

Birgit Lohberger¹, Beate Rinner², Bernadette Liegl-Atzwanger³, Andreas Leithner¹

Sarkommodelle

Von der Grundlagenforschung zum Patienten

Sarcoma models

From bench to bedside

Zusammenfassung: Im Bereich der Weichteilsarkome gelangen in den letzten Jahren trotz der Einführung der „targeted therapy“ kein entscheidender Durchbruch in der medikamentösen Therapie und keine wesentlichen Verbesserungen der Überlebensraten. Grund dafür sind die hohe Heterogenität dieses Tumortyps, ein begrenztes Wissen über die molekularen Faktoren der Tumorentwicklung und -progression und eine niedrige Inzidenz der einzelnen Sarkom-Subtypen, welche die Durchführung klinischer Studien zu einer Herausforderung macht. Für die Entwicklung neuer zielgerichteter Therapeutika ist eine intensive Beforschung der Tumorbiologie mittels präklinischer Studien unabdingbar.

Neben der herkömmlichen 2D-Zellkultur hat sich in den letzten Jahren die moderne Zellkultur immer stärker in Richtung dreidimensionaler Modelle entwickelt, welche dem physiologischen Ist-Zustand am besten entspricht. Durch die 3D-Kultivierung werden die Architektur des Spendergewebes imitiert und sowohl Zell-Zell- als auch Zell-Matrix-Wechselwirkungen ermöglicht. Neben 3D-Kulturen mit verschiedenen Trägermaterialien können auch sogenannte Sphäroidkulturen gezüchtet und organotypische Schnittkulturen oder patientenspezifische Tumororganoiden für unterschiedliche Fragestellungen verwendet werden. Obwohl grundsätzlich die 3-R-Regel (reduce, refine, replace) gelten sollte, kann in der biomedizinischen Grundlagenforschung nicht vollständig auf tierexperimentelle Studien verzichtet werden. Ein unkomplizierter, pflegeleichter und preisgünstiger Modellorganismus ist die Larve des Zebrafisches. Zudem ermöglicht das klassische In-vivo-Mausmodell die Erforschung histologischer, genetischer und epigenetischer Merkmale.

Schlüsselwörter: Sarkom, Therapieresistenz, Zellkultur, 3D-Sphäroidkulturen, Xenograft-Modelle

Zitierweise

Lohberger B, Rinner B, Liegl-Atzwanger B, Leithner A: Sarkommodelle. Von der Grundlagenforschung zum Patienten.

OUP 2018; 7: 068–072 DOI 10.3238/oup.2018.0068–0072

Summary: Despite the recent introduction of “targeted therapy” in the field of soft tissue sarcomas, no decisive breakthrough has been achieved in terms of pharmaceutical therapy or survival chances. The reason for this are the high heterogeneity of this tumor type, limited knowledge of the molecular factors causing tumor development and progression and a low incidence of the various sarcoma subtypes, which makes clinical studies challenging.

In order to develop new targeted therapies, intensive research on tumor biology using pre-clinical studies is essential. Aside from conventional 2D cell culture, in recent years modern cell culture has increasingly moved towards three-dimensional models, which offer a better representation of physiological conditions. In 3D cell culture, the architecture of the donor tissue can be imitated and cell-to-cell as well as cell-to-matrix interactions are possible. Aside from 3D cultures using various scaffold materials, so-called spheroid cultures can also be performed, as well as organotypic section cultures or patient specific tumor organoids, depending on the research question. Although generally the 3R rule (reduce, refine, replace) should be followed, fundamental biomedical research cannot completely abstain from animal experimentation. The zebra fish larva is an uncomplicated, low maintenance and economical model organism. Furthermore, the classic in vivo mouse model allows research into histological, genetic and epigenetic characteristics.

Keywords: sarcoma, therapy resistance, cell culture, 3D spheroid cultures, xenograft models

Citation

Lohberger B, Rinner B, Liegl-Atzwanger B, Leithner A: Sarcoma models. From bench to bedside.

OUP 2018; 7: 068–072 DOI 10.3238/oup.2018.0068–0072

¹ Universitätsklinik für Orthopädie und Traumatologie, Medizinische Universität Graz, Österreich

² Biomedizinische Forschung, Core Facility Alternative Biomodels und Preclinical Imaging, Medizinische Universität Graz, Österreich

³ Institut für Pathologie, Medizinische Universität Graz, Österreich

Einleitung

Im Gegensatz zu den häufigeren Tumorarten wie Brustkrebs, malignem Melanom oder Lungenkrebs gibt es im Bereich der eher seltenen, primär malignen Knochen- und Weichteiltumore nur geringe Verbesserungen in der medikamentösen Therapie und zumeist keine wesentlichen Verbesserungen der Überlebensraten [24]. Die 5-Jahres-Überlebensraten von PatientInnen mit Osteosarkomen haben seit den 1980er

se einer internationalen, open-label, randomisierten, multizentrischen Phase-III-Studie zeigten überraschend eine Überlegenheit der bisherigen Standard-Chemotherapie im Vergleich zu einer innovativeren „Histiotyp-spezifischen“ Therapie [10]. Auch wenn diese Studie in mehrfacher Hinsicht kritisiert wird, zeigt sich doch, dass bei Knochen- und Weichteilsarkomen intensiv an neuen medikamentösen Therapieansätzen geforscht werden muss. Die niedrige Inzidenz der einzelnen Sarkom-Subtypen

Zelluläre Grundlagenforschung

In der zellulären Grundlagenforschung im Bereich der Sarkome kommt der Etablierung neuer Zelllinien eine besondere Bedeutung zu, da die Anzahl an öffentlich zugänglichen Zelllinien sehr gering ist. Bei den renommierten Zellbanken wie ATCC (American tissue culture collection), CLS (Cell line services) oder DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zelllinien)

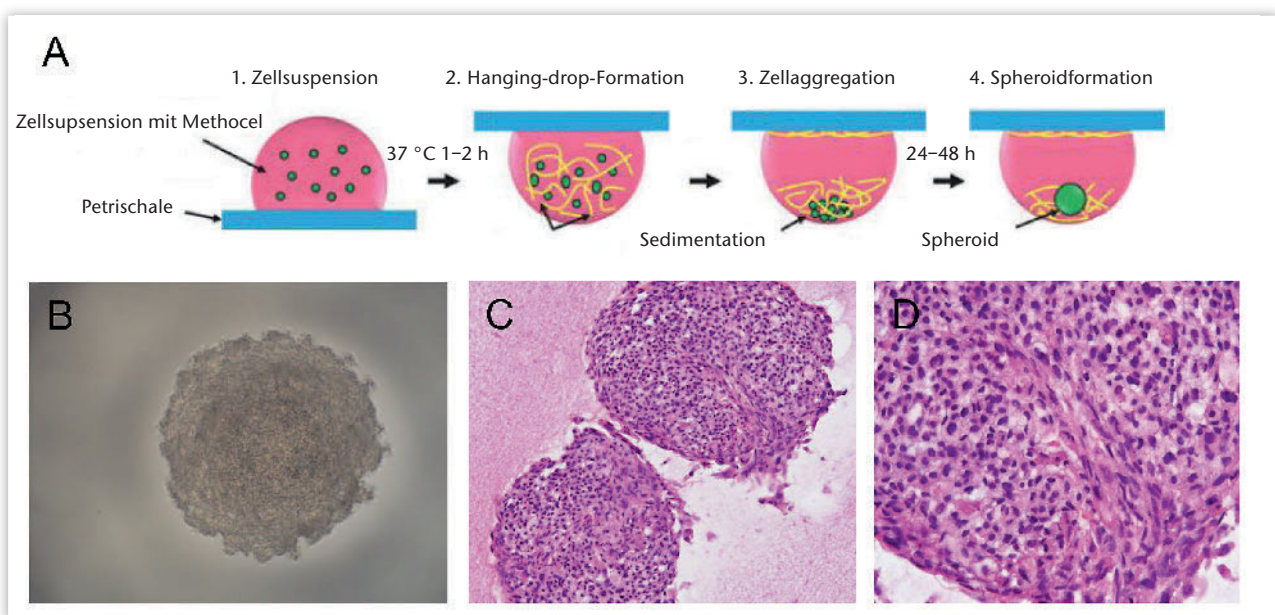


Abbildung 1a–d Dreidimensionale Sphäroidkulturen. **a)** Methodischer Überblick über die Entstehung der hanging drops; **b)** ein Sphäroid im Durchlichtmikroskop; **c, d)** immunhistochemische Hämatoxylin-Eosin Färbungen von Sarkom-Fibroblasten Co-Kulturen.

Jahren ein Plateau von ca. 60 % erreicht [2]. Hinsichtlich der Weichteilsarkome gelang trotz der Einführung der „targeted therapy“ kein entscheidender Durchbruch. Als einzige Ausnahme ist hier die Therapie von myxoiden Liposarkomen mit dem Wirkstoff Trabectedin zu nennen, ein Tetrahydroisochinolin-Alkaloid. Der Mangel an innovativen Ansätzen bei der Sarkombehandlung resultiert aus der hohen Heterogenität dieses Tumortyps mit mehr als 70 verschiedenen histopathologischen Subtypen und dem begrenzten Wissen über die molekularen Faktoren der Tumorentwicklung und Tumorprogression [8, 12]. Die aktuell im Mai 2017 im Lancet Oncology publizierten Ergebnis-

stellt nach wie vor eine Herausforderung für die Durchführung klinischer Studien dar [7].

Um die Tumorbilogie besser zu verstehen und zielgerichtete innovative Therapeutika zu entwickeln, sind präklinische In-vitro- und In-vivo-Studien erforderlich. Der vorliegende Artikel soll einen Überblick über derzeitige Modelle für die Grundlagenforschung im Bereich der Knochen- und Weichteilsarkome geben. Mit Hilfe der Methoden, die auf Basis der Zellkultur und der Genetik aufbauen, soll die Pathophysiologie und die Tumorgenese dieser seltenen Entitäten erforscht werden. Zudem spielen auch adäquate In-vivo-Modelle eine wichtige Rolle.

sind nur von einzelnen Sarkomentitäten mehrere Zelllinien erhältlich. Nur bei häufiger vorkommenden Sarkomtypen wie Osteosarkome, Leiomyosarkome oder Rhabdomyosarkome kann man auf eine ausreichende Anzahl unterschiedlicher Zelllinien zurückgreifen, wohingegen von anderen Sarkomarten, wie z.B. dem Synovialsarkom, nur eine einzige Zelllinie zur Verfügung steht. Von sehr seltenen Subtypen wie dem alveolären Weichteilsarkom gibt es gar keine verfügbare Zelllinie [19]. Aufgrund dieser Einschränkungen konzentrieren sich verschiedene Arbeitsgruppen auf die Etablierung und Charakterisierung neuer Sarkomzelllinien.

Die molekularen Veränderungen während einer langen Kultivierungsdauer sind ein bekanntes Phänomen. Nach ca. 40 Passagen kommt es zu einem deutlichen Anstieg bei den LOHs (Verlust der Heterozygotie). Um die genetischen Unterschiede zwischen den Subklonen, Mykoplasmenkontaminationen und Verunreinigungen mit anderen Zelllinien zu vermeiden, untersuchte das EuroBoNet Konsortium 2010 36 Osteosarkom-, Ewing-Sarkom- und Chondrosarkom-Zelllinien [17].

Die Tumorerheterogenität ist ein besonderes Charakteristikum humaner Tumorerkrankungen. Dabei können sich die Zellen innerhalb eines Tumors bezüglich ihrer Morphologie, ihrer Genexpression, ihres Metabolismus und ihrem Metastasierungspotenzial deutlich voneinander unterscheiden. Diese Heterogenität macht unter anderem die Behandlung von Tumoren so schwierig, da eine Tumormasse (aus einer Biopsie) nicht zwingend repräsentativ für die gesamte Tumormasse ist. Das von Lohberger et al. etablierte Myxofibrosarkom-Tumorerheterogenitätsmodell stellt ein nützliches Instrument dar, um tiefere Einblicke in die Tumorphathogenese und Tumorerheterogenität von Myxofibrosarkomen zu erhalten und neue Behandlungsmöglichkeiten erforschen zu können [16].

Da die herkömmliche Zellkultur mit Sarkomzelllinien einfach zu handhaben und kostengünstig ist, finden sie eine breite Anwendung in der präklinischen Forschung. Besonders für das pharmakologische Screeningverfahren neuer Wirkstoffgruppen werden systematisch standardisierte, zelluläre Tests an Zelllinien durchgeführt, um neue mögliche Targets für eine Therapie zu finden. Die größten Nachteile dieser Modelle sind jedoch das Fehlen dreidimensionaler (3D) Strukturen und das fehlende Zusammenspiel zwischen der Tumorzelle und ihrem natürlichen zellulären Umfeld [1].

3D-In-vitro-Modelle

Sphäroide

In den letzten Jahren hat sich daher die moderne Zellkultur immer stärker in Richtung 3D-Modelle entwickelt, welche den physiologischen Ist-Zu-

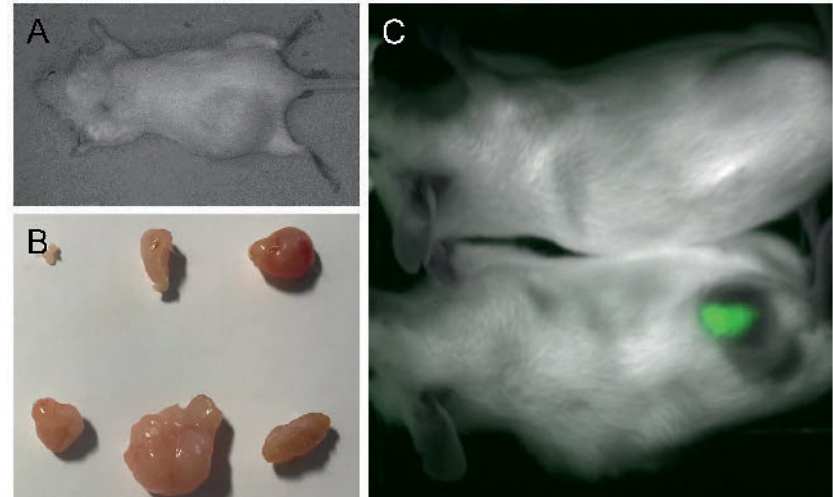


Abbildung 2a–c Mausmodell. **a)** Xenograft-Sarkommodell; **b)** präparierte Xenotransplantate; **c)** GFP-markierte Tumore.

stand am ehesten wiederzuspiegeln. In der konventionellen 2D-Zellkultur breiten sich adhärente Zellen auf einer Plastikoberfläche als sogenannter „Monolayer“ aus, das heißt als einzelne Schicht. Sie wachsen zu einem dichten Zellrasen heran, hören aber auf sich zu teilen, sobald sie zu dicht werden. Man spricht hier von der sogenannten Kontaktinhibition. Es kommt zu einer Veränderung der Zellmorphologie und der RNA- und Proteinexpression [13, 22]. Im menschlichen Körper jedoch wachsen Zellen in Zellverbänden und Organen, und die sind nun mal nicht flach, sondern dreidimensional. Durch die dreidimensionale Kultivierung werden die Architektur des Spendergewebes imitiert und Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Wechselwirkungen ermöglicht [1].

Grundsätzlich gibt es 3D-Kulturen mit und ohne Trägermaterialien. Beispiele für 3D-Trägermaterialien sind Matrigel, Agarose, Methylcellulose, Fibrin oder der Kollagenschwamm. Letzterer eignet sich sowohl für statische wie auch für dynamische (Rollerkultur) Systeme oder bioreaktorgestützte Zellkulturen. Die 3D-Kultivierung funktioniert aber auch ohne Träger, etwa bei der Sphäroidkultur. Sphäroide sind kugelig aggregierte Zellhaufen, die nicht an ein übliches Zellkultursubstrat gebunden wachsen (Abb. 1). Diese Sphäroide sind hervorragend für die Tumorforschung geeignet, da sie auch in Kom-

bination mit anderen Zelltypen – wie z.B. Fibroblasten aus dem umliegenden Bindegewebe (sogenannte Tumor assoziierte Fibroblasten) – als Co-Kultur gezüchtet werden können. In dieser Versuchsanordnung können auch Interaktionen zwischen den verschiedenen Zelltypen erforscht werden.

Voissiere et al. etablierten ein 3D-Chondrosarkommodell für pharmakologische Analysen von Chemotherapeutika [27]. Hierbei werden die Tumorzellen mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix wie Glykosaminoglykane und Typ-II-Kollagen kombiniert. Sphäroidkulturen aus kommerziell erhältlichen Osteosarkomzellen (MG63) und Fibrosarkomzellen (HT1080) waren resistent gegen Doxorubicin und Cisplatin [9]. Salerno et al. zeigten, dass Sphäroidkulturen nach einer Transplantation in Mäusen Tumore ausbilden, welche dem ursprünglichen Primärtumor entsprechen [20]. Modifizierungen der Zellkulturbedingungen, wie z.B. die Reduktion der O₂-Bedingungen, erhöhen das Wachstum dieser 3D-Kulturen.

Bei all den neuen Techniken, die sich in den letzten Jahren entwickelt haben, darf man aber nicht vergessen, dass die 3D-Zellkultur keine neuartige Erfindung ist. Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts züchtete der amerikanische Anatom und Zoologe Ross Granville Harrison Nervenzellen in einem Tropfen aus Lympheflüssigkeit, der an der

Unterseite eines Deckgläschens hing. Die sogenannte Hanging-drop-Methode war geboren. Die von Harrison verwendeten Nervenzellen konnten sich in dem über einer kleinen Vertiefung des Objektträgers hängenden Tropfen ungestört in alle 3 Richtungen des Raums ausbreiten [4].

Organotypische Schnittkulturen

Immortalisierte Zelllinien, welche sich beliebig häufig teilen und in sich in einer Zellkultur theoretisch unbegrenzt vermehren, sind eines der wichtigsten Instrumente in der medizinischen Forschung. Durch langfristige Kultivierung unterscheiden sich jedoch die Zellen in ihren molekularen und phänotypischen Eigenschaften stark von den Herkunftszellen. Um diese Einschränkungen zu überwinden, können direkt aus frischem Tumorgewebe sog. organotypische Schnittkulturen angelegt werden. Vor allem für die molekulare Charakterisierung vor und nach einer medikamentösen Behandlung ist diese Methode besonders geeignet [26]. Gewebeschnitte können allerdings nur für wenige Tage in Kultur gehalten werden. Somit ist der Anwendungsbereich dieses Modells eingeschränkt.

Mit Hilfe von Tumororganoid-Modellen, die direkt aus PatientInnen isoliert worden sind und eine entsprechend umfassende Anamnese und detaillierte genomische Informationen aufweisen, können unterschiedliche Substanzen in einem Hochdurchsatz-Screening getestet werden [18]. Die direkte Korrelation zwischen dem Tumorgenom und der Behandlung ermöglicht personalisierte Medizin und eine Verbesserung in der PatientInnen-Behandlung. Organoide Technologien sind somit in der Tumorforschung im Bereich zwischen in vitro und in vivo angeordnet.

In-vivo-Modelle

Die In-vitro-Studien liefern Hinweise zum Wirkmechanismus, zur Verträglichkeit und zur möglichen Dosierung eines späteren Medikaments. Aus den Ergebnissen im „Tiermodell“ lassen sich zwar nur ungefähre Rückschlüsse auf die Effekte eines Medikaments auf den menschlichen Körper ziehen, man er-

hält jedoch wichtige Informationen bezüglich der Toxizität, wie der Organismus ein Arzneimittel verarbeiten wird und über welche Organe er welche Abbauprodukte wieder ausscheidet.

Zebrafisch

Ein beliebter Modellorganismus in der medizinischen Forschung sind die Larven des Zebrafischs (Zebrafärblinge). Zum einen ist der Zebrafisch ein unkomplizierter, pflegeleichter und preisgünstiger Zeitgenosse. Er braucht nicht viel Platz und reproduziert sich in Massen mit bis zu 300 Eiern wöchentlich. Zum anderen lassen sich viele der Erkenntnisse, die beim Zebrafisch gewonnen werden, auf den Menschen übertragen. Zum Beispiel können Transplantationsexperimente an den Embryonen der Zebrafische vorgenommen werden, die nicht nur groß genug dafür sind, sondern auch den Vorteil der Durchsichtigkeit bieten. Bis ins frühe Larvenstadium hinein sind alle Zellen gut erkennbar. Diese Eigenschaft kann in der Tumorforschung dazu genutzt werden, um das Wachstum eines Tumors direkt zu betrachten, den Weg der Tumorzellen durch die Gefäße zu verfolgen (Migration) oder die Entstehung und Lokalisation von Metastasen zu erforschen.

Eine hohe genetische Konservierung in Kombination mit einer einzigartigen Sensitivität für Sarkome hat den Zebrafisch zu einem wirksamen Werkzeug für die Untersuchung dieser Tumorentitäten gemacht [11]. Transgene- und Genaktivierungsstrategien wurden eingesetzt, um Zebrafischmodelle von Rhabdomyosarkomen [25, 21], malignen peripheren Nervenscheidentumoren [3], Ewing-Sarkomen [15], Fibrosarkomen [14] und Liposarkomen [6] zu entwickeln.

Xenograft-Modelle

Eine interessante Plattform zur Modellierung humaner Tumorerkrankungen bieten immundefiziente Mäuse. Die NOD-scid IL2r γ null Maus rückt zunehmend in den Fokus der präklinischen Forschung. Bei diesen Mäusen handelt es sich um Tiere, die keine funktionalen B- und T-Zellen sowie natürliche Killerzellen haben. Hinzu kommt, dass auch die Makrophagen und dendritischen

Zellen dieser Tiere dysfunktional sind. Dadurch besteht die Möglichkeit, die Mäuse zu „humanisieren“. Traditionell werden Maus-Sarkom-Xenografts verwendet, um die Auswirkungen von Chemotherapeutika wie Cisplatin, Doxorubicin, Ifosfomid und Methotrexat zu testen [5]. Resistente Xenograft-Tumore werden als experimentelle Modellsysteme verwendet, um die Mechanismen der Arzneimittelresistenz zu erforschen und die Sensitivität gegenüber pharmazeutischen Wirkstoffen zu erhöhen [28] (Abb. 2).

Wird menschliches Tumorgewebe in eine Maus eingepflanzt, spricht man von einem PDX-Modell (patient derived xenograft). Hierbei stimmt die anatomische Lage des Implantats mit jedem des Ursprungstumors überein. Durch diese In-vivo-Methode wird es möglich, die histologischen, genetischen und epigenetischen Merkmale sowie die Muster des Tumorwachstums patientenspezifisch zu reproduzieren [23].

Generell sollte bei allen tierexperimentellen Studien die 3-R-Regel (reduce, refine, replace) gelten. Diese wurde Ende der 1950er Jahre von den britischen Wissenschaftlern W. Russell und R. Burch erstmals formuliert. „Reduce“ bedeutet in diesem Zusammenhang die Verminderung der Anzahl an benötigten Tieren auf ein Minimum, „refine“ die Optimierung der angewendeten Methoden und „replace“ den Ersatz von Tierversuchen durch alternative Methoden.

Ziel all dieser Bemühungen ist die Entwicklung neuartiger, zielgerichteter Therapien für SarkompatientInnen, bei denen vorhandene Behandlungsstrategien optimiert und Resistenzentwicklungen gegenüber medikamentöser Therapie und Strahlentherapie minimiert werden. OUP

Interessenkonflikt: Keine angegeben

Korrespondenzadresse

PD Dr. med. Birgit Lohberger
Universitätsklinik für Orthopädie und
Traumatologie
Medizinische Universität Graz
Auenbruggerplatz 5
A-8036 Graz
birgit.lohberger@medunigraz.at

Literatur

1. Akkerman N, Defize LHK: Dawn of the organoid era: 3D tissue and organ cultures revolutionize the study of development, disease, and regeneration. *Bioessays* 2017; 39: 1600244
2. Anninga JK, Gelderblom H, Fiocco M et al.: Chemotherapeutic adjuvant treatment for osteosarcoma: where do we stand? *Eur J Cancer* 2011; 47: 2431–45
3. Berghmans S, Murphey RD, Wienholds E et al.: tp53 mutant zebrafish develop malignant peripheral nerve sheath tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102: 407e412
4. Boxberger J: Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur. Weinheim: WILEY-VCH Verlag, 2007
5. Bruheim S, Bruland OS, Breistol K et al.: Human osteosarcoma xenografts and their sensitivity to chemotherapy. *Pathol Oncol Res* 2004; 10: 133–41
6. Chu CY, Chen CE, Rajendran RS et al.: Overexpression of Akt1 enhances adipogenesis and leads to lipoma formation in zebrafish. *PLoS One* 2012; 7: e36474
7. Dancsok AR, Asleh-Aburaya K, Nielsen TO: Advances in sarcoma diagnostics and treatment. *Oncotarget* 2017; 8: 7068–93
8. Fletcher CDM, Krishnan Unni K, Mertens F (eds.): WHO Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone 2002; 1–415
9. Fujii H, Honoki K, Tsujiuchi T, Kido A, Yoshitani K, Takakura Y: Sphere-forming stem-like cell populations with drug resistance in human sarcoma cell lines. *Int J Oncol* 2009; 34: 1381–6
10. Gronchi A, Ferrari S, Quagliuolo V et al.: Histotype-tailored neoadjuvant chemotherapy versus standard chemotherapy in patients with high-risk soft-tissue sarcomas (ISG-ST5 1001): an international, open-label, randomised, controlled, phase 3, multicentre trial. *Lancet Oncol* 2017; 18: 812–22
11. Hayes MN, Langenau DM: Discovering novel oncogenic pathways and new therapies using zebrafish models of sarcoma. *Methods Cell Biol* 2017; 138: 525–61
12. Jo VY, Fletcher CDM: WHO classification of soft tissue tumours: an update based on the 2013 (4th) edition. *Pathology* 2014; 46: 95–104
13. Kenny PA, Lee GY, Myers CA et al.: The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Mol Oncol* 2007; 1: 84–96
14. Le X, Langenau DM, Keefe MD, Kutok JL, Neuberger DS, Zon LI: Heat shock-inducible Cre/Lox approaches to induce diverse types of tumors and hyperplasia in transgenic zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; 104: 9410e9415
15. Leacock SW, Basse AN, Chandler GL, Kirk AM, Rakheja D, Amatruda JF: A zebrafish transgenic model of Ewing's sarcoma reveals conserved mediators of EWS-FLI1 tumorigenesis. *Dis Mod Mech* 2012; 5: 95e106
16. Lohberger B, Stüendl N, Leithner A et al.: Establishment of a novel cellular model for myxofibrosarcoma heterogeneity. *Sci Rep* 2017; 7: 44700
17. Ottaviano L, Schaefer K-L, Gajewski M et al.: Molecular characterization of commonly used cell lines for bone tumor research: a trans-European Euro-BoNet effort. *Genes Chromosomes Cancer* 2010; 49: 40–51
18. Pauli C, Hopkins BD, Prandi D et al.: Personalized in vitro and in vivo cancer models to guide precision medicine. *Cancer Discov* 2017; 7: 462–77
19. Salawu A, Fernando M, Hughes D et al.: Establishment and molecular characterisation of seven novel soft-tissue sarcoma cell lines. *Br J Cancer* 2016; 115: 1058–68
20. Salerno M, Avnet S, Bonuccelli G et al.: Sphere-forming cell subsets with cancer stem cell properties in human musculoskeletal sarcomas. *Int J Oncol* 2013; 43: 95–102
21. Santoriello C, Deflorian G, Pezzimenti F et al.: Expression of H-RASV12 in a zebrafish model of Costello syndrome causes cellular senescence in adult proliferating cells. *Dis Mod Mech* 2009; 2: 56e67
22. Schmeichel KL, Bissell MJ: Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions. *J Cell Sci* 2003; 116: 2377–88
23. Stebbing J, Paz K, Schwartz GK et al.: Patient-derived xenografts for individualized care in advanced sarcoma. *Cancer* 2014; 120: 2006–15
24. Stiller CA, Trama A, Serraino D et al.: Descriptive epidemiology of sarcomas in Europe: report from the RARECARE project. *Eur J Cancer* 2013; 49: 684–95
25. Storer NY, White RM, Uong A et al.: Zebrafish rhabdomyosarcoma reflects the developmental stage of oncogene expression during myogenesis. *Development* 2013; 140: 3040e3050
26. van der Kuip H, Mürdter TE, Sonnenberg M et al.: Short term culture of breast cancer tissues to study the activity of the anticancer drug taxol in an intact tumor environment. *BMC Cancer* 2006; 6: 86
27. Voissiere A, Jouberton E, Maubert E et al.: Development and characterization of a human three-dimensional chondrosarcoma culture for in vitro drug testing. *PLoS One* 2017; 12: e0181340
28. Wu Z, Min L, Chen D et al.: Overexpression of BMI-1 promotes cell growth and resistance to cisplatin treatment in osteosarcoma. *PLoS One* 2011; 6: e14648