, PD Dr. Jochen Hubertus, PD Dr. Martina Heinrich, Dr. Beate Häberle und Dr. Markus Lehner, bin ich zu großem Dank verpflichtet: Sie haben sich stets als herausragende Lehrer erwiesen und haben bewiesen, dass auch ein Orthopäde die Denkweise eines Kinderchirurgen bezüglich umfassender Therapie und Versorgung eines Kindes übernehmen und anwenden kann.

Von Herzen danke ich meiner Familie und meiner Lebensgefährtin Marion für ihre jahrelange Geduld, Hilfe und Unterstützung.

03. September 2019:

\_\_\_\_\_  
Ferdinand Wagner

## 5 Literaturverzeichnis

1. Bundesamt S. Statistisches Bundesamt. [http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/WS0100/XWD\\_PROC?XWD\\_2/10/XWD\\_CUBEDRILL/XWD\\_30/D100/10101](http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/WS0100/XWD_PROC?XWD_2/10/XWD_CUBEDRILL/XWD_30/D100/10101). 2015.
2. von Schweinitz D. Management of liver tumors in childhood. *Semin Pediatr Surg*. 2006;15(1):17-24.
3. Perilongo G, Maibach R, Shafford E, Brugieres L, Brock P, Morland B, et al. Cisplatin versus cisplatin plus doxorubicin for standard-risk hepatoblastoma. *The New England journal of medicine*. 2009;361(17):1662-70.
4. Aronson DC, Meyers RL. Malignant tumors of the liver in children. *Semin Pediatr Surg*. 2016;25(5):265-75.
5. Zsiros J, Brugieres L, Brock P, Roebuck D, Maibach R, Zimmermann A, et al. Dose-dense cisplatin-based chemotherapy and surgery for children with high-risk hepatoblastoma (SIOPEL-4): a prospective, single-arm, feasibility study. *Lancet Oncol*. 2013;14(9):834-42.
6. Kempf-Bielack B, Bielack SS, Jurgens H, Branscheid D, Berdel WE, Exner GU, et al. Osteosarcoma relapse after combined modality therapy: an analysis of unselected patients in the Cooperative Osteosarcoma Study Group (COSS). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(3):559-68.
7. Allison DC, Carney SC, Ahlmann ER, Hendifar A, Chawla S, Fedenko A, et al. A meta-analysis of osteosarcoma outcomes in the modern medical era. *Sarcoma*. 2012;2012:704872.
8. Hillmann A, Gosheger G, Hoffmann C, Ozaki T, Winkelmann W. Rotationplasty--surgical treatment modality after failed limb salvage procedure. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2000;120(10):555-8.
9. Hillmann A, Hoffmann C, Gosheger G, Krakau H, Winkelmann W. Malignant tumor of the distal part of the femur or the proximal part of the tibia: endoprosthesis replacement or rotationplasty. Functional outcome and quality-of-life measurements. *J Bone Joint Surg Am*. 1999;81(4):462-8.
10. Holzapfel BM, Pilge H, Prodinger PM, Toepfer A, Mayer-Wagner S, Huttmacher DW, et al. Customised osteotomy guides and endoprosthesis reconstruction for periacetabular tumours. *International orthopaedics*. 2014;38(7):1435-42.
11. Holzapfel BM, Rechl H, Lehner S, Pilge H, Gollwitzer H, Steinhäuser E. Alloplastic reconstruction of the extensor mechanism after resection of tibial sarcoma. *Sarcoma*. 2011;2011:545104.
12. Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Cancer*. 2009;115(7):1531-43.
13. Wagner F. Convergence of bioengineering, orthopaedics and tumour biology to develop and validate humanized rodent models for primary bone tumour research. *QUT ePrints*. 2018.
14. Marina NM, Smeland S, Bielack SS, Bernstein M, Jovic G, Krailo MD, et al. Comparison of MAPIE versus MAP in patients with a poor response to preoperative chemotherapy for newly diagnosed high-grade osteosarcoma (EURAMOS-1): an open-label, international, randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(10):1396-408.

15. Kager L, Whelan J, Dirksen U, Hassan B, Anninga J, Bennister L, et al. The ENCCA-WP7/EuroSarc/EEC/PROVABES/EURAMOS 3rd European Bone Sarcoma Networking Meeting/Joint Workshop of EU Bone Sarcoma Translational Research Networks; Vienna, Austria, September 24-25, 2015. Workshop Report. *Clin Sarcoma Res.* 2016;6:3.
16. Bielack SS, Smeland S, Whelan JS, Marina N, Jovic G, Hook JM, et al. Methotrexate, Doxorubicin, and Cisplatin (MAP) Plus Maintenance Pegylated Interferon Alfa-2b Versus MAP Alone in Patients With Resectable High-Grade Osteosarcoma and Good Histologic Response to Preoperative MAP: First Results of the EURAMOS-1 Good Response Randomized Controlled Trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2015;33(20):2279-87.
17. Whelan JS, Bielack SS, Marina N, Smeland S, Jovic G, Hook JM, et al. EURAMOS-1, an international randomised study for osteosarcoma: results from pre-randomisation treatment. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO.* 2015;26(2):407-14.
18. Horvath P, Aulner N, Bickle M, Davies AM, Nery ED, Ebner D, et al. Screening out irrelevant cell-based models of disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15(11):751-69.
19. Perrin S. Preclinical research: Make mouse studies work. *Nature.* 2014;507(7493):423-5.
20. Hackam DG, Redelmeier DA. Translation of research evidence from animals to humans. *JAMA.* 2006;296(14):1731-2.
21. Contopoulos-Ioannidis DG, Ntzani E, Ioannidis JP. Translation of highly promising basic science research into clinical applications. *Am J Med.* 2003;114(6):477-84.
22. Pound P, Bracken MB. Is animal research sufficiently evidence based to be a cornerstone of biomedical research? *BMJ.* 2014;348:g3387.
23. Rongvaux A, Takizawa H, Strowig T, Willinger T, Eynon EE, Flavell RA, et al. Human hemato-lymphoid system mice: current use and future potential for medicine. *Annual review of immunology.* 2013;31:635-74.
24. Ito R, Takahashi T, Katano I, Ito M. Current advances in humanized mouse models. *Cell Mol Immunol.* 2012;9(3):208-14.
25. McGreevy C, Williams D. Safety of drugs used in the treatment of osteoporosis. *Ther Adv Drug Saf.* 2011;2(4):159-72.
26. Kostenuik PJ, Nguyen HQ, McCabe J, Warmington KS, Kurahara C, Sun N, et al. Denosumab, a fully human monoclonal antibody to RANKL, inhibits bone resorption and increases BMD in knock-in mice that express chimeric (murine/human) RANKL. *J Bone Miner Res.* 2009;24(2):182-95.
27. Holzapfel BM, Wagner F, Loessner D, Holzapfel NP, Thibaudeau L, Crawford R, et al. Species-specific homing mechanisms of human prostate cancer metastasis in tissue engineered bone. *Biomaterials.* 2014;35(13):4108-15.
28. Holzapfel BM, Wagner F, Thibaudeau L, Levesque JP, Huttmacher DW. Concise review: humanized models of tumor immunology in the 21st century: convergence of cancer research and tissue engineering. *Stem Cells.* 2015;33(6):1696-704.
29. Martine LC, Holzapfel BM, McGovern JA, Wagner F, Quent VM, Hesami P, et al. Engineering a humanized bone organ model in mice to study bone metastases. *Nat Protoc.* 2017;12(4):639-63.



30. Wagner F, Holzapfel BM, Thibaudeau L, Straub M, Ling MT, Grifka J, et al. A Validated Preclinical Animal Model for Primary Bone Tumor Research. *J Bone Joint Surg Am.* 2016;98(11):916-25.
31. Wagner F, Henningsen B, Lederer C, Eichenmuller M, Godeke J, Muller-Hocker J, et al. Rapamycin blocks hepatoblastoma growth in vitro and in vivo implicating new treatment options in high-risk patients. *European journal of cancer.* 2012;48(15):2442-50.
32. Wagner F, Holzapfel BM, Martine LC, McGovern J, Lahr CA, Boxberg M, et al. A humanized bone microenvironment uncovers HIF2 alpha as a latent marker for osteosarcoma. *Acta Biomater.* 2019;89:372-81.
33. Wagner F, Holzapfel BM, McGovern JA, Shafiee A, Baldwin JG, Martine LC, et al. Humanization of bone and bone marrow in an orthotopic site reveals new potential therapeutic targets in osteosarcoma. *Biomaterials.* 2018;171:230-46.
34. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell.* 2006;124(3):471-84.
35. Schnitzbauer AA, Zuelke C, Graeb C, Rochon J, Bilbao I, Burra P, et al. A prospective randomised, open-labeled, trial comparing sirolimus-containing versus mTOR-inhibitor-free immunosuppression in patients undergoing liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *BMC cancer.* 2010;10:190.
36. Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, et al. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med.* 2002;8(2):128-35.
37. Heinzl. Everolimus in Deutschland für Nierenzellkarzinom zugelassen. *Deutsches Ärzteblatt.* 2009.
38. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, et al. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet.* 2008;372(9637):449-56.
39. Bissler JJ, McCormack FX, Young LR, Elwing JM, Chuck G, Leonard JM, et al. Sirolimus for angiomyolipoma in tuberous sclerosis complex or lymphangioleiomyomatosis. *The New England journal of medicine.* 2008;358(2):140-51.
40. Hammill AM, Wentzel M, Gupta A, Nelson S, Lucky A, Elluru R, et al. Sirolimus for the treatment of complicated vascular anomalies in children. *Pediatric blood & cancer.* 2011.
41. Roebuck DJ, Aronson D, Clapuyt P, Czauderna P, de Ville de Goyet J, Gauthier F, et al. 2005 PRETEXT: a revised staging system for primary malignant liver tumours of childhood developed by the SIOPEL group. *Pediatr Radiol.* 2007;37(2):123-32; quiz 249-50.
42. Ortiz D, Harden A, Corrales-Medina FF, Saigal G, Tekin A, Garcia J. Pediatric patient with end-stage kidney disease secondary to Eagle-Barrett syndrome and metastatic unresectable hepatoblastoma treated successfully with chemotherapy and liver-kidney transplant. *Pediatr Transplant.* 2018;22(2).
43. Morgenstern DA, Marzouki M, Bartels U, Irwin MS, Sholler GL, Gammon J, et al. Phase I study of vinblastine and sirolimus in pediatric patients with recurrent or refractory solid tumors. *Pediatric blood & cancer.* 2014;61(1):128-33.
44. Garnier A, Ilmer M, Kappler R, Berger M. Therapeutic Innovations for Targeting Hepatoblastoma. *Anticancer research.* 2016;36(11):5577-92.

45. Thibaudeau L, Taubenberger AV, Holzapfel BM, Quent VM, Fuehrmann T, Hesami P, et al. A tissue-engineered humanized xenograft model of human breast cancer metastasis to bone. *Disease models & mechanisms*. 2014;7(2):299-309.
46. Thibaudeau L, Taubenberger AV, Theodoropoulos C, Holzapfel BM, Ramuz O, Straub M, et al. New mechanistic insights of integrin beta1 in breast cancer bone colonization. *Oncotarget*. 2015;6(1):332-44.
47. Kahn D, Weiner GJ, Ben-Haim S, Ponto LL, Madsen MT, Bushnell DL, et al. Positron emission tomographic measurement of bone marrow blood flow to the pelvis and lumbar vertebrae in young normal adults. *Blood*. 1994;83(4):958-63.
48. Holzapfel BM, Hutmacher DW, Nowlan B, Barbier V, Thibaudeau L, Theodoropoulos C, et al. Tissue engineered humanized bone supports human hematopoiesis in vivo. *Biomaterials*. 2015;61:103-14.
49. Boerckel JD, Kolambkar YM, Dupont KM, Uhrig BA, Phelps EA, Stevens HY, et al. Effects of protein dose and delivery system on BMP-mediated bone regeneration. *Biomaterials*. 2011;32(22):5241-51.
50. Grassinger J, Simon M, Mueller G, Drewel D, Andreesen R, Hennemann B. Bone morphogenetic protein (BMP)-7 but not BMP-2 and BMP-4 improves maintenance of primitive peripheral blood-derived hematopoietic progenitor cells (HPC) cultured in serum-free medium supplemented with early acting cytokines. *Cytokine*. 2007;40(3):165-71.
51. Su YH, Cai HB, Ye ZY, Tan WS. BMP-7 improved proliferation and hematopoietic reconstitution potential of ex vivo expanded cord blood-derived CD34 cells. *Human cell*. 2014.
52. Baptista AM, Camargo AF, Filippi RZ, Oliveira CR, Azevedo RSN, Camargo OP. Correlation between the expression of vegf and survival in osteosarcoma. *Acta ortopedica brasileira*. 2014;22(5):250-5.
53. Ek ET, Ojaimi J, Kitagawa Y, Choong PF. Does the degree of intratumoural microvessel density and VEGF expression have prognostic significance in osteosarcoma? *Oncology reports*. 2006;16(1):17-23.
54. Hu F, Wang W, Zhou HC, Shang XF. High expression of periostin is dramatically associated with metastatic potential and poor prognosis of patients with osteosarcoma. *World journal of surgical oncology*. 2014;12(1):287.
55. Lu X, Kang Y. Hypoxia and hypoxia-inducible factors: master regulators of metastasis. *Clin Cancer Res*. 2010;16(24):5928-35.
56. Li Z, Bao S, Wu Q, Wang H, Eyler C, Sathornsumetee S, et al. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell*. 2009;15(6):501-13.
57. Staab A, Loeffler J, Said HM, Diehlmann D, Katzer A, Beyer M, et al. Effects of HIF-1 inhibition by chetomin on hypoxia-related transcription and radiosensitivity in HT 1080 human fibrosarcoma cells. *BMC Cancer*. 2007;7:213.
58. Kubo T, Sugita T, Shimose S, Matsuo T, Arihiro K, Ochi M. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and its relationship to tumour angiogenesis and cell proliferation in cartilage tumours. *J Bone Joint Surg Br*. 2008;90(3):364-70.
59. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1999;237:1-30.
60. Haberle B, Bode U, von Schweinitz D. [Differentiated treatment protocols for high- and standard-risk hepatoblastoma--an interim report of the German Liver Tumor Study HB99]. *Klinische Padiatrie*. 2003;215(3):159-65.

61. Meyers RL, Maibach R, Hiyama E, Haberle B, Krailo M, Rangaswami A, et al. Risk-stratified staging in paediatric hepatoblastoma: a unified analysis from the Children's Hepatic tumors International Collaboration. *Lancet Oncol.* 2017;18(1):122-31.
62. Meyers RL, Tiao G, de Ville de Goyet J, Superina R, Aronson DC. Hepatoblastoma state of the art: pre-treatment extent of disease, surgical resection guidelines and the role of liver transplantation. *Curr Opin Pediatr.* 2014;26(1):29-36.
63. Friis TE, Stephenson S, Xiao Y, Whitehead J, Hutmacher DW. A polymerase chain reaction-based method for isolating clones from a complimentary DNA library in sheep. *Tissue Eng Part C Methods.* 2014;20(10):780-9.