Aus der Abteilung Hämatologie und medizinische Onkologie (Prof. Dr. med. G. Wulf) der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Einfluss von Inhibitoren des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs auf die Makrophagen-/ Mikrogliaassistierte Invasion von Mammakarzinomzellen

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von Sarah Madlen Mizera, geb. Weis aus Stendal

Göttingen 2021

Dekan:

Prof. Dr. med. W. Brück

Referent:

Prof. Dr. med. T. Pukrop

Ko-Referentin: Prof. Dr. rer. nat. S. Mihm

Promotor-Vertreterin: Prof. Dr. hum. biol. M. Schön

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Einfluss von Inhibitoren des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs auf die Makrophagen-/ Mikroglia-assistierte Invasion von Mammakarzinomzellen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 17.12.2021

.....

Inhaltsverzeichnis

A	bbildu	ngsverzeichnis	. IV
Т	abeller	ıverzeichnis	V
A	bkürzı	Ingsverzeichnis	. VI
1		Einleitung	1
	1.1	Das Mammakarzinom – Klassifizierung und Prognose	1
	1.2	Tumorprogression und Metastasierung	3
	1.2. 1.2. 1.2.	 Mechanismen der Metastasierung Tumorprogression durch Mikromilieu Rolle residenter Makrophagen bei der metastatischen Kolonisation 	3 6 8
	1.3	Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg	. 9
	1.3. 1.3. 1. 1. 1.3.	 Bedeutung für die Mammakarzinomsubtypen Inhibitoren des Signalwegs 3.2.1 mTOR-Inhibitoren 3.2.2 PI3K-Inhibitoren Makrophagen als potenzielles Therapieziel 	11 13 14 15 16
	1.4	Zielsetzung der Arbeit	18
2		Material und Methoden	20
	2.1	Materialien	20
	2.1. 2.1. 2. 2.1. 2.1. 2.1. 2.1. 2.1. 2	 Zelllinien Primärkulturen	20 20 21 21 22 22 22 23 23
	2.2	Methoden	24
	2.2.	1 Zellkulturmethoden	24

2.2.2 Gewinnung der Primärkulturen	24
2.2.2.1 Isolation von Monozyten aus dem peripheren Blut	24
2.2.2.2 Isolation von Knochenmarksmakrophagen aus der Maus	25
2.2.2.3 Isolation von Mikroglia aus der Maus	27
2.2.3 Bestimmung von Viabilität und Proliferation	27
2.2.3.1 MTT-Assay	27
2.2.3.1.1 Reagenzien	27
2.2.3.1.2 Durchführung	28
2.2.3.2 WST-1-Assay	28
2.2.3.2.1 Reagenzien	28
2.2.3.2.2 Durchführung	28
2.2.3.3 xCELLigence	29
2.2.4 Proteinbiochemische Methoden	29
2.2.4.1 Isolation von Gesamtproteinen	29
2.2.4.1.1 Reagenzien	29
2.2.4.1.2 Durchführung	30
2.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	30
2.2.4.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	31
2.2.4.3.1 Reagenzien	31
2.2.4.3.2 Durchführung	31
2.2.4.4 Western Blot	32
2.2.4.4.1 Reagenzien	32
2.2.4.4.2 Durchtunrung	32
2.2.5 IN Vitro-IVIIKroinvasionsassay	33
2.2.5.1 Vorbemerkung	33
2.2.5.2 Durchtunrung	34 25
2.2.6 Statistische Auswenung	30
3 Ergebnisse	36
3.1 Untersuchung des mTOR-Inhibitors	36
3.1.1 Toxizität von RAD001 auf Tumorzellen und Makrophagen	36
3.1.1.1 Viabilität und Proliferation von Tumorzellen	36
3.1.1.2 Viabilität und Proliferation von Makrophagen	38
3.1.2 Einfluss von RAD001 auf die Proteinexpression	40
3.1.2.1 S6- und p-S6-Expression von Tumorzellen	40
3.1.2.2 S6- und p-S6-Expression in Makrophagen	41
3.1.3 Einfluss auf die Makrophagen-induzierte Tumorinvasion	42
3.2 Untersuchung des Pan-PI3K-Inhibitors	43
0.0.4 Taviaitik yan DKM400 aya Tama anallan yang Malanan kanan	
3.2.1 I oxizitat von BKM120 auf Tumorzellen und Makrophagen	43
3.2.1 Toxizitat von BKM120 auf Tumorzellen und Makrophagen	43 43
3.2.1 Toxizitat von BKM120 auf Tumorzellen und Makrophagen	43 43 45
3.2.1 Toxizitat von BKM120 auf Tumorzellen und Makrophagen	43 43 45 47

3 3.2	.2.2.2 S6- und p-S6-Expression von Makrophagen	48 49
4	Diskussion	50
4.1	Heterogenes Ansprechen der Mammakarzinomzellen auf die Anwendung der PI3K/Akt/mTOR-Signalwegsinhibitoren	50
4.2	Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg steuert vielfältige Funktionen in Tumor-assoziierten Makrophagen	54
4.3	Reduktion der Makrophagen-induzierten Invasivität durch RAD001 und BKM120	56
4.4	Residente Makrophagenspezies als denkbares Interventionsziel	58
5	Zusammenfassung	61
6	Literaturverzeichnis	63

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Kennzeichen maligner Zellen	4
Abb. 1.2: Schritte der metastatischen Kolonisation	5
Abb. 1.3: Übersicht über den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg	. 10
Abb. 2.1: Schematischer Aufbau der modifizierten Boyden-Kammer	. 34
Abb. 3.1: Viabilität von MCF7 (A), SK-BR-3 (B), MDA-MB-231 (C) und 410.4 (D) nach Behandlung mit RAD001	37
Abb. 3.2: Proliferationsmessung von MCF7 (A) und 410.4 (B) während RAD001-Behandlung	. 38
Abb. 3.3: Viabilität von Mac (A), BMDM (B) und MG (C) nach Behandlung mit RAD001	. 39
Abb. 3.4: Proliferationsmessung von Mac (A) und BMDM (B) während RAD001-Behandlung	. 40
Abb. 3.5: Western-Blot-Analysen für S6 und p-S6 der mit RAD001 behandelten MCF7 (A) und 410.4 (B)	. 41
Abb. 3.6: Western-Blot-Analysen für S6 und p-S6 der mit RAD001 behandelten MΦ (A) und BMDM (B)	. 42
Abb. 3.7: Mikroinvasionsassay von 410.4 in Ko-Kultur mit BMDM ± RAD001	. 43
Abb. 3.8: Viabilität von MCF7 (A), SK-BR-3 (B), MDA-MB-231 (C) und 410.4 (D) nach Behandlung mit BKM120	44
Abb. 3.9: Proliferationsmessung von MCF7 (A) und 410.4 (B) während BKM120-Behandlung	. 45
Abb. 3.10: Viabilität von Mac (A), BMDM (B) und MG (C) nach Behandlung mit BKM120	. 46
Abb. 3.11: Proliferationsmessung von Mac (A) und BMDM (B) während BKM120-Behandlung	. 47
Abb. 3.12: Western-Blot-Analysen für S6 und p-S6 der mit BKM120 behandelten MCF7 (A) und 410.4 (B)	. 48
Abb. 3.13: Western-Blot-Analysen für S6 und p-S6 der mit BKM120 behandelten MΦ (A) und BMDM (B)	. 48
Abb. 3.14: Mikroinvasionsassay von 410.4 in Ko-Kultur mit BMDM ± 100 nM BKM120	49

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Zelllinien	20
Tab. 2.2: Medien und Zellkulturzusätze	21
Tab. 2.3: Antikörper	22
Tab. 2.4: Verbrauchsmaterialien	23
Tab. 2.5 Geräte	23
Tab. 2.6 Reagenzien für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	31

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Cell Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BELLE	buparlisib breast cancer clinical evolution
BMDM(s)	bone marrow derived macrophage(s), Knochenmarksmakrophagen
BOLERO	breast cancer trials of oral everolimus
BRCA	BReast CAncer
BSA	bovines Serumalbumin
Bspw.	beispielsweise
CDK	cyclin-dependent kinase, Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	komplementäre DNA
СТС	circulating tumor cells, zirkulierende Tumorzellen
ctl	control, Kontrolle
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleid acid, Desoxyribonukleinsäure
DTC	disseminated tumor cells, disseminierte Tumorzellen
ECL	enhanced chemiluminescence, verstärkte Chemilumineszenz
ECM	extracellular matrix, extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor, epidermaler Wachstumsfaktor
EtOH	Ethanol
FCS	fetal calf serum, fetales Kälberserum
HER2/neu	human epidermal growth factor receptor 2, humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
HIF-2α	hypoxia-inducible factor-2α, Hypoxie-induzierter Faktor 2α
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
hs	homo sapiens
IFN-γ	Interferon-y
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
Mac	humane Makrophagen aus dem peripheren Blut
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
ME	β-Mercaptoethanol
MHC	major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
mm	mus musculus
mRNA	messenger ribonucleic acid
mTOR	mammalian target of rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenytetrazoliumbromid
MW	molecular weight, Molekulargewicht

ΜΦ	humane Makrophagen aus peripherem Blut
NeoPHOEBE	neoadjuvant PI3K inhibition in HER2 overexpressing breast cancer
NHS	normal horse serum
NMRI	Naval Medical Research Institute
NST	nicht-spezifischer Typ
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Polyadenosindiphosphat-Ribose-Polymerase
PBS	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PDK1	3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1
PI3K	phosphoinositide 3-kinase, Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
РКВ	protein kinase B, Proteinkinase B
PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10
RIPA	radioimmunoprecipitation assay
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
RT	reverse Transkriptase
RTK	Rezeptortyrosinkinasen
σ	Standardabweichung
SDS	sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
ТАМ	Tumor-assoziierte Makrophagen
TBST	Tris-buffered saline with Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF-β	transforming growth factor-β
TLR	toll like receptor, Toll-like-Rezeptoren
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSC2	tuberous sclerosis 2
VEGF	vascular endothelial growth factor, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
Vgl.	vergleiche
Wnt	wingless type MMTV integration site
WST	water soluble tetrazolium
ZNS	zentrales Nervensystem

Maßeinheiten:

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Massenprozent
g	g-Kraft (für Zentrifugenprotokolle)
Μ	Molar
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute

Präfixe:

k	kilo: 1×10²
с	centi: 1×10 ⁻²
m	milli: 1×10 ⁻³
μ	mikro: 1×10 ⁻⁶
n	nano: 1×10 ⁻⁹

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom – Klassifizierung und Prognose

Brustkrebs ist die weltweit häufigste bösartige Tumorerkrankung von Frauen (Harbeck et al. 2019). Trotz verbesserter Früherkennungsmaßnahmen und Behandlungsoptionen stellt er noch immer eine der Haupttodesursachen unter den neoplastischen Erkrankungen dar (Weigelt et al. 2005).

Die histopathologische Einteilung erfolgt in die Gruppen der nicht-invasiven Karzinome (*Carcinoma in situ*) und die der invasiven Brustkrebsformen. Unter den letzteren stellen die duktalen bzw. als nicht-spezifischer Typ (NST) bezeichnete und die lobulären Karzinome die häufigsten Entitäten in der westlichen Welt dar (Russnes et al. 2017; Hoon Tan et al. 2020). Zu den selteneren Formen zählen unter anderem tubuläre, muzinöse und medulläre Subtypen.

Zur weiteren Differenzierung haben sich in den letzten Jahrzehnten molekulare Parameter, die die Tumorformen hinsichtlich gezielterer Therapieoptionen und Prognose unterscheiden, etabliert. Neben der Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren ist die Bestimmung der Ausprägung des *human epidermal growth factor receptor 2 (HER2/neu)* für die Diagnostik essenziell (Goldhirsch et al. 2011; Russnes et al. 2017). Auf Grundlage dessen lassen sich drei heterogene Hauptformen kategorisieren: Hormonrezeptor-positive, *HER2/neu*-überexprimierende und *triple*-negative, d. h. weder Hormonrezeptor- noch *HER2/neu*-exprimierende Tumoren.

Der überwiegende Teil wird von den Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomen (65 - 75%) gebildet (Liedtke und Kiesel 2012), die sich abhängig von ihrer Proliferationsrate in die Unterformen "Luminal A" und "Luminal B" subklassifizieren lassen (Perou et al. 2000). Diese sind mit einer per se besseren Prognose verglichen mit den beiden anderen Subtypen assoziiert (Goto et al. 2018). Eine adjuvante endokrine Therapie, die einen Rezeptorantagonismus mittels Tamoxifen oder eine supprimierte Östrogenproduktion bewirkt, wird ab einer nachweisbaren Expression von Hormonrezeptoren von \geq 1% empfohlen, wohingegen eine zusätzliche

Chemotherapie in fortgeschrittenen Stadien in Abhängigkeit weiterer Risikofaktoren indiziert ist (Aebi et al. 2010; Brufsky 2015). Zu den neueren Substanzen in der Behandlung bei metastasiertem Hormonrezeptor-positiven Brustkrebs zählen unter anderem Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinase 4 und 6 (CDK4/6) (Fernandes et al. 2018; Shah et al. 2018).

Die *HER2/neu*-angereicherten Tumoren (15 - 20%) (Yersal und Barutca 2014) beruhen auf einer Überexpression und/ oder Amplifikation des Gens *erb-B2* (King et al. 1985). Mit der Einführung des humanisierten monoklonalen *HER2/neu*-Antikörpers Trastuzumab in Kombination mit einer konventionellen Chemotherapie konnte diese einst sehr aggressive Erkrankung mit schlechter Prognose zu einer gut behandelbaren gewandelt werden (Santa-Maria et al. 2016; Slamon et al. 1987). In den letzten Jahren haben sich zur Therapie spezifische Tyrosinkinaserezeptoren wie Lapatinib und Tucatinib sowie das Antikörper-Wirkstoff-Konjugat Trastuzumab-Emtansin (T-DM1) etabliert (Bartsch und Bergen 2018; Lewis et al. 2008).

Die heterogene Gruppe der *triple*-negativen Mammakarzinome stellt zwar mit 10 - 15% (Vuong et al. 2014) eine vergleichsweise kleinere Population dar, betrifft jedoch besonders jüngere Frauen und ist trotz der meist initial hohen Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika wegen seiner diversen Unterformen und des bisher fehlenden Ansatzes einer gezielteren Behandlung mit der schlechtesten Prognose verbunden (Sørlie et al. 2001; Kaufmann und Pusztai 2011). Potenziell vielversprechende Therapeutika umfassen Antiandrogene, Immuncheckpoint-Inhibitoren wie PD-1- bzw. PD-L1-Antikörper, für die kürzlich ein Überlebensvorteil nachgewiesen werden konnte (Mavratzas et al. 2020; Schmid et al. 2018; Schmid et al. 2020), sowie Polyadenosin-diphosphat-Ribose-Polymerase (PARP) -Inhibitoren Olaparib für Trägerinnen einer BRCA1/2-Mutation (Armstrong und Clay 2019).

Obwohl nur etwa 5 bis 10% der Patientinnen mit Brustkrebs bei Diagnosestellung Fernmetastasen und somit bereits eine inkurable Erkrankungssituation aufweisen, bleibt das Risiko einer Metastasierung im Verlauf auch bei einem initial lokalisierten Stadium hoch (Waks und Winer 2019). Es wird geschätzt, dass etwa 15% der Brustkrebspatientinnen innerhalb von 3 Jahren (Weigelt et al. 2005) und mindestens 30% der Frauen in einem unbegrenzten Zeitraum nach der initialen Behandlung Fernmetastasen entwickeln (Kimbung et al. 2015). Zu den am häufigsten betroffenen Organen zählen hierbei Knochen, Lunge und Leber sowie im weiteren

Krankheitsverlauf auch das Gehirn (Lee 1983; Marino et al. 2013; Shao et al. 2011). Die Morbidität wird hierbei nicht nur von den von der Lokalisation der Metastasen abhängigen Komplikationen beeinflusst, sondern steigt auch mit Anzahl der Absiedelungen (Largillier et al. 2008). Aufgrund der Einführung von Screeningprogrammen, verbesserter diagnostischer Maßnahmen und systemischer Therapiekonzepte konnten zwar die Inzidenz und die Mortalität durch Metastasen in den zuerst betroffenen Organen gesenkt werden (Gil-Gil et al. 2014), jedoch ist seither ein vermehrtes Auftreten von Tochtergeschwülsten im Hirnparenchym oder den Hirnhäuten zu verzeichnen (Pelletier et al. 2008; Weigelt et al. 2005).

1.2 Tumorprogression und Metastasierung

Obwohl die Folgen einer Metastasierung für bis zu 90% der Todesursachen krebserkrankter Patienten verantwortlich gemacht werden, ist bisher nicht vollständig verstanden, welche Prozesse an der Streuung maligner Zellen in ein vom Primärtumor entferntes Organ sowie dessen Destruktion beteiligt sind (Spano und Zollo 2012; Weigelt et al. 2005).

1.2.1 Mechanismen der Metastasierung

Erwiesen ist, dass die malignen Zellen eines Primärherdes viele komplexe, zusammenhängende Schritte der Tumorprogression durchlaufen müssen, um sich schließlich erfolgreich in einem sekundären Organ anzusiedeln (Fidler 2002; Poste und Fidler 1980). Auf Basis extensiver Forschung lassen sich zum derzeitigen Zeitpunkt zehn Kennzeichen von Krebszellen (s. Abb. 1.1), die deren fundamentale Gemeinsamkeiten zusammenfassen sollen, kategorisieren (Hanahan und Weinberg 2000, 2011; Welch und Hurst 2019). Demnach führen Mutationen in Tumorsuppressorund Protoonkogenen zu einer Durchbrechung regulativer Mechanismen wie dem programmierten Zelltod und einer Proliferationshemmung. Mittels einer Anpassung ihrer Energieregulation sind sie dazu befähigt, ihre für ihr ungehemmtes Wachstum nötige gesteigerte metabolische Versorgung zu sichern. Im Verlauf der weiteren malignen Entartung kommt es zu einer zunehmenden genomischen Instabilität mit krankhafter Veränderung der Erbinformation, die schließlich auch an die Tochterzellen weitergegeben wird. Über die Induktion einer Angiogenese erlangt der Tumor Anschluss an das Blutgefäßsystem, über welches die malignen Zellen in die Zirkulation

eintreten können. Ein Großteil der zirkulierenden Tumorzellen (*circulating tumor cells*, CTC) stirbt innerhalb kurzer Zeit, sodass schließlich weniger als 0,01% dieser Zellen potentiell eine Metastase bilden kann (Fidler 1970; Vanharanta und Massagué 2013). Nach erfolgreicher Extravasation über das Kapillarnetz im Zielorgan ist es schließlich möglich, über eine Invasion und Modulation des neuen Gewebes als disseminierte Tumorzelle (*disseminated tumor cells*, DTC) die Kolonisation zu finalisieren. In allen genannten Lokalisationen - also sowohl im Primärtumor, in der Zirkulation als auch im Zielorgan - ist es vonnöten, einer Erkennung und Destruktion durch das Immunsystem zu entgehen.



Abb. 1.1: Kennzeichen maligner Zellen

Dargestellt sind die bis dato kategorisierten Fähigkeiten einer jeden Krebszelle, die im Verlauf der Erkrankung erworben werden müssen, um sich erfolgreich in einem sekundären Organ anzusiedeln (Einzelheiten siehe Text). Abbildung modifiziert nach Hanahan und Weinberg (2011) mit freundlicher Genehmigung von Copyright Clearance Center's RightsLink®

Die Vorstellung, dass die Tumorzellen linear die genannten Fähigkeiten erwerben müssen, damit es letztlich zur erfolgreichen Kolonisation in einem sekundären Organ kommt, gilt inzwischen als obsolet. Vielmehr wird die Metastasierungskaskade als eine Serie gleichzeitiger, zum Teil auch überlappender Prozesse angesehen (Harper et al. 2016; Lambert et al. 2017). Neuere Erkenntnisse deuten zudem darauf hin, dass die Aussaat der Tumorzellen in sekundäre Gewebe bereits früh in der Tumorprogression und oft noch vor Detektion des Primarius stattfindet (Hosseini et al. 2016; Hu et al. 2017). Solitäre Zellen sind dazu befähigt, aus dem Zellzyklus auszutreten und in einem ruhenden Zustand als sogenannte *dormant cells* zu verharren, bis sie schließlich mit einer Latenz von Monaten bis Jahren nach Ankunft im sekundären Gewebe reaktiviert werden und die Formation einer Metastase initiieren können (Massagué und Obenauf 2016; Townson und Chambers 2006).



Abb. 1.2: Schritte der metastatischen Kolonisation

In der Phase der Prä-Kolonisation (oberer Teil der Abbildung) kommt es innerhalb von Minuten bis Tagen zu einer Serie folgender Ereignisse: lokale Invasion der malignen Zellen im Primarius (1), Intravasation in das Blutgefäßsystem des Tumors (2), Zirkulation der CTC als Einzelzelle oder Cluster (3), Arrest im Kapillarnetz (4), Extravasation in das Parenchym des Zielorgans (5). Die Phase der eigentlichen metastatischen Kolonisation (unterer Teil der Abbildung) erstreckt sich über einen Zeitraum von Tagen bis mehrere Jahre und lässt sich folgendermaßen gliedern: zunächst müssen die aus dem Gefäßsystem ausgetretenen Zellen den lokalen Abwehrmechanismen des betroffenen Organs umgehen (6), um sich im Weiteren in einer geeigneten Umgebung niederlassen und ihr tumorinitiierendes Potential entfalten zu können (7). Während einer Latenzphase von Monaten bis Dekaden können die DTC als Einzelzelle (8) oder im Verband als indolente Mikrometastasen (9) verweilen, bis schließlich eine ungehinderte Proliferation (10) mit Modulation der lokalen Mikroumgebung zu eigenen Gunsten (11) eintritt. Eine Behandlung (Rx) gesicherter, meist bereits klinisch manifester (Makro-) Metastasen kann möglicherweise einen Teil der Zellen eliminieren (12). Über die Aneignung von Resistenzen gegenüber systemischen Therapeutika (13) kann es im Verlauf letztlich zu einem Auswachsen eines Therapie-refraktären Tumors (14) kommen. Übernommen aus Massagué und Obenauf (2016) mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group sowie der Autoren

Der Prozess der metastatischen Kolonisation lässt sich vereinfacht in vier Schritte gliedern: zunächst sind eine Re-Initiierung der Proliferation und Modulation der Mikroumgebung des betroffenen Organs vonnöten, damit durch weitere Motilität und Invasion eine Mikrometastase (< 2 mm) gebildet wird, aus der im Weiteren eine Makrometastase mit eigenem Bindegewebe und Blutgefäßsystem hervorgeht, die zur Organdestruktion mit folgendem -versagen und zum Tod führen kann (Blazquez et al. 2020; Massagué und Obenauf 2016; Welch und Hurst 2019).

Während sich die Forschung lange Zeit vornehmlich auf die Identifikation von intrinsischen Faktoren wie genetischen und epigenetischen Veränderungen in den malignen Zellen selbst und dem daraus resultierenden metastatischen Potential konzentrierte, wird der dazugehörigen Umgebung im Zielorgan, dem sogenannten Mikromilieu, immer mehr Beachtung beigemessen.

1.2.2 Tumorprogression durch Mikromilieu

Ähnlich wie gesunde Gewebe bestehen Tumoren aus parenchymatösen und stromalen Komponenten (Dvorak et al. 2011). Neben einem vom zugrundeliegenden Malignom abhängigen, variablen Anteil des Parenchyms, das aus den Tumorzellen selbst gebildet wird, besteht das Stroma aus einer Vielzahl von benignen Zellen und azellulären Bestandteilen. Dieses sogenannte Mikromilieu beinhaltet residente Faktoren wie in extrazelluläre Matrix (*extracellular matrix*, ECM) eingebettete Fibroblasten, Blut- und Lymphgefäße sowie verschiedenste Chemo- und Zytokine einerseits und nicht-residente, d. h. in das Gewebe eingewanderte Leukozyten andererseits (Schiavoni et al. 2013). Letztere werden neben T-Lymphozyten, natürlichen Killer- (NK-Zellen) und dendritischen Zellen zum Großteil von Makrophagen repräsentiert (Solinas et al. 2009). In diesem konstruierten Netzwerk herrschen komplexe dynamische Interaktionen und bidirektionale Wechselwirkungen, die die neoplastischen Eigenschaften der Tumorzellen zugunsten einer Progression beeinflussen können.

Makrophagen sind Teil des angeborenen Immunsystems und differenzieren sich aus zirkulierenden monozytären Progenitorzellen. Diese können via chemotaktischen Reizen aus dem Blutgefäßsystem in ein Zielorgan übertreten und abhängig von den Signalen aus der neuen Umgebung in reife Makrophagen mit unterschiedlichen Phänotypen polarisieren (Mantovani et al. 2004; Martinez et al. 2009; Mosser 2003). In diesem Zusammenhang hat sich stark vereinfachend die Dichotomie der sogenannten M1- und M2-Makrophagen, die die beiden Extreme eines Kontinuums

unterschiedlicher Funktionszustände darstellen soll und im Expressionsmuster von Zytokinen, Enzymen und Oberflächenantigenen variiert, in der Wissenschaft etabliert.

Die klassische Aktivierungsform hin zum M1-Phänotyp erfolgt in Anwesenheit von Lipopolysacchariden (LPS) aus der Membran gram-negativer Bakterien oder des Zytokins Interferon- γ (IFN- γ) und ist durch die Induktion einer Entzündungsreaktion mit hoher Expression von Interleukin-12 (IL-12) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und einer supprimierten IL-10-Synthese gekennzeichnet (IL-12^{high} und IL-10^{low}) (Mantovani et al. 2002). Dies führt zu einer vermehrten Antigenpräsentation über *major histocompatibility complex* (MHC)-Moleküle sowie zu einer gesteigerten zytotoxischen Aktivität gegenüber Mikroorganismen und potenziell auch neoplastischen Zellen (Chanmee et al. 2014; Solinas et al. 2009).

Innerhalb des M2-Makrophagenphänotyps lassen sich weitere Subtypen (M2a, M2b und M2c), die durch alternative Aktivierungsmöglichkeiten charakterisiert und für Prozesse wie Wundheilung, Gewebsumorganisation und Angiogenese zuständig sind, definieren (Martinez et al. 2009). Diese Polarität wird in Anwesenheit erhöhter Konzentrationen an IL-4, -10 und -13 und durch aktivierte *toll like receptor-* (TLR-) Signalkaskaden, Immunkomplexe sowie Glukokortikoide induziert und zeichnet sich durch eine hohe IL-10- und niedrige IL-12-Expression aus (IL-12^{low} und IL-10^{high}) (Cassetta et al. 2011).

Bereits in den 1970er Jahren wurden progressionsfördernde Eigenschaften von im Mikromilieu eines Malignoms befindlichen Makrophagen, sogenannten Tumorassoziierten Makrophagen (TAM), beschrieben (Balkwill und Mantovani 2001). In vielen nachfolgenden klinischen Studien korrelierte das Ausmaß der TAM-Ansammlung in unterschiedlichen Tumortypen mit einer schlechteren Prognose für die Betroffenen (Leek und Harris 2002; Lewis und Pollard 2006; O'Sullivan und Lewis 1994; Sica et al. 2006) sowie einem gesteigerten metastatischen Potential der Tumorzellen (Nardin und Abastado 2008). Aufgrund ihrer per se M2-artigen Polarisierung sind TAM dazu in der Lage, nahezu alle Prozesse der Tumorprogression und der Metastasierung zu unterstützen (Mantovani et al. 2002; Pollard 2004; Qian und Pollard 2010; van Ginderachter et al. 2006). Sie migrieren präferentiell in schlecht vaskularisierte, nekrotisch-hypoxische Gebiete des Tumors (Murdoch et al. 2004), wo sie über die Hochregulation des Transkriptionsfaktors *hypoxia-inducible factor-2a* (HIF-2 α) die Expression von *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und anderen

proangiogenetischen Faktoren induzieren (Leek et al. 1996; Mantovani et al. 2002; Talks et al. 2000). Dies führt zur Bildung neuer Gefäße, die essenziell für das weitere Tumorwachstum und Voraussetzung für eine erfolgreiche Intravasation sind. Durch die Produktion von Enzymen wie Matrixmetalloproteinasen (MMP), insbesondere MMP9, Urokinasen und Kathepsinen erfolgen die Degradierung sowie ein Umbau der ECM, was die Motilität der Tumorzellen steigert und deren Invasion in umliegendes Gewebe unterstützt (Pollard 2004). Weiterhin sezernieren TAM Wachstumsfaktoren wie *epidermal growth factor* (EGF), *transforming growth factor-\beta* (TGF- β) und weitere Zytokine, die letztlich zu einer erleichterten Migration der malignen Zellen führen und zusätzlich proliferative und anti-apoptotische Signale liefern (Massagué 2008; O'Sullivan et al. 1993; Pollard 2004).

1.2.3 Rolle residenter Makrophagen bei der metastatischen Kolonisation

Bereits 1889 stellte Stephen Paget mit seiner "*seed-and-soil"*-Theorie die Hypothese auf, dass die Mechanismen der Metastasierung auf Interaktionen zwischen den Tumorzellen (= *seed*, Samen) und dem Mikromilieu des sekundären Gewebes (= *soil*, Nährboden) beruhen (Paget 1889). Die Entwicklung eines metastatischen Herdes ist demnach nicht allein durch intrinsische Faktoren der Tumorzellen bedingt, sondern erfordert erneut eine optimale Umgebung für die erfolgreiche Kolonisation im Zielorgan. Pagets Annahme wird durch die Tatsache, dass Tumoren präferentiell in bestimmte sekundäre Gewebe streuen, wie in 1.1 für das Mammakarzinom erwähnt, und demnach einen von der Entität abhängigen Organtropismus aufweisen, unterstützt (Chen et al. 2018).

Hierfür moduliert der Primärtumor durch die Ausschüttung von löslichen Mediatoren, die als Lockstoffe fungieren und monozytäre Zellen des Knochenmarks mobilisieren, noch vor der Ankunft erster zirkulierender Tumorzellen das künftige Metastasenorgan und schafft sich auf diese Weise ein optimales Milieu, die sogenannte prämetastatische Nische, für deren spätere Kolonisation (Kaplan et al. 2005; Steeg 2016).

Der Umstand, dass Metastasen besonders in Organen mit spezialisierten residenten Makrophagenpopulationen auftreten, wirft die Frage auf, ob ebenso wie monozytäre Zellen von Primärtumor und prämetastatischem Gewebe auch die ortständigen Immunzellen als Teil des Nährbodens einen progressionsfördernden Einfluss haben.

Jedoch haben sich bisher nur sehr wenige Arbeiten mit diesem Thema beschäftigt. Für die Kupffer-Zellen, die Leber-spezifischen Makrophagen, wurde in Tiermodellen mit Tumorzelllinien kolorektaler Karzinome demonstriert, dass durch die Depletion der Immunzellen sowie deren direkter und indirekter Stimulation sowohl tumorizide (Gorden et al. 2007; Sturm et al. 2003) als auch proinvasive (Bayón et al. 1996; Heuff et al. 1993; Wen et al. 2013) Funktionszustände erreicht werden können. In einem organotypischen Hirnschnitt-Ko-Kulturmodell wurde erstmals gezeigt, dass die residenten Makrophagen des zentralen Nervensystems (ZNS), die Mikroglia, aktiv als Transporter und wegbereitende Lotsen für die Mammakarzinomzellen dienen können und auf diese Weise die Kolonisation im Hirngewebe fördern (Chuang et al. 2013; Pukrop et al. 2010). Dieser Prozess, der als Makrophagen-/ Mikroglia-assistierte Tumorinvasion bezeichnet wurde, ließ sich erfolgreich durch Inhibition des Wnt-Signalwegs sowie die Applikation von Bisphosphonaten blockieren (Pukrop et al. 2010; Rietkötter et al. 2013). Des Weiteren ergaben sich Hinweise darauf, dass Mitglieder der TLR- und PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskaden beteiligt sein könnten.

1.3 Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg

Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt/mammalian target of rapamycin Der (mTOR)-Signalweg ist an der Regulierung einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie Proliferation, Metabolismus, Adhäsion, Apoptose, Angiogenese und Migration beteiligt (Markman et al. 2010a; Workman und Clarke 2012). Über die Bindung eines Liganden an eine Rezeptortyrosinkinase (RTK) wie beispielsweise den HER2/neu-Rezeptor, Bund T-Zell-, TLR sowie verschiedene Zytokinrezeptoren und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wird die Signalkaskade in Gang gesetzt (Markman et al. 2010b; Weichhart und Säemann 2008). Die nachfolgende Autophosphorylierung der Rezeptoren aktiviert diesen zugehörige Adaptormoleküle an der Zellmembran, die ihrerseits PI3K der Klasse I zu diesem Komplex rekrutieren. Die aus einer regulatorischen (p85) und einer katalytischen Untereinheit (p110 α , p110 β , p110 γ oder p110 δ) bestehende heterodimere Lipidkinase PI3K fördert die Umwandlung von Phosphatidylinositol-(4,5)bisphosphat (PIP₂) in Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat (PIP₃) in der Plasmamembran (Cantley 2002; Vivanco und Sawyers 2002). Während PI3Ky und PI3Kδ vor allem in Zellen der Hämatopoese, insbesondere in Leukozyten, vorkommen, sind PI3Kα und PI3Kβ ubiquitär lokalisiert (Costa et al. 2010; Markman et al. 2010b; Thorpe et al. 2015; Vanhaesebroeck et al. 1997). Der Tumorsuppressor phosphatase and *tensin homolog deleted on chromosome 10 (*PTEN) dephosphoryliert entstandenes PIP₃ wiederum zu PIP₂, terminiert auf diese Weise das PI3K-*Signaling* und stellt somit den wichtigsten physiologischen Gegenspieler zur PI3K dar (Maehama und Dixon 1998).



Abb. 1.3: Übersicht über den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg

Dargestellt ist der aktivierte Signalweg. Phosphatgruppe (P), Adaptormolekül (A), sowie weitere Bestandteile von mTORC1 und mTORC2. Details und weitere Abkürzungen sind dem Text zu entnehmen. Modifiziert nach Weigelt und Downward (2012)

Die Kinasen Akt, auch bekannt als Proteinkinase B (PKB), und *phosphoinositidedependent kinase-1* (PDK1) werden durch akkumuliertes PIP₃ zur Membran mobilisiert und durch direkte Bindung mit ihrer Pleckstrin-homologen Domäne (PH-Domäne) an diesen *second messenger* aktiviert (Miller et al. 2011). Für die Entfaltung der vollen katalytischen Aktivität von Akt ist jeweils die Phosphorylierung an den Aminosäuren Thr308, die durch PDK1 erfolgt, und Ser473 notwendig (Vanhaesebroeck und Alessi 2000). Einer der Haupteffektoren von Akt ist mTOR, das zu den Serin-/Threoninkinasen zählt und Bestandteil der Proteinkomplexe mTORC1 und mTORC2 ist (Navé et al. 1999). Über eine Phosphorylierung des Tumorsuppressors *tuberous sclerosis 2* (TSC2), der eine heterodimere Einheit mit TSC1 bildet, wird dessen inhibierende Wirkung auf mTOR durch Akt aufgehoben. Während mTORC1 mittels Phosphorylierung die 40S ribosomalen S6 Kinase 1 (S6K1) aktiviert sowie den Repressor der mRNA-Translation eukaryotic initiation factor 4E-binding protein (4E-BP1) inhibiert und darüber seinen Einfluss auf die Protein- und Lipidsynthese und die Regulation von Zellzyklus, Zellwachstum, Proliferation und Angiogenese entfaltet (Laplante und Sabatini 2012; Wullschleger et al. 2006), sind die vielfältigen Funktionen von mTORC2 noch nicht vollständig geklärt. Jedoch ist bekannt, dass mTORC2 über eine Phosphorylierung von Akt an Ser473 zu dessen voller katalytischer Aktivität beiträgt (Alessi et al. 1997; Chan et al. 1999; Sarbassov et al. 2005). Um eine überschießende Aktivierung des Signalwegs durch stimulierende Reize zu vermeiden, bestehen neben der PTEN-vermittelten Terminierung der Kaskade mehrere negative Feedbackmechanismen. Zum einen nimmt mTORC1 via S6K1 hemmenden Einfluss auf die oben erwähnten PI3K-mobilisierenden Adaptermoleküle und damit den Beginn der Signaltransduktion (O'Reilly et al. 2006), zum anderen beendet es die Akt-Aktivität über einen Regulierungsmechanismus von mTORC2 (Sarbassov et al. 2005).

1.3.1 Bedeutung für die Mammakarzinomsubtypen

Bereits in den 1980er Jahren wurde ein Zusammenhang zwischen dem PI3K/Akt/mTOR-Signalweg und dem Potential der malignen Entartung am Beispiel viraler Onkoproteine beschrieben (Sugimoto et al. 1984; Whitman et al. 1985). Seither wurde eine Vielzahl von Neoplasien auf Dysregulationen der verschiedenen Komponenten untersucht, deren nachfolgend beschriebenen Resultate die Bedeutsamkeit des Signalwegs unterstreichen.

PIK3CA, das für die katalytische Untereinheit p110α der PI3K kodierende Gen, stellt das generell am häufigsten veränderte Protoonkogen dar und führt aufgrund von somatischen Mutationen oder Amplifikationen in vielen hämatologischen und soliden Malignomen zur konstitutiven Aktivierung seines Genprodukts (Huang et al. 2007; Markman et al. 2010b; Schmidt-Kittler et al. 2010; Workman und Clarke 2012). Diese Erkenntnis stellt oftmals ein Problem in der Behandlung von Krebserkrankungen dar, da eine dauerhafte Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs mit Resistenzen gegen diverse Chemo- und Targettherapeutika einhergeht (Coughlin et al. 2010).

Im Rahmen des multizentrischen *Cancer Genome Atlas*-Programms konnten somatische Mutationen der PIK3CA, deren Großteil sich besonders auf die Exone 9

1 Einleitung

und 20 des Gens konzentrieren (Board et al. 2008; Samuels et al. 2004), in mehr als einem Drittel der untersuchten Mammakarzinome nachgewiesen werden (Cancer Genome Atlas Network 2012; Martínez-Sáez et al. 2020). Dabei variierte die Prävalenz deutlich zwischen den einzelnen Subtypen. Für Hormonrezeptor-positive Brustkrebsformen wurde die Häufigkeit mit 42% angegeben, während 31% der *HER2/neu*angereicherten, aber lediglich 16% der *triple*-negativen Mammakarzinome von der Mutation betroffen waren (Martínez-Sáez et al. 2020). Das Auftreten von PIK3CA-Veränderungen sowie diverser anderer Dysregulationen der an der Signalkaskade beteiligten Enzyme wirkt sich allerdings nicht gleichermaßen auf die verschiedenen Subtypen hinsichtlich des Therapieansprechens, des Erwerbs von Resistenzen gegen Standardtherapeutika und der Prognose aus.

Eine konstitutive Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs wurde bereits in experimentellen Studien anhand Hormonrezeptor-positiver Mammakarzinomzelllinien mit einer Resistenz gegenüber endokrinen Therapeutika in Zusammenhang gebracht (Boulay et al. 2005; Massarweh et al. 2008). Diese Beobachtung ließ sich durch die Anwendung von Inhibitoren der Kaskade aufheben (Miller et al. 2010). Während eine in frühen Mammakarzinomen nachgewiesene PIK3CA-Mutation insgesamt mit einem besseren Rezidiv- (Pang et al. 2014) und Krankheits-freien Überleben (Liu et al. 2014b) assoziiert ist, scheint die Veränderung in metastierten Hormonrezeptor-positiven Brustkrebserkrankungen mit einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und einer schlechten Prognose in Verbindung zu stehen (Mosele et al. 2020).

Seit der Einführung von monoklonalen Antikörpern und Tyrosinkinaseinhibitoren, die sich gegen *HER2/neu*-Rezeptoren richten, hat sich der einst schlechte prognostische Vorhersagewert deutlich ins Gegenteil verkehrt, jedoch entwickeln die meisten Betroffenen mit fortgeschrittenen *HER2/neu*-positiven Mammakarzinomen im Verlauf ihrer Erkrankungen Resistenzen gegen diese Pharmaka (Cameron et al. 2008; Cobleigh et al. 1999). Diverse *in vitro*-Studien belegen, dass dies mit einer pathologischen Aktivierung der PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade, unter anderem durch PIK3CA-Mutationen, in Verbindung gebracht werden kann (Bedard et al. 2009; Berns et al. 2007; Eichhorn et al. 2008; Kataoka et al. 2010). Diese experimentellen Ergebnisse wurden auch durch klinische Arbeiten, in denen sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem refraktären Ansprechen auf die Targettherapeutika Trastuzumab und/ oder Lapatinib und der konstitutiven Aktivierung des Signalwegs

ergab, bestätigt (Chandarlapaty et al. 2012; Nagata et al. 2004; Razis et al. 2011; Wang et al. 2011). Zusammenfassend korreliert das Vorhandensein von PIK3CA-Mutationen in diesem Mammakarzinomsubtyp mit einer hochsignifikant schlechteren Prognose, was in Anbetracht der Häufigkeit seines Auftretens als potenzieller neuer Biomarker dienen könnte (Baselga et al. 2014).

Angesichts der vergleichsweise niedrigen Prävalenz von PIK3CA-Mutationen im *triple*negativen Brustkrebs, das in 80% der Fälle von Dysregulationen des Tumorsuppressors p53 betroffen ist, scheint das schlechte Outcome nicht mit einer Aktivierung des Signalwegs in Verbindung zu stehen (Cancer Genome Atlas Network 2012). Allerdings konnte in einer Analyse gezeigt werden, dass sich diese Form in weitere 6 Subtypen klassifizieren lässt und ein Teil dieser im experimentellen Setting durch pharmakologische Blockierung der Kaskade signifikant am Wachstum gehemmt werden kann (Lehmann et al. 2011). Die oben beschriebene PIK3CA-assoziierte Resistenz gegenüber den Chemotherapeutika, deren Anwendung noch die hauptsächliche medikamentöse Behandlungsoption für Betroffene des *triple*-negativen Mammakarzinoms darstellt, konnte bereits in präklinischen Studien mittels Blockierung von PI3K und mTOR durchbrochen werden (Beuvink et al. 2005; Hu et al. 2002; Wallin et al. 2010).

1.3.2 Inhibitoren des Signalwegs

Die Grundlage der personalisierten Medizin ist die Identifikation von Biomarkern und deren prognostischen und prädiktiven Werts, um gezielte Angriffspunkte für die Neuentwicklung von Medikamenten zu schaffen. Zu den Vorreitern in der sogenannten Targettherapie zählen Substanzen, die an in Zahl oder Struktur veränderten Rezeptoren, insbesondere RTK, angreifen und der betroffenen Zelle somit den Stimulus entziehen. Aufgrund der Vielzahl von Aberrationen der Enzyme des nachgeschalteten PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs, die, wie in 1.3.1 beschrieben, in maligne Prozesse involviert ist, ist in den letzten Jahren auf diesem Gebiet eine ständige Weiterentwicklung zu verzeichnen.

1.3.2.1 mTOR-Inhibitoren

Die Muttersubstanz der mTOR-Inhibitoren ist Rapamycin, ein Makrolidantibiotikum, das aus dem Pilz Streptomyces hygroscopicus extrahiert wurde (Sehgal et al. 1975). Über das FKBP12-Bindeprotein von mTOR übt es einen hemmenden Einfluss auf mTORC1 und den diesem nachgeschalteten Funktionen aus (Chen et al. 1995; Choi et al. 1996; Harding et al. 1989). Dies resultiert in einem reduzierten Zellwachstum, einer vermindertem Proliferation sowie einem Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus (Schmelzle und Hall 2000). Im Gegensatz dazu scheint mTORC2 unempfindlich auf die gängigen mTOR-Inhibitoren zu reagieren (Dowling et al. 2010). Aufgrund der immunsuppressiven und antiproliferativen Wirkung auf B- und T-Zellen von Rapamycin und dessen synthetischer Derivate, den sogenannten Rapalogen, stellte es lange Zeit seinen Haupteinsatzbereich in der Transplantationsmedizin zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen dar. Die Aufdeckung der komplexen Signalnetzwerke, in denen mTOR bzw. mTORC1 mitwirken, und dem daraus resultierenden therapeutischen Potential seiner Inhibitoren führten jedoch auch zu Untersuchungen in der Hämatologie und Onkologie, obwohl eine Dysregulation von mTOR per se nicht mit Karzinogenese assoziiert ist.

Inzwischen sind verschiedene Rapaloge wie Everolimus (RAD001, Novartis), Temsirolimus und Ridaforolimus anhand von präklinischen und klinischen Studien zur Behandlung diverser fortgeschrittener solider und auch hämatologischer Krebserkrankungen, die oft refraktär auf Erstlinienchemotherapeutika ansprechen (Wander et al. 2011), untersucht und für unterschiedliche Indikationen zugelassen worden (Lee et al. 2015).

Die Wirkung von RAD001, ein oral bioverfügbarer, allosterischer mTORC1spezifischer Inhibitor (Leung et al. 2015), wurde vor allem im Rahmen der klinischen BOLERO-Studien (*breast cancer trials of oral everolimus*) an unterschiedlichen Brustkrebstypen evaluiert. Eine Zwischenbilanz von BOLERO-2 belegte, dass das progressionsfreie Überleben von postmenopausalen Patientinnen mit einem fortgeschrittenen Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinom, das unter der Vorbehandlung mit nicht-steroidalen Aromataseinhibitoren eine Progression zeigte, durch die zusätzliche Applikation von Everolimus statistisch hochsignifikant und klinisch relevant verlängert werden konnte (Baselga et al. 2012). Dieses Ergebnis führte schon vor Beendigung der Studie zur EU-Zulassung für diese Indikation. Derzeit

wird außerdem im Rahmen von Phase II-Studien untersucht, inwieweit sich RAD001 als Erstlinientherapie in Kombination mit antiöstrogenen Präparaten in der Behandlung von ebenfalls fortgeschrittenem Hormonrezeptor-positiven Brustkrebs eignet (Sobhani et al. 2018).

Weitere BOLERO-Studien konzentrierten sich auf den Effekt von RAD001 auf die Prognose des fortgeschrittenen *HER2/neu*-überexprimierenden Mammakarzinoms. Als Erstlinienkombinationstherapeutikum konnte für Everolimus bisher keine signifikante Auswirkung auf das krankheitsfreie Überleben nachgewiesen werden (Hurvitz et al. 2013; Hurvitz et al. 2015), wohingegen die Kombination mit Vinorelbin und Trastuzumab bei vorbehandeltem, Targettherapie-resistenten Brustkrebs mit einer PIK3CA-Mutation deutlich prognoseverbessernd war (André et al. 2014; O'Regan et al. 2013).

1.3.2.2 PI3K-Inhibitoren

Die erste Generation von PI3K-Inhibitoren stellt das 1957 erstmals isolierte Wortmannin aus Penicillium wortmannii dar, das an alle Isoformen der Klasse-I-PI3K bindet und folglich als "Pan-Inhibitor" bezeichnet wird. Powis et al. zeigten erstmals, dass durch die Anwendung von Wortmannin das Wachstum diverser Zelllinien eingeschränkt werden kann (Powis et al. 1995). Zusammen mit der Substanz eignete es sich besonders zur experimentellen Analyse LY294002 des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs, konnte sich zur therapeutischen Anwendung aufgrund seiner schlechten Pharmakokinetik und Selektivität jedoch nicht durchsetzen. Neuere Pan-Inhibitoren mit verbesserten pharmakologischen Eigenschaften und verringerter Toxizität finden sich in prä- und innerklinischen Studien zur Behandlung unterschiedlichster Tumorentitäten (Martini et al. 2013). Aufbauend auf deren Ergebnissen sowie der Identifikation der verschiedenen katalytischen Domänen entstanden Inhibitoren der zweiten Generation wie bspw. Alpelisib und Taselisib, die eine α-Isoform-spezifische Aktivität aufweisen, d. h. selektiv die unterschiedlichen Untereinheiten hemmen, und sich ebenfalls bereits in klinischer Erprobung befinden (Martini et al. 2013).

Buparlisib (BKM120, Novartis) gehört zur Gruppe der Pyrimidinderivate und ist ein selektiver Inhibitor aller vier Isoformen der Klasse-I-PI3K, ein sogenannter Pan-PI3K-Inhibitor (vgl. 1.3). Aufgrund der Vielzahl von Tumoren, die mit einer Aberration der

PI3K-Signalkaskade assoziiert sind, steht es seit längerer Zeit im Fokus vieler Publikationen. In *in-vitro*-Experimenten mit unterschiedlichsten Tumorzelllinien und im Rahmen von Tierversuchen zeigte sich die Substanz bereits als nebenwirkungsarmes Medikament, das das Wachstum maligner Zellen effektiv einschränkt und deutlich überlebensverlängernd zu sein scheint (Blazquez et al. 2018; Brana und Siu 2012).

Im Rahmen von ersten klinischen Studien wurde kürzlich überprüft, inwieweit sich die Substanz als Kombinationstherapeutikum in der Behandlung von unterschiedlichen Brustkrebsformen eignet. Die placebokontrollierten **BELLE-Phase-III-Studien** (buparlisib breast cancer clinical evolution) konzentrierten sich hierbei auf therapierefraktäre, lokal fortgeschrittene oder metastasierte Hormonrezeptor-positive, HER2/neu-negative Mammakarzinome, welche nach Vorbehandlung mit Aromataserespektive Everolimus eine Progression zeigten. Die Ergebnisse von BELLE-2 und BELLE-3 belegten eine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens in der Interventionsgruppe, insbesondere in der PIK3CA-mutierten Kohorte (Baselga et al. 2017; Di Leo et al. 2015). Die Phase-II-Studie NeoPHOEBE (neoadjuvant PI3K inhibition in HER2 overexpressing breast cancer) schloss Betroffene von primärem HER2/neu-überexprimierenden Brustkrebs ein und untersuchte Effekte von BKM120 in Kombination mit einer Taxan-Trastuzumab basierten neoadjuvanten Therapie. Die Studie wurde aufgrund des nicht erreichten Endpunkts und der z.T. hochsignifikant erhöhten Toxizität frühzeitig beendet (Loibl et al. 2015).

Dennoch sind diese neuen Substanzen prinzipiell erfolgversprechend. Das Interesse an der Entwicklung und Erprobung immer gezielterer Targettherapeutika ist immens, jedoch ist die genaue Wirkungsweise der Präparate letztlich nicht geklärt.

1.3.3 Makrophagen als potenzielles Therapieziel

Die progressionsfördernden Eigenschaften sowohl von TAM als auch von residenten Makrophagen machen diese zu attraktiven Angriffspunkten in der Behandlung von lokalisierten und auch fortgeschrittenen Krebserkrankungen. Auf Grundlage der in dieser Arbeit beschriebenen Mechanismen ist dabei, neben der zu nebenwirkungsträchtigen ungezielten Depletion von Makrophagen, die medikamentöse Konversion von sowohl bereits mobilisierten als auch residenten proinvasiven M2- in tumorizide M1-Makrophagen denkbar.

Die Frage, wodurch ein Wechsel zwischen diesen Phänotypen bewirkt werden kann und ob diese Plastizität auch im speziellen Mikromilieu eines Tumors vorhanden ist, ist noch weitestgehend unbeantwortet. In murinen in vitro-Experimenten wurde erstmals demonstriert, dass durch einfache Exposition mit den entsprechenden Zytokinen (siehe 1.2.2) die jeweiligen Makrophagenphänotypen induziert werden können und dieses Phänomen durch Änderung des Zytokinmilieus reversibel ist (Stout et al. 2005). Dieses Ergebnis lieferte die Basis für weitere Untersuchungen in Anwesenheit von malignen Zellen. Coscia et al. zeigten, dass über eine Repolarisierung von M2-artigen TAM zu M1-Makrophagen durch das Bisphosphonat Zoledronsäure, welches unter anderem zur Behandlung von Knochenmetastasen eingesetzt wird, die Karzinogenese von Brustkrebszelllinien gehemmt wird (Coscia et al. 2010). Zusätzlich konnte durch die Applikation dieses Pharmakons die in 1.2.3 beschriebene assistierte Invasion von Mammakarzinomzellen durch Mikroglia blockiert werden (Rietkötter et al. 2013), wobei offen bleibt, ob dieses Ergebnis auch tatsächlich auf einem Wechsel der Phänotypen beruht. Erste klinische Studien mit Ovarialkarzinom-Patientinnen, die einen Antikörper gegen das M2-induzierende IL-6 mit dem Ziel, Makrophagen zu einer M1-Antwort zu polarisieren, erhielten, erbrachten bislang nur eine schwache Wirksamkeit (Coward et al. 2011; Rossi et al. 2015).

Nach neueren Erkenntnissen spielt der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg in Zellen des angeborenen Immunsystems eine wesentliche Rolle in der Koordination von Abwehrmechanismen. Durch aktivierende Stimuli werden hierüber die unterschiedlichen Zelltypen auf vielfältige Weise hin zur gesteigerten Immunantwort moduliert (Weichhart und Säemann 2008). In monozytären Zellen wirkt eine Aktivierung der Signalkaskade, die vor allem über TLR-2 und -4 vermittelt wird (Arbibe et al. 2000; Jones et al. 2001), allerdings einer durch Pathogene ausgelösten zu überschießenden Immunantwort entgegen. Im Rahmen einer Art physiologischen Sicherheitsmechanismus wird dabei die Produktion proinflammatorischer Mediatoren wie IL-10 gebremst und eine Hochregulation von IL-12 bewirkt (Aksoy et al. 2005; Fukao et al. 2002; Guha und Mackman 2002). Auch die Ergebnisse weiterer Arbeitsgruppen zeigen, dass die Polarisierung aktivierter Makrophagen und die dadurch bedingte Ausschüttung von Zytokinen bzw. die Zusammensetzung des durch diese induzierten Milieus über den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg reguliert werden und eine Aktivierung der Kaskade mit der Induktion des proinvasiven M2-artigen Makrophagenphänotyps in Verbindung steht (Byles et al. 2013; Rocher und Singla

2013; Weichhart und Säemann 2009; Zhou et al. 2014). Um die proinvasiven Funktionen von Makrophagen wissend (s. 1.2.2), scheint sich durch die medikamentöse Blockierung von Mitgliedern des Signalwegs mit o. g. Substanzen eine interessante Behandlungsoption zu ergeben.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Inhibitoren des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs erfahren große Aufmerksamkeit nicht nur in der experimentellen Wissenschaft, sondern inzwischen auch im klinischen Alltag. Jedoch konzentriert sich dabei ein Großteil der gegenwärtigen Forschung auf die Wirkung der neuen Substanzen in den Tumorzellen selbst und versucht, durch ständige Weiterentwicklung immer gezieltere Therapeutika zu erproben. Die in 1.2.2 und 1.2.3 beschriebenen progressionsfördernden Eigenschaften von Makrophagen an verschiedenen Punkten der Metastasierungskaskade liefern allerdings Beweise dafür, dass die ausschließliche Betrachtung der malignen Zellen für die erfolgreiche Behandlung von Krebserkrankungen nicht genügt und die Manipulation der Immunzellen ein hohes therapeutisches Potential sowohl in lokalisierten als auch fortgeschrittenen Malignomen birgt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob Inhibitoren des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs die proinvasiven Funktionen von Makrophagen in Ko-Kultur mit unterschiedlichen Brustkrebszellen unterdrücken können. Hierfür wurden folgende Fragen formuliert:

- 1. Welche Mammakarzinomsubtypen sind sensibel bzw. resistent auf die Anwendung der Inhibitoren?
- 2. Wie wirken die Inhibitoren auf unterschiedliche Makrophagenspezies?
- 3. Können die Substanzen die Makrophagen-induzierte Invasivitätssteigerung von Mammakarzinomzellen einschränken?

Dazu sollte zunächst die Charakterisierung des PI3K-Inhibitors BKM120 und des mTOR-Inhibitors RAD001 hinsichtlich Toxizität und Proliferationseinschränkung anhand von Zelllinien der unterschiedlichen Mammakarzinomsubtypen sowie humanen Makrophagen, murinen *bone marrow derived macrophages* (BMDM) und Mikroglia erfolgen. Ziel sollte es sein, Konzentrationen der Substanzen zu ermitteln, die zwar einen hemmenden Einfluss auf die Makrophagen haben, jedoch keine zytotoxische Wirkung auf die Mammakarzinomzellen selbst ausüben. Nach

Ausschluss toxischer Dosisbereiche sollte die suffiziente Hemmung der PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade auf Proteinebene untersucht werden. Schließlich sollte in Ko-Kulturversuchen die Auswirkung der Inhibitoren auf die Makrophagenvermittelte Steigerung der Invasivität eruiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zelllinien

Tab. 2.1: Zelllinien

Name	Spezies	Merkmal	Herkunft
MCF7	humanes Mamma- adenokarzinom	Hormonrezeptor- positiv	DSMZ, Braunschweig
MDA-MB-231	humanes Mamma- adenokarzinom	<i>triple</i> -negativ	ATCC, Wesel
SK-BR-3	humanes Mamma- adenokarzinom	<i>HER2/neu</i> -positiv	ATCC, Wesel
410.4	murines Mamma- adenokarzinom aus BALB/c-Mausstamm		Prof. F. Balkwill, London, UK
L929	murine Fibroblasten aus C3H/An- Mausstamm		Prof. UK. Hanisch, Göttingen

Alle Zelllinien wurden im Inkubator bei 37 °C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer Luftfeuchtigkeit von 90 % kultiviert.

2.1.2 Primärkulturen

2.1.2.1 Humanes Material

Buffy coats aus den Vollblutspenden des jeweiligen Vortags gesunder Blutspender sowie humanes hitzeinaktiviertes AB-Serum für das Kulturmedium wurden freundlicherweise von der Abteilung für Transfusionsmedizin der Universitätsmedizin Göttingen zur Verfügung gestellt.

2.1.2.2 Mausstämme

Mäuse vom NMRI-Stamm wurden von der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen und der Firma Charles River (Hannover) bezogen. Die Haltung erfolgte entsprechend der Standardbedingungen in einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus. Bei der Gewinnung von BMDM und Mikroglia handelt es sich um Tiertötung mit Organentnahme, was dem Tierschutzbeauftragten der Universität Göttingen mitgeteilt und durch ihn bewilligt wurde.

2.1.3 Medien und Zellkulturzusätze

Produkt	Firma	
Accutase	Sigma-Aldrich, München	
DMEM	Biochrom, Berlin	
ECM (extracellular matrix)	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt	
FCS (fetal calf serum)	Sigma-Aldrich, München	
Ficoll/Biocoll-Lösung	Biochrom, Berlin	
L-Glutamin	Biochrom, Berlin	
Lipopolysaccharid	Enzo Life Sciences (Alexis), Lörrach	
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, München	
NHS (normal horse serum)	Invitrogen, Darmstadt	
PBS	Gibco, Karlsruhe	
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom, Berlin	
Percoll	GE Healthcare, Freiburg	
RPMI 1640	PAA, Cölbe	
Trypsin-EDTA (10×)	Biochrom, Berlin	

Die Medien und Zellkulturzusätze wurden nach Herstellerangaben gelagert.

2.1.4 Antikörper

Name	Verdünnung	Firma
Primärantikörper		
Akt	1:1000	100-401-401S, Rockland, Gilbertsville, USA
Phospho-Akt (Ser473)	1:1000	#9271, Cell Signaling, Frankfurt a. M.
S6 ribosomal protein (5G10)	1:6000	#2217, Cell Signaling, Frankfurt a. M.
Phospho-S6 ribosomal protein (Ser235/236)	1:6000	#2211, Cell Signaling, Frankfurt a. M.
Sekundärantikörper		
goat anti-rabbit IgG-HRP	1:6000	sc-2004, Santa Cruz, Heidelberg

Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in TBS + 0,1% Tween + 5% BSA.

2.1.5 Testsubstanzen

Pulverförmige Proben der Inhibitoren RAD001 und BKM120 wurden von der Firma Novartis (Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt, auf 10 nM Stocklösungen in DMSO gelöst und bei -20°C gelagert.

2.1.6 Chemikalien

Alle angegebenen Chemikalien wurden, sofern nachfolgend nicht anders angegeben, von der Firma Sigma, München bezogen.

rhM-CSF

ImmunoTools, Friesoythe

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2.4: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Firma
6-well-Zellkulturschalen	Nunc, Langenselbold
10 cm Petrischalen (unbeschichtet)	Sarstedt, Nümbrecht
10 cm Zellkulturpetrischalen (beschichtet)	Nunc, Langenselbold
24-well-Zellkulturschalen	Becton Dickinson, Heidelberg
96-well-Zellkulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht
Auslaufpipetten (5 / 10 / 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalspritzen (2 / 50 ml)	Braun, Melsungen
Falcon-Tubes (15 / 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
FEP Teflon-beschichtete Zellkulturbeutel	CellGenix, Freiburg
Mikroliterpipetten (10 / 100 / 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (0,5 / 1,5 / 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen (25 / 75 / 175 cm²)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.8 Geräte

Gerät	Firma	
Autoklav Varioklav	Thermo Scientific, Bonn	
CO ₂ -Inkubator CB150	Binder, Tuttlingen	
Magnetrührer REO basic C	IAK Werk, Staufen	
Mikroskop Telaval 31	Zeiss, Göttingen	
Plattenphotometer "Sunrise"	Tecan, Männedorf, Schweiz	
Power Pack P25	Biometra, Göttingen	
Sicherheitswerkbank UVF 6.12S	BDK, Sonnenbühl-Genkingen	
Thermomixer 5437	Eppendorf, Hamburg	
Vortexer Genius 3	IKA Labortechnik, Staufen	
Wasserbad	Köttermann, Uetze, Hänigsen	
Wasservollentsalzungsanlage	Millipore, Schwalbach	
xCELLigence RTCA DP-System	Roche, Mannheim	
Zählkammer Neubauer Improved	LO Laboroptik, Friedrichsdorf	
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg	
Zentrifuge 1-15K	Sigma, München	
Zentrifuge Universal 30RF	Hettich, Tuttlingen	
Zentrifuge Multifuge 3 L-R Heraeus	Thermo Scientific, Bonn	

Tab. 2.5 Geräte

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturmethoden

Die Arbeit mit Zelllinien und Primärkulturen erfolgte ausschließlich an einer Sicherheitswerkbank Stufe II unter sterilen Bedingungen. Die verwendeten Materialien wurden entweder vor Gebrauch autoklaviert oder steril verpackt vom Händler bezogen.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte je nach Zelllinie mit den Zellkulturmedien RPMI 1640 oder DMEM mit den für den jeweiligen Typ empfohlenen hitzeinaktivierten oder sterilfiltrierten Zusätzen in den entsprechenden Konzentrationen. Diese wurden in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² im Inkubator bei 37°C, einem CO₂-Gehalt von 5% und einer Luftfeuchtigkeit von 90% aufbewahrt.

Sobald die adhärenten Zellen eine Konfluenz von 70 – 80% erlangten, wurden sie im Verhältnis 1:10 gesplittet oder in definierten Dichten für die verschiedenen Versuche ausgesät. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen einmalig mit PBS gespült, um zweiwertige Kationen, die die Wirksamkeit von Trypsin inaktivieren, zu entfernen. Nach Zugabe von 1 ml 1× Trypsin-EDTA-Lösung und einer Inkubationszeit von 5 – 10 min bei 37°C lösten sich die Zellen von der Bodenfläche und wurden durch Zugabe des Kulturmediums in Suspension genommen. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellkonzentration durch Mittelung der gezählten Zellen in vier definierten Volumina von je 0,1 mm³ in der Neubauer-Zählkammer.

2.2.2 Gewinnung der Primärkulturen

2.2.2.1 Isolation von Monozyten aus dem peripheren Blut

Nach der Extraktion von Erythrozyten- und Blutplasmakonzentraten aus Vollblutspenden verbleibt der sogenannte *buffy coat*. Dieser besteht neben Resten von Erythrozyten zum Großteil aus Thrombo- und Leukozyten. Die Isolation von monozytären Zellen erfolgt mittels der Aufreinigung über zwei Dichtegradienten nach der Methode von (Seager Danciger et al. 2004) modifiziert durch (Menck et al. 2014).

Zunächst wurden die Proben in 50 ml-Tubes im 1:1-Verhältnis mit einer PBS-EDTA-Mischung versetzt und 30 ml dieser Suspension vorsichtig auf 15 ml Ficoll/Biocoll-Lösung geschichtet. Nach einer Zentrifugation über 20 min bei 400×g ohne Bremse demaskierte sich ein gut abgegrenzter weißer Interphasenring aus Lympho- und Monozyten. Dieser wurde durch vorsichtiges Abpipettieren isoliert und erneut im Verhältnis 1:1 mit PBS-EDTA-Mischung versehen. Um die noch vorhandenen Thrombozyten zu depletieren, erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 400×g und das Absaugen des gebildeten Überstandes. Das Pellet wurde anschließend wiederum im selben Verhältnis mit dem PBS-EDTA-Gemisch gewaschen und für 10 min bei 300×g zentrifugiert. Nach dem Pooling der Pellets desselben buffy coats und Aufnahme in 20 ml RPMI 1640 ohne Phenolrot wurde die Suspension auf 25 ml einer 46% iso-osmotischen Percoll-Lösung vorsichtig geschichtet. Im Anschluss an eine erneute Zentrifugation für 30 min bei 550×g ohne Bremse zeigte sich wiederholt ein Interphasenring, welcher mit einer Pasteurpipette isoliert, im 1:1-Verhältnis mit PBS-EDTA-Gemisch versetzt und für 10 min bei 400×g zentrifugiert wurde. Die entstandenen, aus Monozyten bestehenden Pellets konnten schließlich in 20 ml RPMI 1640 + 10% FCS resuspendiert und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt werden. 30 bis 50×10⁶ Zellen wurden im letzten Schritt in den Teflonbeschichteten Zellkulturbeuteln "VueLife Cell Culture Bags" (Immuno Tools, Friesoythe) in einem speziellen Kulturmedium (s.u.) ausgesät und für 7 Tage bei Standardbedingungen im Inkubator gelagert. Mittels Zugabe von 2,5 ng/ml rhM-CSF wurde die Differenzierung der Monozyten in Makrophagen unterstützt.

Kulturmedium: RPMI 1640 2% AB-Serum (hitzeinaktiviert) 1% Penicillin / Streptomycin rhM-CSF (2,5 ng/ml)

Zur Kultivierung der differenzierten Makrophagen wurden die Beutel anschließend für 1 h auf Eis gelegt, durch vorsichtigen manuellen Druck gelöst und in RPMI 1640 + 1% FCS aufgenommen. Nach Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer wurden die gewonnenen Makrophagen für die verschiedenen Versuche ausgesät.

2.2.2.2 Isolation von Knochenmarksmakrophagen aus der Maus

Zur Gewinnung von Knochenmarksmakrophagen (BMDM, *bone marrow derived macrophages*), wie sie mit leichten Abweichungen von (Reiling et al. 2001) beschrieben wurde, wurden die Femores und Tibiae von 8 bis 12 Wochen alten NMRI-Mäusen entnommen und von verbleibenden Muskelresten befreit. Nach gründlicher
Desinfektion wurden unter sterilen Bedingungen die Enden der Knochen entfernt und das Knochenmark mit einer Insulinkanüle G 24 (Braun, Melsungen) mit 10 ml Differenzierungsmedium herausgespült, resuspendiert und in eine beschichtete Petrischale aufgenommen. Nach der Kultivierung über Nacht bei 37°C und 5% CO2 erfolgten die Trennung der BMDM von den Fibroblasten durch Aufnahme des Kulturmediums, in dem sich überwiegend die nicht-adhärierten BMDM befanden, und Zentrifugation bei 2000×g für 10 min. Anschließend wurde das Pellet in 40 ml Differenzierungsmedium aufgenommen, gründlich resuspendiert und auf vier unbeschichtete Zellkulturpetrischalen verteilt. Nach drei Tagen im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ erhielten die Zellen 10 ml frisches Medium und wurden für drei weitere Tage unter Zellkulturbedingungen aufbewahrt. Im Vorfeld der verschiedenen Versuchsansätze wurde zunächst das Medium entfernt, die BMDM mit Hilfe von Accutase-Lösung von den Petrischalen gelöst und nach Resuspendierung in Medium bei 2000×g für 10 min zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde schließlich in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und die Zellsuspension nach erfolgter Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer für die unterschiedlichen Versuche ausgesät.

Differenzierungsmedium: DMEM

Kulturmediu

0		
	L-Glutamin	2 mM
	FCS	10%
	L929 konditioniertes Medium	30%
	NHS	5%
	Natriumpyruvat-Lösung	0,01 mM
	β-Mercaptoethanol	0,05 mM
	Penicillin	100 U/ml
	Streptomycin	100 mg/ml
m:	DMEM	
	L-Glutamin	2 mM
	FCS	10%
	L929 konditioniertes Medium	15%

Zur Herstellung des konditionierten Mediums der Fibroblastenzelllinie L929 wurden 10×10^6 Zellen in 100 ml DMEM + 10% FCS ausgesät und für sieben Tage unter Standardbedingungen kultiviert. Anschließend wurde das Medium mit Hilfe eines 0,22 μ M Steritop-Filters (Millipore, Darmstadt) sterilfiltriert und bei -20°C aliquotiert aufbewahrt.

2.2.2.3 Isolation von Mikroglia aus der Maus

Mikrogliazellen wurden von der Arbeitsgruppe von Uwe-Karsten Hanisch aus der Abteilung für Neuropathologie der Universitätsmedizin Göttingen zur Verfügung gestellt und nach dem Schema von (Giulian und Baker 1986) modifiziert nach (Regen et al. 2011) isoliert.

Dazu wurden die Gehirne von neugeborenen NMRI-Mäusen entfernt und vom umliegenden Gewebe befreit. Nach Auflösen des Präparats in 2,5% Trypsin-EDTA-Lösung durch 10-minütiges Schütteln bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,4 mg/ml DNase (Cell Systems, Troisdorf) gestoppt. Anschließend wurde die Suspension für 10 min bei 4°C zentrifugiert, die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und in mit Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich, München) beschichteten Zellkulturflaschen für 14 Tage im Inkubator kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte täglich. Die Trennung der Mikrogliazellen von den Astrozyten erfolgte durch erneutes Schütteln aufgrund des unterschiedlichen Adhäsionsverhaltens der Zellen. Nach Zählung, Aussaat für die verschiedenen Versuchsansätze und Adhärenz für 24 h wurden die Experimente gestartet.

Kulturmedium: DMEM + 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin

2.2.3 Bestimmung von Viabilität und Proliferation

2.2.3.1 MTT-Assay

2.2.3.1.1 Reagenzien

MTT-Stammlösung:	5 mg/ml 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-						
	diphenytetrazoliumbromid, Sigma-Aldrich, München						
MTT-Lysepuffer:	5% Ameisensäure, 63% Isopropanol, 32% DMSO						

2.2.3.1.2 Durchführung

Die Viabilität der unterschiedlichen Brustkrebszellen, humanen Makrophagen sowie BMDM wurde mithilfe des MTT-Tests nach (Mosmann 1983) bestimmt. Dabei wird von vitalen Zellen durch enzymatische Reduktion im endoplasmatischen Retikulum der gelbe Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenytetrazoliumbromid in ein blauviolettes Formazan umgesetzt.

Die Zellen wurden je nach Typ in einer Dichte von 5×10^4 bis $1,5 \times 10^5$ in 24-*well*-Platten in je 1 ml Kulturmedium ausgesät und in Triplikaten mit unterschiedlichen Konzentrationen der zu testenden Substanzen behandelt. Nach 96 h wurde eine 1:10verdünnte MTT-Stammlösung in dem jeweiligen Medium zugefügt und für weitere 4 h im Zellkulturschrank inkubiert. Anschließend erfolgten das Absaugen der Lösung, das Hinzufügen von 500 µl MTT-Lyselösung pro Vertiefung und die Überführung der lysierten Zellen wiederum in Dreifachansätzen in eine 96-*well*-Platte. Die Extinktionen wurden bei 540 nm in einem Plattenphotometer bestimmt. Die Mittelwerte der gemessenen Absorptionen, von denen jeweils der Leerwert der MTT-Lyselösung abgezogen wurde, wurden ins Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle gesetzt.

2.2.3.2 WST-1-Assay

2.2.3.2.1 Reagenzien

WST-1: 4-[3-(4-lodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3benzol-disulfonat, Roche, Mannheim

2.2.3.2.2 Durchführung

Dieser Test beruht auf der enzymatischen Umsetzung des Tetrazoliumsalzes WST-1 über die mitochondriale Succinyltetrazoliumreduktase vitaler Zellen in ein wasserunlösliches Formazan.

Hierfür wurden 1×10⁵ Mikrogliazellen in 1 ml Kulturmedium in 24-*well*-Platten ausgesät und am Folgetag in Dreifachansätzen mit aufsteigenden Konzentrationen der Inhibitoren behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 96 h wurde den Zellen frisches Medium mit 10% WST-1-Reagenz zugefügt und für weitere 3 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Überführung in Triplikaten in 96-*well*-Platten und die Messung des Farbumschlages im Plattenphotometer bei 450 nm und einem Referenzfilter von 655 nm.

2.2.3.3 xCELLigence

Das "xCELLigence RTCA DP-System" kann Aussagen über Adhäsion, Proliferation, Ausbreitung und Morphologie der zu analysierenden Zellen liefern. Es misst kontinuierlich die elektrische Impedanz, die mit der Anzahl und Stärke der Zellkontakte mit der mit Gold beschichteten Elektrode korreliert, und ermöglicht somit eine Echtzeit-Zellanalyse.

Für die 48-stündige Messung wurden die verschiedenen Zellen in den zum System gehörenden 16-*well*-Platten (E-Plate 16, Roche, Mannheim) in einer Dichte von 5×10^3 (410.4, BMDM) bis 1×10^4 (MCF7, humane Makrophagen) pro Vertiefung ausgesät und je Versuch in Viereransätzen mit 3 verschiedenen Konzentrationen der Substanzen behandelt. Die Auswertung erfolgte über die Mittelung der ausgegebenen Zellindices pro Bedingung bezogen auf eine unbehandelte Kontrolle.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Isolation von Gesamtproteinen

2.2.4.1.1 Reagenzien

RIPA-Puffer:	Tris		50	50 mM								
	NaCl		15	150 mM								
	SDS		0,1	0,1% (w/v)								
	Natriur	ndeoxycholat	0,5	0,5% (w/v)								
	Triton 2	X-100	1%	1% (v/v)								
Proteaseinhibitor:	100× Proteaseinhibitor Cocktail, Cell Signaling, Frankt M.											
Phosphataseinhibitor:	PhosS	TOP, Roche, M	annhei	m								
RIPA-Gebrauchslösung:	89% Protea	RIPA-Puffer, seinhibitor	10%	0% Phosphataseinhibitor,								

2.2.4.1.2 Durchführung

Zunächst wurden die 1×10⁶ in 6-*well*-Platten ausgesäten Zellen in den entsprechenden Medien über Nacht im Inkubator aufbewahrt, bevor sie für 4 h unter Serumentzug gesetzt wurden. Anschließend erfolgte die Vorinkubation mit den jeweiligen Konzentrationen der Inhibitoren über 2 h und die Stimulierung mit 1% FCS für 15 bzw. 60 min. Zur Isolation des Gesamtproteins wurde schließlich das Zellmedium abgesaugt und jede Vertiefung einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde pro *well* 30 µl der frisch angesetzten RIPA-Gebrauchslösung zugefügt und die Zelllyse durch sorgfältiges Abkratzen mithilfe eines Zellschabers unterstützt. Nach der Überführung der einzelnen Gemische in Eppendorf-Gefäße und einer Inkubation auf Eis für 30 min wurde das Lysat bei 4°C und 20.000×g für 5 min zentrifugiert und der gewonnene Überstand in ein neues Gefäß pipettiert. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

2.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Konzentration der isolierten Gesamtproteine wurde mithilfe des "DC Protein Assay Kit" (Biorad, München) durchgeführt. Die Methode beruht auf dem Lowry-Assay (Lowry et al. 1951), welcher zwei chemische Reaktionen beinhaltet. Im ersten Schritt entsteht ein blau-violetter Farbstoff zwischen Peptidbindungen und Cu²⁺ lonen im alkalischen Milieu. In einer zweiten Reaktion wird durch Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺-Ionen das gelbe Folin-Reagenz in Molybdänblau umgesetzt.

Die Proben wurden nach Herstellerangaben verdünnt und parallel zu einer BSA-Verdünnungsreihe mit den verschiedenen Komponenten des Kits versehen. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurden 150 µl pro Probe in Duplikaten in eine 96*well*-Platte überführt und die Extinktionen bei 750 nm in einem Plattenphotometer ermittelt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mithilfe der BSA-Standardkurve.

2.2.4.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

2.2.4.3.1 Reagenzien

Produkt	Reagenz	Menge					
Sammelgel (5%):	H ₂ O (bidest.)	3,45 ml					
	1,5 M Tris + 2% SDS (pH 6,8)	630 µl					
	Acrylamid/ Bisacrylamid 30%	830 µl					
	APS 10% (w/v)	50 µl					
	TEMED	5 μΙ					
Trenngel (12%):	H ₂ O (bidest.)	6,8 ml					
	1,5 M Tris + 10% SDS (pH 8,8)	5 ml					
	Acrylamid/ Bisacrylamid 30%	8 ml					
	APS 10% (w/v)	200 µl					
	TEMED	20 µl					
Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris	3 g					
	192 mM Glycin	14,4 g					
	0,1% (w/v) SDS	1 g					
	H ₂ O (bidest.)	ad 1 I					

Tab. 2.6 Reagenzien für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

2.2.4.3.2 Durchführung

Zur Auftrennung der Proteine aus den Gesamtlysaten wurden $20 - 30 \ \mu$ l je Probe mit dem 4× Probenpuffer Roti-Load 1 (Roth, Karlsruhe) versehen und zur Denaturierung für 5 min bei 95°C in einem Thermomixer erhitzt. In der Zwischenzeit wurde das 12%ige Trenngel gemäß o. g. Zusammensetzung gegossen und nach dessen vollständiger Aushärtung mit dem 5%igen Sammelgel überschichtet. Anschließend wurde das Gel in eine vertikale Minigel-Elektrophoresekammer (Biometra, Göttingen) eingespannt und mit dem Elektrophoresepuffer vollständig umgeben. Zur späteren Abschätzung der Größe der zu bestimmenden Proteine wurde neben den Proben 5 μ l eines Größenstandards (Precision Dual Color Protein Standard, Biorad, München) in eine Tasche des Gels pipettiert. Zur Fokussierung der Proben im Sammelgel wurde die Elektrophorese zunächst mit einer Spannung von 90 V gestartet. Die Auftrennung entsprechend den Molekülmassen der Proteine erfolgte schließlich bei 120 V bis zum vollständigen Durchlaufen des Probenpuffers.

2.2.4.4 Western Blot

2.2.4.4.1 Reagenzien

Transferpuffer:	25 mM Tris	1 g				
	192 mM G	14,4 g				
	Methanol	20%				
	H ₂ O (bides	ad 1 I				
Blocklösung:	TBS:	20 mM Tris	2,4 g			
		137 mM NaCl	8 g			
		H ₂ O (bidest.) pH 7,6	ad 1 I			
	0,1% (v/v)	1 ml				
	BSA	5% (w/v)				

2.2.4.4.2 Durchführung

Mit Hilfe des Western-Blot-Verfahrens können Proteine von einem Gel auf eine Trägermembran übertragen und über spezifische Antikörper identifiziert und quantifiziert werden (Towbin et al. 1979). Für das hier verwendete Semi-Dry-Blot-System wurden zunächst drei Filterpapiere (GB005 Whatman-Papier, Carl Roth, Karlsruhe) für 5 min im Transferpuffer äquilibriert und auf die Anode der Blotkammer (Biometra, Göttingen) gelegt. Auf diesen wurde die nach demselben Muster vorbereitete Nitrocellulosemembran Hybond-C Extra (Amersham Biosciences, Freiburg) platziert, bevor das Polyacrylamidgel und drei weitere in Puffer inkubierte Filterpapiere hinzugefügt wurden. Anschließend wurden Luftblasen durch Ausrollen mit einer Pipette entfernt und der Kathodenteil der Blotkammer aufgesetzt. Der Proteintransfer wurde über 75 min bei 10 V durchgeführt.

Um den Erfolg des Transfers zu überprüfen, wurden alle Proteine der Nitrocellulosemembran unter leichtem Schwenken mit Ponceau S-Lösung (Omnilab-Krannich, Göttingen) angefärbt und diese Membran zur Beladungskontrolle eingescannt. Durch kurzes Waschen in TBS + 0,1% Tween wurde der rote Farbstoff wieder entfernt. Zur Besetzung der freien Bindungsstellen auf der Blotmembran wurde diese für 1 h bei Raumtemperatur mit Blocklösung benetzt. Im Anschluss wurde der nach Herstellerangaben in Blocklösung verdünnte Primärantikörper auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C unter stetigem Schwenken inkubiert. Um

ungebundene Antikörper zu entfernen, erfolgten drei 5-minütige Waschschritte in TBS + 0,1% Tween, bevor die Membran mit dem Meerrettichperoxidase-konjugierten, ebenfalls in Blockpuffer verdünnten Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Schließlich wurde die Trägermembran erneut dreimal über jeweils 5 min in TBS + 0,1% Tween gewaschen. Der Nachweis der mit den Antikörpern markierten Proteine erfolgte mit Hilfe des Detektionsreagenzes ECL Prime (GE Healthcare, Freiburg), dessen Komponenten nach Herstellerangaben gemischt und für 5 min kontinuierlich über die Membran gegeben wurden. Die durch die HRP katalysierte Chemilumineszenzreaktion wurde nun nach einer Belichtungszeit von 10 bis 120 sec im LAS 4000 Imager (Fujifilm/ GE Healthcare, Freiburg) und mittels der ImageJ-Software anhand von drei biologischen Replikaten quantifiziert.

2.2.5 *In vitro*-Mikroinvasionsassay

2.2.5.1 Vorbemerkung

Zur Untersuchung der in vitro-Invasivität der Brustkrebszellen in Ko-Kultur mit Makrophagen wurden Mikroinvasionsassays in modifizierten Boyden-Kammern durchgeführt (s. Abb. 2.1) (Hagemann et al. 2004). Dazu wird eine Polycarbonatmembran (Nucleopore, Pleasanton, USA) mit einem definierten Porendurchmesser auf einer Glasplatte mit eiskaltem ECM-Gel in ¹/₃ serumfreien RPMI 1640 beschichtet. Nach 10 min wird die Membran auf die untere von zwei mit dem jeweiligen Zellkulturmedium befüllten 14-well-Platten gelegt. Anschließend wird die obere Platte aufgebracht und beide fest miteinander verschraubt Die hier verwendete Membran mit der Porengröße von 10 µm dient als künstliche Basalmembran, verhindert direkte Zell-Zell-Kontakte und ermöglicht lediglich ein Durchwandern von Zellen mittels aktiver Migration und dem Vorhandensein proteolytischer Aktivität.



Abb. 2.1: Schematischer Aufbau der modifizierten Boyden-Kammer

Makrophagen in Zellkultur-*Inserts* (a), Mammakarzinomzellen auf ECM-Gel (b), Polycarbonatmembran (c), invadierte Mammakarzinomzellen (d)

2.2.5.2 Durchführung

Die nach dem beschriebenen Schema zusammengebauten Kammern wurden für 1 h im Zellkulturschrank äquilibriert, bevor die Tumorzellen in einer Dichte von 1×10^5 pro Vertiefung in der oberen Platte ausgesät wurden. Anschließend wurde die Kammer erneut für 60 min im Inkubator aufbewahrt, um eine ausreichende Adhärenz der Zellen zu gewährleisten. In der Zwischenzeit wurden die vorbereiteten Makrophagen in speziellen Zellkultur-*Inserts* (Millicell Cell Culture Inserts, 12 mm, Millipore, Darmstadt) mit einem Porendurchmesser von 0,4 µm in 1 ml Medium, versetzt mit den entsprechenden Konzentrationen der Inhibitoren, ausgesät. Zur Vervollständigung des Versuchsaufbaus wurden schließlich die Zellkultureinsätze in die Vertiefungen der oberen Platte eingebracht und mit den Tumorzellen bei Standardbedingungen kokultiviert.

Um die Invasivitätsrate der malignen Zellen zu ermitteln, wurden nach 96 h der obere Teil der Kammer sowie die Membran entfernt und die invadierten Zellen in den Vertiefungen der unteren Platte durch kräftiges Pipettieren resuspendiert und in Zellkulturröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 1000×g für 5 min, einmaliger Waschung mit PBS und nochmaliger Pellettierung wurde schließlich die Zellzahl in einer Zählkammer bestimmt.

2.2.6 Statistische Auswertung

Die Auswertung der erhaltenen Ergebnisse erfolgte standardmäßig mit dem zweiseitigen ungepaarten t-Test nach Student mithilfe der Programme Microsoft Excel 2010 und GraphPad Prism 6 & 9. Ergebnisse mit einem p-Wert < 0,05 wurden als statistisch signifikant angenommen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt mit Asterisken angegeben:

 p < 0.05 \rightarrow *

 p < 0.01 \rightarrow **

 p < 0.001 \rightarrow ***

3 Ergebnisse

Dieser Abschnitt der Arbeit beschäftigt sich mit den Effekten zweier ausgewählter Inhibitoren des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs auf sowohl unterschiedliche Mammakarzinomzelllinien als auch Primärkulturen verschiedener Makrophagenpopulationen sowie deren Ko-Kultivierung und wurde hierfür in zwei Teile gegliedert. Der erste konzentriert sich dabei auf die erzielten Ergebnisse des mTOR-Inhibitors RAD001 (vgl. 1.3.2.1), während die Resultate für die Anwendung des Pan-PI3K-Inhibitors BKM120 (vgl. 1.3.2.2) im Mittelpunkt des zweiten Absatzes stehen.

3.1 Untersuchung des mTOR-Inhibitors

3.1.1 Toxizität von RAD001 auf Tumorzellen und Makrophagen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Frage beantworten werden, ob die Anwendung von RAD001 über eine Inhibition von Makrophagen einen reduzierenden Einfluss auf deren progressionsfördernden Effekte auf Tumorzellen nehmen kann. Zunächst sollten dafür Konzentrationsbereiche ausfindig gemacht werden, in denen die Abwehrzellen zwar gehemmt, die Karzinomzellen aber möglichst unbeeinflusst bleiben. Dazu wurden Viabilitätsuntersuchungen mittels MTT- (vgl. 2.2.3.1) und WST-1-Assays (vgl. 2.2.3.2) und Proliferationsmessungen mit Hilfe von xCELLigence (vgl. 2.2.3.3) an unterschiedlichen Brustkrebszellinien und Primärkulturen von Makrophagen durchgeführt.

3.1.1.1 Viabilität und Proliferation von Tumorzellen

Es konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Tumorzellen sehr unterschiedlich auf die Behandlung mit RAD001 bezogen auf ihre Viabilität reagierten.

Während MCF7 und SK-BR-3 unter den humanen Mammakarzinomzelllinien bereits in den niedrigsten Konzentrationsbereichen von 0,01 nM bis 0,1 nM signifikant in ihrem Stoffwechsel eingeschränkt wurden, blieben die MDA-MB-231-Zellen auch in den höchsten Dosen des applizierten Inhibitors unbeeinflusst (s. Abb. 3.1). Die Viabilität der murinen Zelllinie 410.4 wurde ebenfalls unter Verwendung von 0,01 nM RAD001 reduziert und blieb auch bei steigender Konzentration konstant auf einem ca. 80%igen Niveau.



Abb. 3.1: Viabilität von MCF7 (A), SK-BR-3 (B), MDA-MB-231 (C) und 410.4 (D) nach Behandlung mit RAD001

Die angegebenen Karzinomzellen wurden in Triplikaten mit den angegebenen Konzentrationen von RAD001 behandelt (x-Achse). Auf der y-Achse ist die Viabilität in % bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (*ctl*) dargestellt. Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 3.

Die Proliferationsmessungen zeigen, dass die Konzentrationen von RAD001, die den Stoffwechsel von MCF7 signifikant reduzierten, keinen Einfluss auf die Proliferation dieser Zellen hatten (s. Abb. 3.2 A). Auch die behandelten 410.4-Zellen zeigten keine Einschränkung ihres Wachstums bezogen auf die Kontrolle (s. Abb. 3.2 B).





3.1.1.2 Viabilität und Proliferation von Makrophagen

In den MTT- und WST-1-Assays konnte gezeigt werden, dass der Stoffwechsel von Mac und BMDM im Vergleich zu MG bereits in den unteren angewendeten Konzentrationsbereichen von 0,1 bis 1 nM wesentlich beeinträchtigt wurde. MG reagierten unter dem Einsatz von 100 nM RAD001 zwar signifikant bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, jedoch lediglich mit einer 10% igen Reduktion ihrer Viabilität.





Humane Makrophagen sowie murine Mikroglia und BMDM mit den auf der x-Achse angegeben Konzentrationen von RAD001 behandelt. Die Viabilitätsreduktion (y-Achse) von Mac und BMDM wurde mittels MTT-Test, diejenige von MG mithilfe von WST-1-Assays bestimmt. Auf der y-Achse ist die Viabilität in % bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (*ctl*) dargestellt. Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 3.

Hinsichtlich der Proliferation bzw. Zellmorphologie der Makrophagen konnte belegt werden, dass die Behandlung mit 0,01 nM bis 1 nM keine letalen Auswirkungen auf Mac und BMDM ausübt (s. Abb. 3.4). Während in Mac keine signifikante Änderung des Zellindexes unter der Inhibitoranwendung zu verzeichnen war, wurden BMDM unter 1 nM RAD001 wesentlich beeinträchtigt.



Abb. 3.4: Proliferationsmessung von Mac (A) und BMDM (B) während RAD001-Behandlung Humane Makrophagen und BMDM wurden mit den angegebenen Konzentrationen von RAD001 behandelt. Auf der x-Achse ist die Zeit dargestellt, die y-Achse zeigt die Proliferation bzw. Morphologie in Form des Zellindexes. Gezeigt sind repräsentative Einzelversuche aus n = 3.

3.1.2 Einfluss von RAD001 auf die Proteinexpression

Als nächstes sollte untersucht werden, ob durch die Behandlung mit RAD001 die Proteinexpression des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs effektiv gehemmt wird. Dazu wurden Proteinexpressionsanalysen durchgeführt, um festzustellen, ob die Menge der phosphorylierten Form von S6, eines sogenannten *Downstreamtargets* des Signalwegs, signifikant gesenkt wird.

3.1.2.1 S6- und p-S6-Expression von Tumorzellen

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Zugabe von FCS ohne RAD001-Behandlung in den beiden getesteten Tumorzellen mit einer gesteigerten Phosphorylierung von S6 einherging (s. Abb. 3.5). In den MCF7-Zellen ließ sich weder eine konzentrations- noch zeitabhängige signifikante Reduktion von p-S6 durch die Inkubation mit 0,01 nM respektive 0,1 nM des mTOR-Inhibitors nachweisen. Während in den murinen Brustkrebszellen 410.4 unter der Behandlung mit 0,1 nM RAD001 kein Unterschied zur substanzfreien Kontrolle nachzuweisen war, konnte der Anteil an p-S6 unter 1 nM in beiden untersuchten Zeitintervallen signifikant gesenkt werden. In den SK-BR-3-Zellen ließ sich ebenfalls eine wesentliche Reduktion der S6-Phosphorylierung durch die Applikation von 0,1 nM RAD001 hervorrufen, wohingegen unter 0,01 nM kein Effekt beobachtet werden konnte (Ergebnisse nicht gezeigt).



Abb. 3.5: Western-Blot-Analysen für S6 und p-S6 der mit RAD001 behandelten MCF7 (A) und 410.4 (B)

3.1.2.2 S6- und p-S6-Expression von Makrophagen

Wie auch bei den Tumorzellen führte der Zusatz von FC-Serum ohne Anwesenheit von RAD001 in den untersuchten Makrophagenpopulationen zu einer verstärkten Phosphorylierung von S6 (s. Abb. 3.6). In den MΦ ließ sich diese Beobachtung durch die Inhibitoranwendung im Konzentrationsbereich von 1 nM sowohl nach 15 min als auch 60 min signifikant reduzieren. Die Zugabe von 0,1 nM RAD001 hatte keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von S6 in den MΦ. In den BMDM ließ sich ein statistisch bedeutsamer zeitabhängiger Effekt der Behandlung nachweisen: während in den 15-minütigen Untersuchungen beider Konzentrationen kein Unterschied erkennbar wurde, ließ sich durch die 60-minütige FCS-Stimulation bei 0,1 nM und 1nM RAD001 eine signifikante Verminderung der S6-Phosphorylierung erzielen.

Dargestellt sind die Banden der Lysate ± RAD001 und ± Serumzusatz. Die Zeitangabe bezieht sich auf die Zugabe von 1% FCS für jeweils 15 und 60 min. Als Ladekontrolle wurde die Membran mit Ponceau S angefärbt.

	Α	МΦ				B BMDM											
		0,1	nM	1 n	M		0,1	nM	1 nM								
		15 min	60 min	15 min	60 min		15 min	60 min	15 min	60 min							
RAD001		+	+	+	+		+	+	+	+							
FCS		- + +	- + +	- + +	- + +		- + +	- + +	- + +	- + +							
S6																	
p-S6	-																
Ponceau S		-==:	===	EEE	222			222		233							

Abb. 3.6: Western-Blot-Analysen für S6 und p-S6 der mit RAD001 behandelten M Φ (A) und BMDM (B)

3.1.3 Einfluss auf die Makrophagen-induzierte Tumorinvasion

In Vorexperimenten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Makrophagen die Invasivität von Brustkrebszellen steigern. Dabei wurden MCF7-Zellen mit Mac und MG in einer modifizierten Boyden-Kammer ko-kultiviert und eine verstärkte Invasion der Tumorzellen beobachtet (Hagemann et al. 2004). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob dieser Effekt durch die zusätzliche Applikation von RAD001 beeinflusst werden kann.

Dazu wurden in einem syngenen Modell 410.4-Zellen mit BMDM im selben Boyden-Kammer-Versuchsaufbau ko-kultiviert und die Invasivitätsrate ermittelt (vgl. 2.2.5). Um den Einfluss von RAD001 auf die Makrophagen-induzierte Tumorinvasion zu überprüfen, wurden in jeweils drei zusätzliche Konditionen 0,1 nM und 1 nM des Inhibitors hinzugefügt. Zum Vergleich der verschiedenen Kammern wurde die Ko-Kultur von 410.4 und BMDM auf 100% normalisiert.

Es zeigte sich, dass die Invasivität von 410.4-Zellen hochsignifikant durch die Ko-Kultur mit BMDM gesteigert werden konnte (s. Abb. 3.7). Durch die zusätzliche Behandlung mit 0,1 nM RAD001 wurde dieser Effekt nicht inhibiert. Unter Hinzufügen von 1 nM des Inhibitors konnte eine über 20%ige Reduktion der Invasivitätsaktivität der 410.4-Zellen erzielt werden. Eine Verminderung auf das Ausgangsniveau der Invasivität in der Monokultur der Tumorzelle wurde im gewählten Konzentrationsbereich nicht beobachtet.

Dargestellt sind Banden der Proteinlysate der Makrophagen \pm RAD001-Behandlung und \pm Applikation von 1% FCS nach den Zeitpunkten 15 und 60 min. Als Ladekontrolle wurde die Membran mit Ponceau S angefärbt.



Abb. 3.7: Mikroinvasionsassay von 410.4 in Ko-Kultur mit BMDM ± RAD001

Die Zellen wurden für 96 h in der modifizierten Boyden-Kammer ko-kultiviert (schwarzer Balken) und mit 0,1 nM (kleinkarierter Balken) bzw. 1 nM (großkarierter Balken) RAD001 behandelt. Die Invasionsrate in % wurde dabei auf die reine Ko-Kultur bezogen. Mittelwert ± Standardabweichung, n = 3

3.2 Untersuchung des Pan-PI3K-Inhibitors

3.2.1 Toxizität von BKM120 auf Tumorzellen und Makrophagen

Um zu überprüfen, in welchen Konzentrationsbereichen die Behandlung mit BKM120 reduzierende Effekte auf die Viabilität und Proliferation aufweist, wurden ebenfalls Viabilitäts- und Proliferationsmessungen mit unterschiedlichen Tumorzelllinien und Makrophagen-Primärkulturen durchgeführt. Hierbei sollte möglichst eine Dosis ausfindig gemacht werden, die wenig Einfluss auf die Krebszellen selbst ausübt, die Abwehrzellen aber ohne letale Auswirkungen affektiert. Die Ergebnisse werden in Abb. 3.8 bis Abb. 3.11 präsentiert.

Viabilität und Proliferation von Tumorzellen 3.2.1.1

Aus Abb. 3.8 wird ersichtlich, dass sich die Viabilität der Karzinomzellen kaum durch die Anwendung von BKM120 in den gewählten Konzentrationsbereichen reduzieren ließ. Die Zelllinien MDA-MB-231 und 410.4 reagierten erst in den obersten angewendeten Konzentrationsbereichen von 100 nM BKM120 mit einem verminderten Stoffwechsel, während in SK-BR-3 kein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle nachgewiesen werden konnte. Lediglich in den MCF7-Zellen konnte die Viabilität unter Einsatz von 10 bis 100 nM BKM120 um bis zu 20% gesenkt werden. Allerdings wurde deren Proliferationsrate durch die Anwendung derselben Konzentrationen des Inhibitors nicht eingeschränkt (s. Abb. 3.9 A). Auch in den Proliferationsmessungen von 410.4 hatte BKM120 im Bereich von 1 bis 100 nM keine Auswirkung auf den Zellindex (s. Abb. 3.9 B).



Abb. 3.8: Viabilität von MCF7 (A), SK-BR-3 (B), MDA-MB-231 (C) und 410.4 (D) nach Behandlung mit BKM120

Die angegebenen Karzinomzellen wurden in Triplikaten mit den angegebenen Konzentrationen von BKM120 behandelt (x-Achse). Auf der y-Achse ist die Viabilität in % bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (*ctl*) dargestellt. Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 3.



Abb. 3.9: Proliferationsmessung von MCF7 (A) und 410.4 (B) während BKM120-Behandlung MCF7- und 410.4-Zellen wurden mit den dargestellten Konzentrationen von BKM120 behandelt. Auf der x-Achse ist die Zeit in h aufgetragen, die y-Achse zeigt die relative Proliferation in Form des Zellindexes. Gezeigt sind repräsentative Einzelversuche aus n = 3.

3.2.1.2 Viabilität und Proliferation von Makrophagen

Die Ergebnisse in Abb. 3.10 zeigen, dass der Stoffwechsel der untersuchten Makrophagenspezies in den Konzentrationen von 10 bis 100 nM BKM120 signifikant gehemmt werden konnte. Die behandelten BMDM reagierten im obersten Dosisbereich mit einer Viabilitätsreduktion um ca. 30% und einer effektiven Einschränkung des Zellindexes in der Proliferationsmessung bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (s. Abb. 3.11 B). Die untersuchten Mac und MG konnten unter Einsatz von 100 nM BKM120 zwar signifikant beeinflusst werden, zeigten aber im Vergleich zu BMDM eine deutlich geringere Sensitivität auf die Behandlung.



Abb. 3.10: Viabilität von Mac (A), BMDM (B) und MG (C) nach Behandlung mit BKM120

Humane Makrophagen sowie murine Mikroglia und BMDM mit den auf der x-Achse angegeben Konzentrationen von BKM120 behandelt. Die Viabilitätsreduktion (y-Achse) von Mac und BMDM wurde mittels MTT-Test, diejenige von MG mithilfe von WST-1-Assays bestimmt. Auf der y-Achse ist die Viabilität in % bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (*ctl*) dargestellt. Mittelwert ± Standard-abweichung, n = 3.



Abb. 3.11: Proliferationsmessung von Mac (A) und BMDM (B) während BKM120-Behandlung Humane Makrophagen und BMDM wurden mit den angegebenen Konzentrationen von BKM120 behandelt. Auf der x-Achse ist die Zeit dargestellt, die y-Achse zeigt die Proliferation bzw. Morphologie in Form des Zellindexes. Gezeigt sind repräsentative Einzelversuche aus n = 3.

3.2.2 Einfluss von BKM120 auf die Proteinexpression

Analog zur Behandlung mit RAD001 (s. 3.1.2.1) sollte im Weiteren untersucht werden, ob der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg in den Tumorzellen und Makrophagen durch die Applikation von BKM120 auf Proteinebene beeinflusst wird. Auch hierbei wurde der Fokus auf den Phosphorylierungsstatus des Proteins S6 gesetzt.

3.2.2.1 S6- und p-S6-Expression von Tumorzellen

Wie in Abb. 3.12 dargestellt, war der Gesamtanteil an S6 in den Tumorzellen in allen Proteinlysaten konstant. Übereinstimmend mit den vorgenannten Untersuchungen (s. 3.1.2) ging die Zugabe von FCS mit einer gesteigerten Phosphorylierung von S6 einher. In den MCF7-Zellen ließ sich in keiner der getesteten Bedingungen mit 1 nM und 10 nM BKM120 eine signifikante Reduktion von p-S6 erzielen. Während die Vorinkubation mit 10 nM BKM120 in den 410.4-Zellen keine quantitative Änderung des p-S6-Status bewirkte, ließ sich eine signifikante Reduktion des Phosphorylierungs-status unter Zugabe von 100 nM des Pan-PI3K-Inhibitors nach 60-minütiger FCS-Behandlung nachweisen.

	A MCF7							B 410.4																	
		1 nM					10 nM							10 nM							100 nM				
	15 min 60 min			1	15 m	nin	in 60 min				15 min			60 min			15 min			60 min		in			
BKM120			+	-	-	+	-	-	+	-	-	+		-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
FCS		- +	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+		-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
S6			-	-			-	-	-		_	-		-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
p-S6						-	-	-	-	-	-	-						-	-	-				-	-
Ponceau S				1		14	111							-		-	-	-		11	=	-	=		-

Abb. 3.12: Western-Blot-Analysen für S6 und p-S6 der mit BKM120 behandelten MCF7 (A) und 410.4 (B)

3.2.2.2 S6- und p-S6-Expression von Makrophagen

Während in MΦ der Phosphorylierungsstatus von S6 über alle Bedingungen hinweg konstant blieb (s. Abb. 3.13 A), konnte in BMDM ein verminderter Anteil an p-S6 in den serumdeprivierten Kontrollen nachgewiesen werden (s. Abb. 3.13 B). Die Behandlung mit den angegebenen Konzentrationen von BKM120 erbrachte in keiner der getesteten Bedingungen eine statistisch signifikante Reduktion des aktivierten Proteins.



Abb. 3.13: Western-Blot-Analysen für S6 und p-S6 der mit BKM120 behandelten M Φ (A) und BMDM (B)

Dargestellt sind Banden der Proteinlysate der Makrophagen \pm BKM120-Behandlung und \pm Applikation von 1% FCS nach den Zeitpunkten 15 und 60 min. Als Ladekontrolle wurde die Membran mit Ponceau S angefärbt.

Dargestellt sind die Banden der Lysate ± BKM120 und ± Serumzusatz. Die Zeitangabe bezieht sich auf die Zugabe von 1% FCS für jeweils 15 und 60 min. Als Ladekontrolle wurde die Membran mit Ponceau S angefärbt.

3.2.3 Einfluss auf die Makrophagen-induzierte Tumorinvasion

Schließlich sollte untersucht werden, ob die Anwendung von BKM120 einen Einfluss auf die beschriebene Makrophagen-induzierte Tumorinvasion hat.

Analog zu den Versuchen mit RAD001 (s. 3.1.3) wurden auch hierbei 410.4-Zellen mit BMDM in der modifizierten Boyden-Kammer (vgl. 2.2.5) ko-kultiviert und in einem Versuchsansatz mit BKM120 behandelt. Zum Vergleich der einzelnen Konditionen wurde die Ko-Kultur von 410.4 und BMDM auf 100% normalisiert.

Es zeigte sich, dass die Invasivität von 410.4-Zellen in Ko-Kultur mit BMDM signifikant gesteigert wird (s. Abb. 3.14). Durch das Hinzufügen von 100 nM BKM120 konnte diese Beobachtung um ca. 50%, jedoch nicht auf die Ausgangsinvasivität der Tumorzell-Monokultur reduziert werden.



Abb. 3.14: Mikroinvasionsassay von 410.4 in Ko-Kultur mit BMDM ± 100 nM BKM120

Die Zellen wurden für 96 h in der modifizierten Boyden-Kammer ko-kultiviert (schwarzer Balken) und mit 100 nM (karierter Balken) BKM120 behandelt. Die Invasionsrate in % wurde dabei auf die reine Ko-Kultur bezogen. Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 3.

4 Diskussion

4.1 Heterogenes Ansprechen der Mammakarzinomzellen auf die Anwendung der PI3K/Akt/mTOR-Signalwegsinhibitoren

Zunächst wurden im Rahmen dieser Arbeit die Effekte der beiden Inhibitoren auf Viabilität, Proliferation und Proteinexpression von unterschiedlichen Mammakarzinomzelllinien, die den einzelnen in 1.1 klassifizierten Brustkrebssubtypen zugeordnet werden können, untersucht. Das formulierte Ziel bestand darin, die Zelllinien hinsichtlich ihres Ansprechens auf die Behandlung mit den Substanzen zu charakterisieren und einen möglichst resistenten Subtyp ausfindig zu machen, um anschließend weitestgehend unbeeinträchtigt die Auswirkungen der Inhibitoren auf die invasivitätssteigernden Eigenschaften der Makrophagen zu überprüfen.

Erwartungsgemäß ergab sich ein insgesamt sehr heterogenes Verhalten der verschiedenen Zelltypen auf den Einsatz der Substanzen. Anhand der werden, Toxizitätsmessungen konnte gezeigt dass die niedrig-invasive, Hormonrezeptor-positive Zelllinie MCF7 (Luminal A-Subtyp) sehr empfindlich auf die Behandlung mit RAD001 reagiert (s. Abb. 3.1). Bereits 0,1 nM der Substanz führten zur signifikanten Einschränkung der Zellviabilität, jedoch nicht zu einer effektiven Blockade der Signalkaskade. Im Gegensatz zu den in 1.3.2 erwähnten antiproliferativen Eigenschaften der mTOR-Inhibitoren steht das Ergebnis, dass trotz weiterer Steigerung der RAD001-Dosis auf 1 nM kein Effekt auf die Proliferation von MCF7 nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 3.2). Allerdings zeigen die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen anhand ebenfalls Hormonrezeptor-positiver Zelllinien, dass die Proliferation sowohl dosis- als auch zeitabhängig in vitro in deutlich höheren Konzentrationsbereichen des Inhibitors eingeschränkt werden kann (Liu et al. 2011; Sanchez et al. 2011). Als Monotherapeutikum konnte sich RAD001 mangels Prognose-verbessernder Erfolge in der klinischen Anwendung bislang nicht durchsetzen. Durch die gleichzeitige Anwendung von RAD001 und antihormonellen Präparaten zeichnete sich hingegen bereits präklinisch eine potenzierte antitumoröse Wirkung und somit ein Durchbrechen der mehrfach vorbeschriebenen, durch eine mTOR-Aktivierung bedingten Resistenz auf endokrine Therapeutika ab (Liu et al.

2014a; Sanchez et al. 2011; Sendur et al. 2014). Diese Beobachtung ließ sich durch die Ergebnisse der BOLERO-2-Studie (vgl. 1.3.2.1) in vivo bestätigen, weshalb der Wirkstoff aktuell in Kombination mit einer antihormonellen Medikation in der Behandlung von metastasiertem Hormonrezeptor-positiven, HER2/neu-negativen Brustkrebs empfohlen wird (Baselga et al. 2012). In den MCF7-Zellen, welche nachgewiesenermaßen eine aktivierende PIK3CA-Mutation und -Amplifikation aufweisen (Wu et al. 2005), bewirkte die Anwendung von BKM120 erwartungsgemäß die insgesamt stärkste Viabilitätseinschränkung unter den getesteten Zelllinien (s. Abb. 3.8). Dieses Resultat ist kohärent mit den Ergebnissen einer Studie, in der eine Vielzahl PIK3CA-aberrierter Zelllinien mit einer signifikant höheren Sensitivität auf BKM120 verglichen mit den Mammakarzinomsubtypen ohne Veränderungen dieses Gens reagierten (Maira et al. 2012b). Allerdings erbrachten weder die Proliferationsmessungen noch die Proteinanalysen Beeinflussungen in den gewählten Konzentrationen, welche in Arbeiten anderer Arbeitsgruppen erst in deutlich höheren Dosisbereichen beobachtet werden konnten, wobei hierbei letale Wirkungen nicht gänzlich ausgeschlossen wurden (Sanchez et al. 2011). Bisher veröffentliche klinische Studienergebnisse zur Anwendung von BKM120 erbrachten trotz der starken Korrelation zwischen der Aktivierung der PI3K-Kaskade und der Progression von Brustkrebserkrankungen enttäuschende Ergebnisse. Verglichen mit anderen onkogenen Rezeptortyrosinkinasen haben die verschiedenen Inhibitoren der PI3K bislang nur eine moderate Effektivität gezeigt. Klinisch relevant erwies sich die Erkenntnis, dass sich durch einen zusätzlichen Entzug von Östrogenen die Wirkung von PI3K-Inhibitoren in vitro steigern lässt, wohingegen der Effekt unter der Behandlung mit RAD001 vergleichsweise moderat ausfällt (Crowder et al. 2009; Sanchez et al. 2011). Eine PI3K-Hemmung ist den Ergebnissen der BELLE-2-Studie (vgl. 1.3.2.2) zufolge in Kombination mit einer antiöstrogenen Therapie eine prinzipiell veritable Behandlungsoption (Baselga et al. 2017), dennoch verhinderte das hohe Toxizitätsspektrum von BKM120 bisher dessen Zulassung für diese Indikation (Sobhani et al. 2018). Als aussichtsreicherer Ansatz kristallisiert sich gegenwärtig immer weiter die nebenwirkungsärmere selektive Hemmung der α-Untereinheit von PI3K heraus. Für PI3Ka-selektive Medikamente konnten bislang gute Erfolge in der Therapie solider Tumoren mit PIK3CA-Mutation, aber auch HER2/neu-Amplifikation nachgewiesen werden (Thorpe et al. 2015).

Die HER2/neu-angereicherte Mammakarzinomzelllinie SK-BR-3 zeigte in den MTT-Assays die insgesamt höchste Sensitivität auf die Behandlung mit RAD001. Dieses Ergebnis erscheint primär nicht unerwartet, da mTOR eines der Effektormoleküle von HER2/neu ist. Dennoch bleibt die Rolle von mTOR und den gängigen mTORC1-Inhibitoren in diesem Brustkrebstyp unklar. In vivo konnte in bisher zwei Phase-III-Studien (vgl. 1.3.2.1) kein relevant verlängertes Überleben für Everolimus als Kombinationspräparat und somit auch kein Durchbrechen der vorbeschriebenen Resistenz gegenüber Targettherapeutika, die mit einer Aktivierung des Signalwegs assoziiert ist, nachgewiesen werden. Lediglich in der Subgruppe der Hormonrezeptornegativen Betroffenen zeichnete sich ein klinischer Benefit ab, der jedoch nicht zur Zulassung des Präparats führte (André et al. 2014; Hurvitz et al. 2015). Uberraschenderweise erbrachte der Einsatz von BKM120 hingegen keine signifikanten Unterschiede in den gewählten Konzentrationsbereichen, obwohl eine Assoziation der Überexpression von HER2/neu-Rezeptoren mit der Aktivierung von PI3K beschrieben wurde (Chandarlapaty et al. 2011; Markman et al. 2010b). Diese Beobachtung kann dadurch erklärt werden, dass die Inhibition von PI3K sowie die duale Hemmung des PI3K/mTOR-Komplexes über einen Feedbackmechanismus zur Hochregulation der Expression und Phosphorylierung von HER3, einem Ko-Rezeptor von HER2, der mit diesem dimerisiert und zu einer vermehrten Aktivität beiträgt, führen (Chakrabarty et al. 2012; Chandarlapaty et al. 2011; Lee-Hoeflich et al. 2008; Serra et al. 2011). Die selektive Blockierung von mTORC1 hingegen verursacht zwar die Phosphorylierung von HER3, hat jedoch keinen Einfluss auf dessen Ausprägung (Chandarlapaty et al. 2011). Für die bisher entwickelten PI3K-Inhibitoren einschließlich BKM120 blieb der erhoffte klinische Erfolg aufgrund des hohen Nebenwirkungsspektrums aus.

Erwartungsgemäß wurde die Viabilität der humanen *triple*-negativen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 in den jeweils höchsten Konzentrationsbereichen (100 nM) beider Inhibitoren lediglich minimal reduziert (s. Abb. 3.1 und Abb. 3.8). Publikationen belegen darüber hinaus, dass auch die weitere Dosissteigerung beider Inhibitoren bis 500 nM RAD001 respektive 1 µM BKM120 mit der Induktion einer vergleichsweise niedrigen Viabilitätseinschränkung und Apoptoserate einhergeht (Ayub et al. 2015; Sanchez et al. 2011; Yunokawa et al. 2012). In den durchgeführten Proteinanalysen zeigte sich dabei einerseits, dass die Menge an phosphoryliertem S6 durch Anwendung beider Substanzen konzentrationsabhängig reduziert, jedoch die

Ausprägung von Akt unter der Behandlung mit RAD001 im Gegensatz zur BKM120-Gabe gesteigert wird. Diese paradoxe Aktivierung von Akt nach Behandlung mit mTOR-Inhibitoren, die bisher unter anderem in Arbeiten mit Brust- und Lungenkrebszelllinien beobachtet werden konnte (Buck et al. 2006; Wang et al. 2008), könnte als möglicher Erklärungsansatz für die bereits beschriebene Resistenz dieses Subtyps und bislang enttäuschende klinische Studienergebnisse mit Everolimus als Monotherapeutikum dienen (Leung et al. 2015; Yunokawa et al. 2012). Trotz der Proteinanalysen scheint auch die medikamentöse Blockade der PI3K in dieser Zelllinie, die keinerlei nachgewiesene Aberrationen der PIK3CA trägt (Wu et al. 2005), eine untergeordnete Rolle für das Überleben der Karzinomzellen zu spielen. Eine vielversprechendere therapeutische Option birgt offenbar die gleichzeitige Anwendung beider Substanzen bzw. kombinierter PI3K/mTOR-Inhibitoren. Die Tumorzellproliferation und -viabilität konnten durch die Kombination beider Präparate in späteren in vitro-Untersuchungen anhand mehrerer triple-negativer Zelllinien signifikant gehemmt werden (Leung et al. 2015). Lehmann et al. belegten darüber hinaus, dass durch duale Hemmung beider Enzyme in Zelllinien derselben Unterform triple-negativer Mammakarzinome (vgl. 1.3.1) das Tumorvolumen in Xenograft-Modellen hochsignifikant reduziert werden kann (Lehmann et al. 2011). Aktuell befinden sich bereits erste Kombinationspräparate in der klinischen Erprobung zur Behandlung von fortgeschrittenen Brustkrebserkrankungen.

Die Zelllinie 410.4 zeigte hinsichtlich ihrer Viabilität ein vergleichsweises moderates Ansprechen auf die Behandlung mit den Inhibitoren. Obwohl die Applikation von 0,01 nM RAD001 bereits mit einer geringen Reduktion des Stoffwechsels einherging, erbrachte die Dosiseskalation bis 100 nM keine verstärkte Wirkung (s. Abb. 3.1). Auch durch die Anwendung von BKM120 ließ sich in den höchsten getesteten Dosisbereichen nur eine minimale Einschränkung der Viabilität von 410.4 nachweisen (s. Abb. 3.8). Für die Konzentrationen der Substanzen, die im Weiteren für die Mikroinvasionsassays verwendet wurden, konnte kongruent zu weiteren Ergebnissen der Arbeitsgruppe anhand des PI3K-Inhibitors in den Proteinanalysen eine effektive Blockierung der Signalkaskade nachgewiesen werden (Blazquez et al. 2018). Da sich für beide Inhibitoren keinerlei Einfluss auf die Proliferation von 410.4 nachweisen ließ, liegt die Annahme nah, dass eine reduzierte Signalwegsaktivität nicht mit einer eingeschränkten Proliferation korreliert.

4.2 Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg steuert vielfältige Funktionen in Tumor-assoziierten Makrophagen

Makrophagen können auf vielfältige Weise und über eine Fülle an involvierten Mechanismen Krebszellen zugunsten einer Progression und Invasion in sekundäre Gewebe unterstützen. Basierend auf der Tatsache, dass eine Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs mit der Induktion eines proinvasiven Makrophagenphänotyps assoziiert ist (vgl. 1.3.3), ergibt sich durch eine gezielte medikamentöse Intervention ein vielversprechender Behandlungsansatz. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand folglich darin, die Effekte der gewählten Signalwegsinhibitoren erstmals anhand unterschiedlicher Makrophagenspezies zu charakterisieren.

MΦ und BMDM zeigten ein insgesamt sehr ähnliches Ansprechen auf die Behandlung mit RAD001. Die Zellviabilität wurde mittels 0,1 nM respektive 0,01 nM RAD001 signifikant eingeschränkt, wobei bei beiden Populationen eine weitere dosisabhängige Reduktion beobachtet werden konnte (s. Abb. 3.3 und Abb. 3.4). Eine letale Wirkung ergab sich auch in höheren Konzentrationsbereichen nicht. Weiterhin wurde auf Proteinebene eine signifikante Abnahme an phosphoryliertem S6 durch die Behandlung mit dem Inhibitor nachgewiesen, sodass eine effektive Hemmung der Signalkaskade angenommen und gleichzeitig ausgeschlossen wurde, dass dieser Effekt durch toxische Konzentrationen bedingt ist (s. Abb. 3.6).

Weitere Arbeitsgruppen konnten bereits belegen, dass neben Stoffwechsel und Proliferation bzw. Morphologie auch weitere höchst bedeutsame zelluläre Prozesse der Abwehrzellen via mTOR-*Signaling* reguliert werden. Mehrere Untersuchungen anhand von unterschiedlichen Makrophagenpopulationen zeigen, dass auch die Produktion und Ausschüttung von für die Tumorprogression essenziellen Mediatoren mTOR-abhängig ist und durch eine medikamentöse Intervention beeinflusst werden können. Die Anwendung von Erstgenerationspräparaten ging in *in vitro*-Experimenten mit einer verminderten Freisetzung von einerseits proinflammatorischen Interleukinen, aber auch von angioneogenetischen und progressionsfördernden Faktoren einher (Guha und Mackman 2002; Tsiavou et al. 2002; Xie et al. 2014b). Auch *in vivo* ließen sich durch die mTOR-Inhibition mittels Rapamycin bereits ähnliche Effekte mit hoher Expression von IL-12 und Suppression der IL-10-Synthese erzielen (Chen et al. 2012; Mercalli et al. 2013; Weichhart et al. 2008). In weiteren Untersuchungen konnte durch eine Blockade mittels Rapamycin das Chemokin *monocyte chemoattractant protein-1*

(MCP-1), welches nebst diversen benignen Zellen vornehmlich von TAM und Tumorzellen produziert wird und Prozesse wie Migration, Neoangiogenese und Infiltration von sowohl Monozyten als auch reifen Makrophagen reguliert (Deshmane et al. 2009), inhibiert werden (Gazzaniga et al. 2007; Salcedo et al. 2000). Diese Ergebnisse zeigen zusammenfassend, dass sich die Polarisierung von Makrophagen durch die Anwendung von mTOR-Inhibitoren zugunsten eines antiinvasiven M1-Phänotyps beeinflussen lässt. Es wirft die Frage auf, ob die bisher erlangten Erfolge in der klinischen Erprobung von RAD001 anhand von meist fortgeschrittenen Tumorerkrankungen ausschließlich durch direkte tumorhemmende Effekte bedingt sind oder ob auch indirekte Faktoren über die Beeinflussung des Mikromilieus eine Rolle spielen.

Ebenso konnten durch die Anwendung von BKM120 im Rahmen dieser Arbeit Einschränkungen im Stoffwechsel von MΦ und BMDM beobachtet werden, dies allerdings erst in sehr hohen Dosen statistisch signifikant (s. Abb. 3.10), was sich auch in späteren Untersuchungen der Arbeitsgruppe bestätigen ließ (Blazquez et al. 2018). Allerdings konnte in den gewählten Konzentrationsbereichen keine statistisch signifikante Abnahme der Phosphorylierung von S6 beobachtet werden. Da in den Proteinanalysen der Arbeitsgruppe durch die Behandlung mit gleichen Dosen BKM120 jedoch eine deutliche Abnahme der Phosphorylierung von Akt, also einem in der Signalkaskade vorangeschalteten Protein, nachgewiesen werden konnte, sind Interaktionen mit anderen Signalwegen bzw. bislang noch nicht belegten Feedbackmechanismen als Erklärungsansatz denkbar. Im Sinne einer Methodenkritik ist demnach die alleinige Nutzung des S6-Phosphorylierungsstatus als Nachweis einer effektiven Signalwegsinhibition zu hinterfragen.

Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zeigen, dass die Stimulation humaner Monozyten mittels LPS und Partikeln gram-positiver Bakterien bei gleichzeitiger Anwendung des PI3K-Inhibitors Wortmannin zu einer verstärkten Transkription und Proteinbiosynthese von IL-12 sowie unterdrückten IL-10-Spiegeln führte (Martin et al. 2003; Uthaisangsook et al. 2003). Polumuri et al. demonstrierten weiterhin in einem murinen Modell, dass eine vermehrte Aktivierung der PI3K mit einem IL-10^{high}-, IL-12^{low}-Phänotyp einhergeht und diese Zytokinkonstellation durch die Anwendung von PI3K-Inhibitoren reversiert werden kann (Polumuri et al. 2007). Eine Genexpressions-analyse an murinen Makrophagen zeigte bereits, dass durch die Behandlung mit

LY294002 unterschiedliche Mediatoren reguliert werden können. Im Vergleich zu durch LPS auf klassische Weise aktivierten Makrophagen konnte dabei neben einer supprimierten MMP-9-Ausprägung auch eine deutlich verminderte Expression von IL-10 und TLR-4, wie es für den M2-Phänotyp charakteristisch ist (Mantovani et al. 2002), nachgewiesen werden (Dos Santos et al. 2007).

Innerhalb der dichotomen Betrachtungsweise der unterschiedlichen Funktionszustände von Makrophagen bergen die Tatsachen, dass durch die medikamentöse Blockierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs die Immunzellen in ähnlichen Konzentrationsbereichen wie Karzinomzellen affektiert werden und die Ausbildung eines M1-artigen antiinvasiven Phänotyps gelingt, ein enormes therapeutisches Potential. Trotzdem sind bisher nur sehr wenige Untersuchungen zur Wirkung in der direkten Interaktion von Tumorzellen und Makrophagen durchgeführt worden.

4.3 Reduktion der Makrophagen-induzierten Invasivität durch RAD001 und BKM120

Die dritte Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Auswirkungen der Inhibitoren auf die Makrophagen-induzierte Invasivitätssteigerung von Mammakarzinomzellen zu überprüfen. Aufbauend auf der Erkenntnis, dass die niedriginvasive Zelllinie MCF7 in Ko-Kultur mit aus monozytären Vorläufern stimulierten Makrophagen oder Mikroglia über die Hochregulation von MMPs einen invasiveren Phänotyp ausbildet (Hagemann et al. 2004; Pukrop et al. 2006; Pukrop et al. 2010), wurden in einem ausgewählten syngenen Modell Mikroinvasionsassays in der modifizierten Boyden-Kammer durchgeführt. Erwartungsgemäß bewirkte die unbehandelte Ko-Kultivierung der Zelllinie 410.4 mit BMDM eine etwa 70% ige Steigerung der Invasivität der Karzinomzellen. Unter Zusatz von 1 nM RAD001, also derjenigen Konzentration, unter der in den genannten Voruntersuchungen anhand beider Zelltypen eine effektive Blockade des Signalwegs zu verzeichnen war und eine letale Wirkung der Substanz ausgeschlossen wurde, konnte hierbei erstmals eine hochsignifikante Reduktion der Invasionsrate der Karzinomzellen belegt werden (s. Abb. 3.7). Es deutete sich eine Dosisabhängigkeit dieses Effektes an und wirft die Frage auf, ob die induzierte Invasivitätssteigerung durch höhere, ebenfalls nichttoxische Konzentrationen komplett aufhebbar sein könnte.

4 Diskussion

Eine weitere denkbare Erweiterung dieser aussichtsreichen Beobachtung könnte sich durch eine gleichzeitige Hemmung beider mTOR-Komplexe realisieren lassen, da kürzlich auch für mTORC2 eine entscheidende Rolle in der Tumorprogression ausfindig gemacht werden konnte. Über eine Hochregulation von M2-typischen Oberflächenmarkern in Makrophagen durch eine Aktivierung von mTORC2 ließen sich eine vermehrte Invasivität muriner Mammakarzinomzellen sowie ein Anstieg der Fernmetastasierung belegen (Shrivastava et al. 2019). Demnach scheint die Anwendung von kombinierten mTORC1/2-Inhibitoren, die sich *in vitro* bereits als synergistisch in der eigentlichen Tumortherapie erwiesen (Lee et al. 2015; Leung et al. 2015), auch im Hinblick auf die Rolle der Mikroumgebung in der Tumorprogression sinnvoll.

Auch durch die Behandlung mit 100 nM des Pan-PI3K-Inhibitors konnte die Invasivität der BKM120-resistenten Zelllinie 410.4 signifikant gesenkt werden (s. Abb. 3.14). Demnach ist davon auszugehen, dass das hier erstmals beobachtete Ergebnis einzig durch den Effekt des Inhibitors auf die BMDM hervorgerufen wurde. Dieses Resultat deckt sich mit den Ergebnissen weiterführender Experimente der Arbeitsgruppe (Blazquez et al. 2018). Wie zuvor beschrieben (vgl. 1.3) werden die Isoformen PI3Ky und PI3Ko vor allem in Zellen des Immunsystems einschließlich Makrophagen exprimiert, während in Karzinomzellen häufig Aberrationen vor allem der α-, aber auch β-Untereinheiten nachgewiesen wurden (Thorpe et al. 2015). Um zu überprüfen, welche Auswirkungen die alleinige PI3K-Inhibition in den Makrophagen auf die assistierte Tumorinvasion hat, ist demnach im Hinblick auf Untersuchungen mit potenziell nicht-resistenten Karzinomzellen sicherlich die Anwendung eines Isoformspezifischen Inhibitors notwendig. Allerdings wurden die Mehrzahl der Versuche zur Wirkung der PI3K-Inhibitoren in Makrophagen mittels der sogenannten Pan-Inhibitoren durchgeführt. Die Ergebnisse einzelner Arbeitsgruppen lassen bisher vermuten, dass der Einsatz von PI3Ky-spezifischen Inhibitoren als eine Art Ko-Therapeutikum einen günstigen Einfluss auf Verlauf und Prognose von Tumorerkrankung nehmen kann. Anhand von soliden Tumorerkrankungen konnte mithilfe von PI3Ky-defizienten Mäusen bereits gezeigt werden, dass es durch den Knockout verglichen mit Wildtyp-Tieren zu einem signifikant reduzierten Tumorwachstum sowie einer verminderten Metastasenbildung kommt und mit einem verlängerten Gesamtüberleben einhergeht (González-García et al. 2010; Kaneda et al. 2016). Auch durch die medikamentöse Blockade von PI3Ky mit Isoform-spezifischen Agenzien konnte bereits in vivo ein

reduziertes Tumorwachstum durch Bremsung einer Inflammationsreaktion in den myeloiden Zellen gezeigt werden (Schmid et al. 2011).

Letztlich kann keine abschließende Aussage darüber getroffen werden, ob die in dieser Arbeit gezeigte Reduktion der progressionsfördernden Eigenschaften von BMDM in der Makrophagen-induzierten Tumorinvasion von Brustkrebszellen tatsächlich auf die Reedukation der Makrophagen zum antiinvasiven M1-Phänotyp zurückzuführen ist. Insgesamt scheinen die Substanzklassen jedoch einen aussichtsreichen Einfluss auf den Verlauf der Tumorerkrankung durch ihre Auswirkungen auf TAMs auszuüben. Des Weiteren bleibt zu klären, inwieweit sich diese Ergebnisse aus einem murinen Modell auf den menschlichen Organismus übertragen lassen. Frühere Untersuchungen zur Wirkung von Rapamycin an BMDM führten ähnlich wie bereits für humane Makrophagen beschrieben zu einer M1-artigen Immunantwort mit gesteigerter IL-12-Synthese und Herabregulierung von IL-10 (Schmitz et al. 2008). Allerdings zeigte sich im Gegensatz zu den menschlichen Immunzellen eine verminderte Synthese von TNF- α und IL-6, was wiederum ungeachtet der Taxonomie die Heterogenität dieser Zellen unterstreicht.

4.4 Residente Makrophagenspezies als denkbares Interventionsziel

Die Fragen, ob die bisher erzielten Ergebnisse der Inhibitoren anhand von TAMs auch auf die ebenfalls heterogene Population der spezialisierten residenten Makrophagen übertragbar sind und sich durch die medikamentöse Hemmung der Signalkaskade die Kolonisation von Tumorzellen in sekundären Geweben beeinflussen oder gar verhindern lässt, sind noch weitgehend unbeantwortet.

Das Risiko von Brustkrebspatientinnen trotz stadiengerechter Therapie Hirnmetastasen zu entwickeln, liegt bei einer bei Diagnosestellung lokalisierten Erkrankung bei etwa 2,5% und wird in fortgeschrittenen Tumorstadien mit bis zu 24% angegeben (Lin et al. 2004; Rostami et al. 2016; Tayyeb und Parvin 2014). Für die Betroffenen geht dies mit einer sehr schlechten Prognose mit einem medianen Überleben von nur 4 bis 6 Monaten (Pestalozzi 2009) und einer 1-Jahresüberlebensrate von lediglich 20% (Gil-Gil et al. 2014) einher. Die Behandlung von intrakraniellen Metastasen bleibt trotz des Anstiegs ihrer Inzidenz (Eichler et al. 2011) schwierig, weil bisher wenig über die genauen Prozesse in diesem einzigartigen Kolonisationsorgan bekannt ist und nicht alle prinzipiell geeigneten Pharmaka die Blut-Hirn-Schranke in ausreichender Konzentration überwinden können. Erstaunlicherweise korreliert der PI3K-Status in Hirnmetastasen, in denen häufiger eine Aktivierung des Signalwegs als in extrakraniellen Metastasen nachgewiesen werden konnte (Chen et al. 2014), nicht mit dem Aktivitätsstatus des zugehörigen Primarius, wie bereits für Brustkrebspatientinnen gezeigt wurde (Brastianos et al. 2015).

Aufgrund ihrer Schlüsselrolle im Zusammenhang mit diversen neuroinflammatorischen und –degenerativen Erkrankungen sowie primären Hirntumoren stehen die residenten Makrophagen des ZNS, die Mikroglia, bereits seit Längerem im Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen. Auch innerhalb dieser Makrophagenspezies lassen sich proinflammatorische M1-artige von neuroprotektiven M2-Funktionszuständen unterschieden werden (Franco und Fernández-Suárez 2015; Orihuela et al. 2016). Allerdings deuten neuere Erkenntnisse auch darauf hin, dass Tumor-assoziierte Mikroglia nicht eindeutig einem einzelnen Subtyp in der klassischen dichotomen Nomenklatur zugeordnet werden kann, sondern vielmehr einen Misch- bzw. einen eigenen Phänotyp darstellt. Dies äußert sich unter anderem in der gleichzeitigen Expression von für beide Phänotypen typischen Markern (Lisi et al. 2014b; Szulzewsky et al. 2015; Umemura et al. 2008) sowie der Ausbildung einer einzigartigen Morphologie in Ko-Kultur mit Tumorzellen (Pukrop et al. 2010).

Bisher ist noch wenig darüber bekannt, welche intrazellulären Prozesse an der Ausprägung dieser Zustandsform beteiligt sind und ob es potenzielle medikamentöse Ansatzpunkte gibt. Hinweise verdichten sich jedoch, dass Mitglieder des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs Schlüsselrollen in der Regulierung einer Neuroinflammation und Modulation glialer Funktionen einnehmen (Dello Russo et al. 2013). So wurde eine Aktivierung der Kaskade bereits mit einer Polarisierung der Mikroglia nach proinflammatorischen Stimuli zum neuroprotektiven M2-Phänotyp in Verbindung gebracht (Wang et al. 2015). Da sowohl RAD001 als auch BKM120 eine gute Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit aufweisen (Maira et al. 2012a; Nanni et al. 2012; O'Reilly et al. 2010), ergab sich hierbei ein nächster interessanter Untersuchungsansatz.

Die Toxizitätsversuche im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass murine Mikrogliazellen deutlich weniger sensibel verglichen mit den anderen Makrophagenspezies durch die Behandlungen mit den Inhibitoren beeinflusst wurden. Für RAD001 konnte belegt werden, dass die Viabilität der Zellen ab einer Konzentration von 1 nM dosisabhängig

signifikant gesenkt wird und sie somit deutlich unempfindlicher auf die Behandlung reagieren als mehrere der getesteten Mammakarzinomzelllinien (s. Abb. 3.3). In einer weiteren Arbeit ließen sich allerdings sowohl Stoffwechsel als auch Proliferation von muriner Mikroglia in einem vergleichbaren Studienansatz bereits erheblich eingeschränkt (Dello Russo et al. 2009). Trotz des vielversprechenden Makrophagenpolarisierenden Potentials dieser Substanzklasse durch eine zentrale Rolle von mTOR in der Regulation von Mikrogliafunktionen und der bekannten antitumorösen Wirksamkeit gegenüber bestimmten Krebserkrankungen sind kaum weitere eindeutige Ergebnisse zur Wirkung von mTOR-Inhibitoren in residenten Makrophagenspezies verfügbar. So konnten einerseits antitumoröse Effekte der mit Rapamycin behandelten Mikroglia auf Glioblastoma multiforme-Zellen durch ein M1-artiges Expressionsprofil (Lisi et al. 2014a), aber auch eine durch eine mTORC1-Hemmung vermittelte verminderte M1-Polarität der Mikroglia nachgewiesen werden (Li et al. 2016; Xie et al. 2014a).

Durch die Anwendung von BKM120 wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Einschränkung der Viabilität erst im höchsten Konzentrationsbereich beobachtet (s. Abb. 3.10), was darauf hindeuten könnte, dass diese Zellfunktion über andere Signalwege gesteuert wird. Weitere Toxizitätsmessungen der Arbeitsgruppe konnten diese Beobachtung allerdings nicht bestätigen und erbrachten einen Effekt bereits in vergleichsweise geringen Dosisbereichen (Blazquez et al. 2018). Anzumerken ist hierbei, dass unterschiedliche Assays für den Viabilitätsnachweis verwendet wurden. Ferner konnte die Arbeitsgruppe in weiterführenden Untersuchungen PI3K als eine Art Hauptregulator in der Mikroglia-assistierten Tumorinvasion in das Gehirn ausmachen, was sich durch die Behandlung mit BKM120 erfolgreich blockieren lässt, sodass das Medikament nicht nur in der Behandlung der Metastase an sich, sondern auch einer Reorientierung des Tumormikroenvironments hin zu einer Tumorregredienz vielversprechend ist (Blazquez et al. 2018). Die Frage, ob eine frühzeitige, d. h. vor der Detektion von Fernmetastasen, Gabe des Medikaments im Sinne einer Primärprophylaxe sinnvoll ist, bleibt offen. Besonders im Hinblick auf das Modell der parallelen Tumorprogression, d. h. das Vorhandensein von noch nicht nachweisbaren metastatischen Herden zum Zeitpunkt der Erstdiagnose der Krebserkrankung, würde eine klinische Erprobung der Substanzen auch in lokalisierten Tumorstadien sinnvoll erscheinen lassen.

5 Zusammenfassung

Die Prognose von Betroffenen lokal fortgeschrittener oder metastasierter Krebserkrankungen ist aufgrund von fehlenden effektiven Behandlungsmöglichkeiten oft drastisch reduziert und die verbleibende Lebenszeit meist deutlich begrenzt (Kimbung et al. 2015; Weigelt et al. 2005). Aus diesem Grund ist das bessere Verständnis der einzelnen an der Tumorprogression beteiligten Vorgänge von elementarer Bedeutung. Es ist gesichert, dass sowohl Tumor-assoziierte (TAM) als auch sessile Makrophagen an verschiedenen Punkten der Metastasierungskaskade proinvasive Prozesse der Tumorzellen unterstützen (Balkwill und Mantovani 2001; Pollard 2004; Pukrop et al. 2010). Über welche genauen Mechanismen diese Vorgänge gesteuert werden und ob sie sich durch eine gezielte pharmakologische Intervention blockieren lassen, ist bislang nur wenig bekannt.

Viele Tumorentitäten zeichnen sich durch eine Aberration von Mitgliedern des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs aus (Workman und Clarke 2012), weshalb sich derzeit eine Fülle an verschiedenen Inhibitorsubstanzen, darunter auch der mTOR-Inhibitor RAD001 (Everolimus) und der PI3K-Inhibitor BKM120 (Buparlisib), in Entwicklung, klinischer Erprobung und bereits zugelassener Anwendung befinden (Martini et al. 2013; Wander et al. 2011). In dieser Arbeit wurde eine umfangreiche Charakterisierung von den verschiedenen Subtypen repräsentierenden Mammakarzinomzelllinien vorgenommen, in der sich kohärent mit bisher veröffentlichen Arbeiten ein sehr heterogenes Ansprechen auf die Behandlung mit den Inhibitoren zeigte. Besonders für die Hormonrezeptor-positiven und *HER2/neu*-überexprimierenden Zellen konnte hier ein benefitäres Ergebnis erzielt werden.

Eine Aktivierung der PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade ist mit der Ausbildung eines proinvasiven M2-Phänotyps von im Mikromilieu befindlichen TAM assoziiert (Weichhart und Säemann 2008; Xie et al. 2014b). Dass durch die Hemmung von Mitgliedern des Signalwegs über eine potenzielle Reedukation von TAM auch Potential für eine Tumorregression besteht und sich dadurch eine bedeutende therapeutische Option ergibt, ist allerdings noch weitgehend unerkannt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen direkten Einfluss der Inhibitoren auf TAM in mit den Tumorzellen vergleichbaren Konzentrationsbereichen. In bisher veröffentlichen *in vivo*-Studien ging
die medikamentöse Blockierung des Signalwegs mit der Induktion des M1-Profils in den TAM einher (Chen et al. 2012; Mercalli et al. 2013; Polumuri et al. 2007). In dieser Arbeit konnte schließlich erstmals gezeigt werden, dass sich die Makrophagenassistierte Invasion von hochmalignen murinen Brustkrebszellen durch die Behandlung mit den Inhibitoren reduzieren lässt.

Nur sehr wenige Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit den tumorprogressionsfördernden Eigenschaften sessiler Makrophagenspezies. Einzelne Hinweise deuten aktuell stark darauf hin, dass bedeutende Funktionen in Mikroglia über den Signalweg gesteuert werden. Auch auf diese Zellen fand sich in ersten Ergebnissen ein direkter Einfluss durch die Inhibitoren. In weiterführenden Versuchen konnte die Arbeitsgruppe PI3K letztlich als einen Hauptregulator der Mikroglia-assistierten Kolonisation ausfindig machen und durch die medikamentöse Blockade eine Reduktion dieser Metastasen-unterstützenden Funktion beobachten (Blazquez et al. 2018).

Zusammenfassend kann hiermit postuliert werden, dass sich durch die Hemmung des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs nicht nur ein direkter Einfluss auf Tumorzellen, sondern auch ein indirekter über die Beeinflussung des Mikromilieus von Primarius und Metastasenorgan findet und sich somit ein großes Potential dieser Inhibitoren in der antimetastatischen Therapie ergibt.

6 Literaturverzeichnis

- Aebi S, Davidson T, Gruber G, Castiglione M (2010): Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 21, v9-14
- Aksoy E, Vanden Berghe W, Detienne S, Amraoui Z, Fitzgerald KA, Haegeman G, Goldman M, Willems F (2005): Inhibition of phosphoinositide 3-kinase enhances TRIF-dependent NF-kappa B activation and IFN-beta synthesis downstream of Toll-like receptor 3 and 4. Eur J Immunol <u>35</u>, 2200–2209
- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P (1997): Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. Curr Biol <u>7</u>, 261– 269
- André F, O'Regan R, Ozguroglu M, Toi M, Xu B, Jerusalem G, Masuda N, Wilks S, Arena F, Isaacs C et al. (2014): Everolimus for women with trastuzumabresistant, HER2-positive, advanced breast cancer (BOLERO-3): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. Lancet Oncol <u>15</u>, 580–591
- Arbibe L, Mira JP, Teusch N, Kline L, Guha M, Mackman N, Godowski PJ, Ulevitch RJ, Knaus UG (2000): Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. Nat Immunol <u>1</u>, 533–540
- Armstrong AC, Clay V (2019): Olaparib in germline-mutated metastatic breast cancer: implications of the OlympiAD trial. Future Oncol <u>15</u>, 2327–2335
- Ayub A, Yip WK, Seow HF (2015): Dual treatments targeting IGF-1R, PI3K, mTORC or MEK synergize to inhibit cell growth, induce apoptosis, and arrest cell cycle at G1 phase in MDA-MB-231 cell line. Biomed Pharmacother <u>75</u>, 40–50
- Balkwill F, Mantovani A (2001): Inflammation and cancer: back to Virchow? Lancet <u>357</u>, 539–545
- Bartsch R, Bergen E (2018): ASCO 2018: highlights in HER2-positive metastatic breast cancer. Memo <u>11</u>, 280–283

- Baselga J, Campone M, Piccart M, Burris HA, Rugo HS, Sahmoud T, Noguchi S,
 Gnant M, Pritchard KI, Lebrun F et al. (2012): Everolimus in postmenopausal
 hormone-receptor-positive advanced breast cancer. N Engl J Med <u>366</u>, 520– 529
- Baselga J, Cortés J, Im SA, Clark E, Ross G, Kiermaier A, Swain SM (2014):
 Biomarker analyses in CLEOPATRA: a phase III, placebo-controlled study of pertuzumab in human epidermal growth factor receptor 2-positive, first-line metastatic breast cancer. J Clin Oncol <u>32</u>, 3753–3761
- Baselga J, Im S-A, Iwata H, Cortés J, Laurentiis M de, Jiang Z, Arteaga CL, Jonat W, Clemons M, Ito Y et al. (2017): Buparlisib plus fulvestrant versus placebo plus fulvestrant in postmenopausal, hormone receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (BELLE-2): a randomised, double-blind, placebocontrolled, phase 3 trial. Lancet Oncol <u>18</u>, 904–916
- Bayón LG, Izquierdo MA, Sirovich I, van Rooijen N, Beelen RH, Meijer S (1996):
 Role of Kupffer cells in arresting circulating tumor cells and controlling
 metastatic growth in the liver. Hepatology <u>23</u>, 1224–1231
- Bedard PL, Cardoso F, Piccart-Gebhart MJ (2009): Stemming Resistance to HER-2 Targeted Therapy. J Mammary Gland Biol Neoplasia <u>14</u>, 55–66
- Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, Madiredjo M, Hijmans EM, Beelen K, Linn SC, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Hauptmann M et al. (2007): A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. Cancer Cell <u>12</u>, 395–402
- Beuvink I, Boulay A, Fumagalli S, Zilbermann F, Ruetz S, O'Reilly T, Natt F, Hall J,
 Lane HA, Thomas G (2005): The mTOR inhibitor RAD001 sensitizes tumor
 cells to DNA-damaged induced apoptosis through inhibition of p21 translation.
 Cell <u>120</u>, 747–759
- Blazquez R, Sparrer D, Wendl C, Evert M, Riemenschneider MJ, Krahn MP, Erez N, Proescholdt M, Pukrop T (2020): The macro-metastasis/organ parenchyma interface (MMPI) - A hitherto unnoticed area. Semin Cancer Biol <u>60</u>, 324–333

- Blazquez R, Wlochowitz D, Wolff A, Seitz S, Wachter A, Perera-Bel J, Bleckmann A, Beissbarth T, Salinas G, Riemenschneider MJ et al. (2018): PI3K: A master regulator of brain metastasis-promoting macrophages/microglia. Glia <u>66</u>, 2438–2455
- Board RE, Thelwell NJ, Ravetto PF, Little S, Ranson M, Dive C, Hughes A, Whitcombe D (2008): Multiplexed assays for detection of mutations in PIK3CA. Clin Chem <u>54</u>, 757–760
- Boulay A, Rudloff J, Ye J, Zumstein-Mecker S, O'Reilly T, Evans DB, Chen S, Lane HA (2005): Dual inhibition of mTOR and estrogen receptor signaling in vitro induces cell death in models of breast cancer. Clin Cancer Res <u>11</u>, 5319–5328
- Brana I, Siu LL (2012): Clinical development of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors for cancer treatment. BMC Med <u>10</u>, 550
- Brastianos PK, Carter SL, Santagata S, Cahill DP, Taylor-Weiner A, Jones RT, van Allen EM, Lawrence MS, Horowitz PM, Cibulskis K et al. (2015): Genomic Characterization of Brain Metastases Reveals Branched Evolution and Potential Therapeutic Targets. Cancer Discov <u>5</u>, 1164–1177
- Brufsky AM (2015): Delaying Chemotherapy in the Treatment of Hormone Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Advanced Breast Cancer. Clin Med Insights Oncol <u>9</u>, 137–147
- Buck E, Eyzaguirre A, Brown E, Petti F, McCormack S, Haley JD, Iwata KK, Gibson NW, Griffin G (2006): Rapamycin synergizes with the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib in non-small-cell lung, pancreatic, colon, and breast tumors. Mol Cancer Ther <u>5</u>, 2676–2684
- Byles V, Covarrubias AJ, Ben-Sahra I, Lamming DW, Sabatini DM, Manning BD, Horng T (2013): The TSC-mTOR pathway regulates macrophage polarization. Nat Comms <u>4</u>, 2834
- Cameron D, Casey M, Press M, Lindquist D, Pienkowski T, Romieu CG, Chan S, Jagiello-Gruszfeld A, Kaufman B, Crown J et al. (2008): A phase III randomized comparison of lapatinib plus capecitabine versus capecitabine alone in women with advanced breast cancer that has progressed on trastuzumab: updated efficacy and biomarker analyses. Breast Cancer Res Treat <u>112</u>, 533–543

- Cancer Genome Atlas Network (2012): Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. Nature <u>490</u>, 61–70
- Cantley LC (2002): The phosphoinositide 3-kinase pathway. Science <u>296</u>, 1655– 1657
- Cassetta L, Cassol E, Poli G (2011): Macrophage Polarization in Health and Disease. ScientificWorldJournal <u>11</u>, 2391–2402
- Chakrabarty A, Sánchez V, Kuba MG, Rinehart C, Arteaga CL (2012): Feedback upregulation of HER3 (ErbB3) expression and activity attenuates antitumor effect of PI3K inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A <u>109</u>, 2718–2723
- Chan TO, Rittenhouse SE, Tsichlis PN (1999): AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositidedependent phosphorylation. Annu Rev Biochem <u>68</u>, 965–1014
- Chandarlapaty S, Sakr RA, Giri D, Patil S, Heguy A, Morrow M, Modi S, Norton L, Rosen N, Hudis C et al. (2012): Frequent mutational activation of the PI3K-AKT pathway in trastuzumab-resistant breast cancer. Clin Cancer Res <u>18</u>, 6784–6791
- Chandarlapaty S, Sawai A, Scaltriti M, Rodrik-Outmezguine V, Grbovic-Huezo O, Serra V, Majumder PK, Baselga J, Rosen N (2011): AKT Inhibition Relieves Feedback Suppression of Receptor Tyrosine Kinase Expression and Activity. Cancer Cell <u>19</u>, 58–71
- Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N (2014): Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. Cancers <u>6</u>, 1670–1690
- Chen G, Chakravarti N, Aardalen K, Lazar AJ, Tetzlaff MT, Wubbenhorst B, Kim S-B, Kopetz S, Ledoux AA, Gopal YNV et al. (2014): Molecular profiling of patientmatched brain and extracranial melanoma metastases implicates the PI3K pathway as a therapeutic target. Clin Cancer Res <u>20</u>, 5537–5546
- Chen J, Zheng XF, Brown EJ, Schreiber SL (1995): Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycinassociated protein and characterization of a critical serine residue. Proc Natl Acad Sci U S A <u>92</u>, 4947–4951

- Chen W, Hoffmann AD, Liu H, Liu X (2018): Organotropism: new insights into molecular mechanisms of breast cancer metastasis. NPJ Precis Oncol <u>2</u>, 1–12
- Chen W, Ma T, Shen X, Xia X, Xu G, Bai X, Liang T (2012): Macrophage-induced tumor angiogenesis is regulated by the TSC2-mTOR pathway. Cancer Res <u>72</u>, 1363–1372
- Choi J, Chen J, Schreiber SL, Clardy J (1996): Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. Science <u>273</u>, 239–242
- Chuang H, Lohaus R, Hanisch UK, Binder C, Dehghani F, Pukrop T (2013): Coculture system with an organotypic brain slice and 3D spheroid of carcinoma cells. J Vis Exp
- Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Lieberman G et al. (1999): Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. J Clin Oncol <u>17</u>, 2639–2648
- Coscia M, Quaglino E, Iezzi M, Curcio C, Pantaleoni F, Riganti C, Holen I, Monkkonen H, Boccadoro M, Forni G et al. (2010): Zoledronic acid repolarizes tumour-associated macrophages and inhibits mammary carcinogenesis by targeting the mevalonate pathway. J Cell Mol Med <u>14</u>, 2803–2815
- Costa C, Germena G, Hirsch E (2010): Dissection of the interplay between class I PI3Ks and Rac signaling in phagocytic functions. ScientificWorldJournal <u>10</u>, 1826–1839
- Coughlin CM, Johnston DS, Strahs A, Burczynski ME, Bacus S, Hill J, Feingold JM, Zacharchuk C, Berkenblit A (2010): Approaches and limitations of phosphatidylinositol-3-kinase pathway activation status as a predictive biomarker in the clinical development of targeted therapy. Breast Cancer Res Treat <u>124</u>, 1–11
- Coward J, Kulbe H, Chakravarty P, Leader D, Vassileva V, Leinster DA, Thompson R, Schioppa T, Nemeth J, Vermeulen J et al. (2011): Interleukin-6 as a therapeutic target in human ovarian cancer. Clin Cancer Res <u>17</u>, 6083–6096

- Crowder RJ, Phommaly C, Tao Y, Hoog J, Luo J, Perou CM, Parker JS, Miller MA, Huntsman DG, Lin L et al. (2009): PIK3CA and PIK3CB inhibition produce synthetic lethality when combined with estrogen deprivation in estrogen receptor-positive breast cancer. Cancer Res <u>69</u>, 3955–3962
- Dello Russo C, Lisi L, Feinstein DL, Navarra P (2013): mTOR kinase, a key player in the regulation of glial functions: relevance for the therapy of multiple sclerosis. Glia <u>61</u>, 301–311
- Dello Russo C, Lisi L, Tringali G, Navarra P (2009): Involvement of mTOR kinase in cytokine-dependent microglial activation and cell proliferation. Biochem Pharmacol (Biochemical Pharmacology) <u>78</u>, 1242–1251
- Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE (2009): Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. Journal of Interferon & Cytokine Research 29, 313–326
- Di Leo A, Ciruelos E, Janni W, Lonning PE, O'Regan R, Hubalek M, Csõszi T, Decker T, Tjan-Heijnen VC, Weber D et al. (2015): BELLE-3: A Phase III study of the pan-phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor buparlisib (BKM120) with fulvestrant in postmenopausal women with HR+/HER2– locally advanced/metastatic breast cancer (BC) pretreated with aromatase inhibitors (AIs) and refractory to mTOR inhibitor (mTORi)-based treatment. JCO <u>33</u>, TPS626
- Dos Santos S, Delattre AI, Longueville F de, Bult H, Raes M (2007): Gene expression profiling of LPS-stimulated murine macrophages and role of the NF-kappaB and PI3K/mTOR signaling pathways. Ann N Y Acad Sci <u>1096</u>, 70– 77
- Dowling RJ, Topisirovic I, Fonseca BD, Sonenberg N (2010): Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors. Biochim Biophys Acta <u>1804</u>, 433–439
- Dvorak HF, Weaver VM, TIsty TD, Bergers G (2011): Tumor microenvironment and progression. J Surg Oncol <u>103</u>, 468–474

- Eichhorn PJ, Gili M, Scaltriti M, Serra V, Guzman M, Nijkamp W, Beijersbergen RL, Valero V, Seoane J, Bernards R et al. (2008): Phosphatidylinositol 3-Kinase Hyperactivation Results in Lapatinib Resistance that Is Reversed by the mTOR/Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitor NVP-BEZ235. Cancer Res (Cancer research)hahh <u>68</u>, 9221–9230
- Eichler AF, Chung E, Kodack DP, Loeffler JS, Fukumura D, Jain RK (2011): The biology of brain metastases-translation to new therapies. Nat Rev Clin Oncol <u>8</u>, 344–356
- Fernandes MT, Adashek JJ, Barreto CMN, Spinosa ACB, Souza Gutierres B de, Lopes G, Del Giglio A, Aguiar PN (2018): A paradigm shift for the treatment of hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2negative (HR+/HER2-) advanced breast cancer: a review of CDK inhibitors. Drugs Context <u>7</u>, 212555
- Fidler IJ (1970): Metastasis: Quantitative Analysis of Distribution and Fate of Tumor Emboli Labeled With ¹²⁵I-5-Iodo-2' -deoxyuridine23. J Natl Cancer Inst <u>45</u>, 773–782
- Fidler IJ (2002): The organ microenvironment and cancer metastasis. Differentiation <u>70</u>, 498–505
- Franco R, Fernández-Suárez D (2015): Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. Prog Neurobiol <u>131</u>, 65–86
- Fukao T, Tanabe M, Terauchi Y, Ota T, Matsuda S, Asano T, Kadowaki T, Takeuchi T, Koyasu S (2002): PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs. Nat Immunol <u>3</u>, 875–881
- Gazzaniga S, Bravo AI, Guglielmotti A, van Rooijen N, Maschi F, Vecchi A, Mantovani A, Mordoh J, Wainstok R (2007): Targeting Tumor-Associated Macrophages and Inhibition of MCP-1 Reduce Angiogenesis and Tumor Growth in a Human Melanoma Xenograft. Journal of Investigative Dermatology <u>127</u>, 2031–2041
- Gil-Gil MJ, Martinez-Garcia M, Sierra A, Conesa G, Del Barco S, Gonzalez-Jimenez S, Villa S (2014): Breast cancer brain metastases: a review of the literature and a current multidisciplinary management guideline. Clin Transl Oncol <u>16</u>, 436–446

- Giulian D, Baker TJ (1986): Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. J Neurosci <u>6</u>, 2163–2178
- Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn H-J (2011): Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. Ann Oncol <u>22</u>, 1736–1747
- González-García A, Sánchez-Ruiz J, Flores JM, Carrera AC (2010):
 Phosphatidylinositol 3-kinase gamma inhibition ameliorates inflammation and tumor growth in a model of colitis-associated cancer. Gastroenterology <u>138</u>, 1374–1383
- Gorden DL, Fingleton B, Crawford HC, Jansen DE, Lepage M, Matrisian LM (2007): Resident stromal cell-derived MMP-9 promotes the growth of colorectal metastases in the liver microenvironment. Int J Cancer <u>121</u>, 495–500
- Goto W, Kashiwagi S, Takada K, Asano Y, Takahashi K, Fujita H, Takashima T, Tomita S, Hirakawa K, Ohira M (2018): Significance of intrinsic breast cancer subtypes on the long-term prognosis after neoadjuvant chemotherapy. J Transl Med <u>16</u>, 307
- Guha M, Mackman N (2002): The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. J Biol Chem <u>277</u>, 32124– 32132
- Hagemann T, Robinson SC, Schulz M, Trümper L, Balkwill FR, Binder C (2004):
 Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. Carcinogenesis <u>25</u>, 1543–1549
- Hanahan D, Weinberg RA (2000): The hallmarks of cancer. Cell 100, 57-70
- Hanahan D, Weinberg RA (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. Cell <u>144</u>, 646–674
- Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, Ruddy K, Tsang J, Cardoso F (2019): Breast cancer. Nat Rev Dis Primers <u>5</u>, 66

- Harding MW, Galat A, Uehling DE, Schreiber SL (1989): A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. Nature 341, 758–760
- Harper KL, Sosa MS, Entenberg D, Hosseini H, Cheung JF, Nobre R, Avivar-Valderas A, Nagi C, Girnius N, Davis RJ et al. (2016): Mechanism of early dissemination and metastasis in Her2+ mammary cancer. Nature <u>540</u>, 588– 592
- Heuff G, Oldenburg HS, Boutkan H, Visser JJ, Beelen RH, van Rooijen N, Dijkstra CD, Meyer S (1993): Enhanced tumour growth in the rat liver after selective elimination of Kupffer cells. Cancer Immunol Immunother <u>37</u>, 125–130
- Hoon Tan P, Ellis I, Allison K, Brogi E, Fox SB, Lakhani S, Lazar AJ, Morris EA, Sahin A, Salgado R et al. (2020): The 2019 WHO classification of tumours of the breast. Histopathology
- Hosseini H, Obradović MMS, Hoffmann M, Harper KL, Sosa MS, Werner-Klein M, Nanduri LK, Werno C, Ehrl C, Maneck M et al. (2016): Early dissemination seeds metastasis in breast cancer. Nature <u>540</u>
- Hu L, Hofmann J, Lu Y, Mills GB, Jaffe RB (2002): Inhibition of phosphatidylinositol
 3'-kinase increases efficacy of paclitaxel in in vitro and in vivo ovarian cancer
 models. Cancer Res <u>62</u>, 1087–1092
- Hu Y, Yu X, Xu G, Liu S (2017): Metastasis: an early event in cancer progression. J Cancer Res Clin Oncol <u>143</u>, 745–757
- Huang CH, Mandelker D, Schmidt-Kittler O, Samuels Y, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Gabelli SB, Amzel LM (2007): The structure of a human p110alpha/p85alpha complex elucidates the effects of oncogenic PI3Kalpha mutations. Science <u>318</u>, 1744–1748
- Hurvitz SA, Andre F, Jiang Z, Shao Z, Mano MS, Neciosup SP, Tseng L-M, Zhang Q, Shen K, Liu D et al. (2015): Combination of everolimus with trastuzumab plus paclitaxel as first-line treatment for patients with HER2-positive advanced breast cancer (BOLERO-1): a phase 3, randomised, double-blind, multicentre trial. Lancet Oncol <u>16</u>, 816–829

- Hurvitz SA, Dalenc F, Campone M, O'Regan RM, Tjan-Heijnen VC, Gligorov J, Llombart A, Jhangiani H, Mirshahidi HR, Tan-Chiu E et al. (2013): A phase 2 study of everolimus combined with trastuzumab and paclitaxel in patients with HER2-overexpressing advanced breast cancer that progressed during prior trastuzumab and taxane therapy. Breast Cancer Res Treat <u>141</u>, 437–446
- Jones BW, Heldwein KA, Means TK, Saukkonen JJ, Fenton MJ (2001): Differential roles of Toll-like receptors in the elicitation of proinflammatory responses by macrophages. Ann Rheum Dis <u>60</u>, iii6-12
- Kaneda MM, Messer KS, Ralainirina N, Li H, Leem CJ, Gorjestani S, Woo G, Nguyen AV, Figueiredo CC, Foubert P et al. (2016): PI3Kγ is a molecular switch that controls immune suppression. Nature 539, 437–442
- Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA et al. (2005): VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. Nature <u>438</u>, 820–827
- Kataoka Y, Mukohara T, Shimada H, Saijo N, Hirai M, Minami H (2010): Association between gain-of-function mutations in PIK3CA and resistance to HER2-targeted agents in HER2-amplified breast cancer cell lines. Ann Oncol <u>21</u>, 255–262
- Kaufmann M, Pusztai L (2011): Use of standard markers and incorporation of molecular markers into breast cancer therapy: Consensus recommendations from an International Expert Panel. Cancer <u>117</u>, 1575–1582
- Kimbung S, Loman N, Hedenfalk I (2015): Clinical and molecular complexity of breast cancer metastases. Semin Cancer Biol <u>35</u>, 85–95
- King CR, Kraus MH, Aaronson SA (1985): Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. Science <u>229</u>, 974–976
- Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA (2017): EMERGING BIOLOGICAL PRINCIPLES OF METASTASIS. Cell <u>168</u>, 670–691
- Laplante M, Sabatini DM (2012): mTOR signaling in growth control and disease. Cell <u>149</u>, 274–293

- Largillier R, Ferrero J-M, Doyen J, Barriere J, Namer M, Mari V, Courdi A, Hannoun-Levi JM, Ettore F, Birtwisle-Peyrottes I et al. (2008): Prognostic factors in 1,038 women with metastatic breast cancer. Ann Oncol 19, 2012–2019
- Lee JJX, Loh K, Yap YS (2015): PI3K/Akt/mTOR inhibitors in breast cancer. Cancer Biol Med <u>12</u>, 342–354
- Lee YT (1983): Breast carcinoma: pattern of metastasis at autopsy. J Surg Oncol <u>23</u>, 175–180
- Lee-Hoeflich ST, Crocker L, Yao E, Pham T, Munroe X, Hoeflich KP, Sliwkowski MX, Stern HM (2008): A Central Role for HER3 in HER2-Amplified Breast Cancer: Implications for Targeted Therapy. Cancer Res <u>68</u>, 5878–5887
- Leek RD, Harris AL (2002): Tumor-associated macrophages in breast cancer. J Mammary Gland Biol Neoplasia <u>7</u>, 177–189
- Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL (1996): Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. Cancer Res <u>56</u>, 4625–4629
- Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, Pietenpol JA (2011): Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. J Clin Invest <u>121</u>, 2750–2767
- Leung EY, Askarian-Amiri M, Finlay GJ, Rewcastle GW, Baguley BC (2015): Potentiation of Growth Inhibitory Responses of the mTOR Inhibitor Everolimus by Dual mTORC1/2 Inhibitors in Cultured Breast Cancer Cell Lines. PLoS One <u>10</u>, e0131400
- Lewis CE, Pollard JW (2006): Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. Cancer Res <u>66</u>, 605–612
- Lewis PGD, Li G, Dugger DL, Crocker LM, Parsons KL, Mai E, Blättler WA, Lambert JM, Chari RV, Lutz RJ et al. (2008): Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. Cancer Res <u>68</u>

- Li D, Wang C, Yao Y, Chen L, Liu G, Zhang R, Liu Q, Shi F-D, Hao J (2016): mTORC1 pathway disruption ameliorates brain inflammation following stroke via a shift in microglia phenotype from M1 type to M2 type. FASEB J <u>30</u>, 3388–3399
- Liedtke C, Kiesel L (2012): Breast cancer molecular subtypes--modern therapeutic concepts for targeted therapy of a heterogeneous entity. Maturitas <u>73</u>, 288–294
- Lin NU, Bellon JR, Winer EP (2004): CNS metastases in breast cancer. J Clin Oncol <u>22</u>, 3608–3617
- Lisi L, Laudati E, Navarra P, Dello Russo C (2014a): The mTOR kinase inhibitors polarize glioma-activated microglia to express a M1 phenotype. J Neuroinflammation <u>11</u>, 125
- Lisi L, Stigliano E, Lauriola L, Navarra P, Dello Russo C (2014b): Proinflammatoryactivated glioma cells induce a switch in microglial polarization and activation status, from a predominant M2b phenotype to a mixture of M1 and M2a/B polarized cells. ASN Neuro <u>6</u>, 171–183
- Liu H, Zang C, Schefe JH, Schwarzlose-Schwarck S, Regierer AC, Elstner E, Schulz CO, Scholz C, Possinger K, Eucker J (2011): The mTOR inhibitor RAD001 sensitizes tumor cells to the cytotoxic effect of carboplatin in breast cancer in vitro. Anticancer Res <u>31</u>, 2713–2722
- Liu Y, Zhang X, Liu J, Hou G, Zhang S, Zhang J (2014a): Everolimus in combination with letrozole inhibit human breast cancer MCF-7/Aro stem cells via PI3K/mTOR pathway: an experimental study. Tumour Biol 35, 1275–1286
- Liu Y-R, Jiang Y-Z, Zuo W-J, Yu K-D, Shao Z-M (2014b): PIK3CA mutations define favorable prognostic biomarkers in operable breast cancer: a systematic review and meta-analysis. Onco Targets Ther 7, 543–552
- Loibl S, La Pena L de, Nekljudova V, Zardavas D, Michiels S, Denkert C, Rezai M, Bermejo B, Chin LS, Turri S et al. (2015): Phase II, randomized, parallelcohort study of neoadjuvant buparlisib (BKM120) in combination with trastuzumab and paclitaxel in women with HER2-positive, PIK3CA mutant and PIK3CA wild-type primary breast cancer – NeoPHOEBE. San Antonio Breast Cancer Symposium, Abstract P1-14-01

- Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem <u>193</u>, 265–275
- Maehama T, Dixon JE (1998): The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5trisphosphate. J Biol Chem 273, 13375–13378
- Maira M, Schnell C, Lollini P, Chouaid C, Schmid P, Nanni P, Lam D, Tomaso ED,
 Massacesi C, Rodon J (2012a): Preclinical and preliminary clinical activity of
 NVP-BKM120, an oral pan-class I PI3K inhibitor, in the brain. Ann Oncol <u>23</u>,
 537
- Maira SM, Pecchi S, Huang A, Burger M, Knapp M, Sterker D, Schnell C, Guthy D, Nagel T, Wiesmann M et al. (2012b): Identification and characterization of NVP-BKM120, an orally available pan-class I PI3-kinase inhibitor. Mol Cancer Ther <u>11</u>, 317–328
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004): The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol <u>25</u>, 677–686
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A (2002): Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. Trends Immunol <u>23</u>, 549–555
- Marino N, Woditschka S, Reed LT, Nakayama J, Mayer M, Wetzel M, Steeg PS (2013): Breast cancer metastasis: issues for the personalization of its prevention and treatment. Am J Pathol <u>183</u>, 1084–1095
- Markman B, Atzori F, Pérez-García J, Tabernero J, Baselga J (2010a): Status of PI3K inhibition and biomarker development in cancer therapeutics. Ann Oncol <u>21</u>, 683–691
- Markman B, Dienstmann R, Tabernero J (2010b): Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway--beyond rapalogs. Oncotarget <u>1</u>, 530–543
- Martin M, Schifferle RE, Cuesta N, Vogel SN, Katz J, Michalek SM (2003): Role of the phosphatidylinositol 3 kinase-Akt pathway in the regulation of IL-10 and IL-12 by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide. J Immunol <u>171</u>, 717–725

- Martinez FO, Helming L, Gordon S (2009): Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. Annu Rev Immunol <u>27</u>, 451–483
- Martínez-Sáez O, Chic N, Pascual T, Adamo B, Vidal M, González-Farré B, Sanfeliu E, Schettini F, Conte B, Brasó-Maristany F et al. (2020): Frequency and spectrum of PIK3CA somatic mutations in breast cancer. Breast Cancer Res 22
- Martini M, Ciraolo E, Gulluni F, Hirsch E (2013): Targeting PI3K in Cancer: Any Good News? Front Oncol <u>3</u>, 108
- Massagué J (2008): TGFbeta in cancer. Cell 134, 215-230
- Massagué J, Obenauf AC (2016): Metastatic colonization by circulating tumour cells. Nature <u>529</u>, 298–306
- Massarweh S, Osborne CK, Creighton CJ, Qin L, Tsimelzon A, Huang S, Weiss H, Rimawi M, Schiff R (2008): Tamoxifen resistance in breast tumors is driven by growth factor receptor signaling with repression of classic estrogen receptor genomic function. Cancer Res <u>68</u>, 826–833
- Mavratzas A, Seitz J, Smetanay K, Schneeweiss A, Jäger D, Fremd C (2020): Atezolizumab for use in PD-L1-positive unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer. Future Oncol <u>16</u>, 4439–4453
- Menck K, Behme D, Pantke M, Reiling N, Binder C, Pukrop T, Klemm F (2014):
 Isolation of human monocytes by double gradient centrifugation and their differentiation to macrophages in teflon-coated cell culture bags. J Vis Exp, e51554
- Mercalli A, Calavita I, Dugnani E, Citro A, Cantarelli E, Nano R, Melzi R, Maffi P, Secchi A, Sordi V et al. (2013): Rapamycin unbalances the polarization of human macrophages to M1. Immunologypa <u>140</u>, 179–190
- Miller TW, Hennessy BT, González-Angulo AM, Fox EM, Mills GB, Chen H, Higham C, García-Echeverría C, Shyr Y, Arteaga CL (2010): Hyperactivation of phosphatidylinositol-3 kinase promotes escape from hormone dependence in estrogen receptor–positive human breast cancer. J Clin Invest <u>120</u>, 2406– 2413

- Miller TW, Rexer BN, Garrett JT, Arteaga CL (2011): Mutations in the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role in tumor progression and therapeutic implications in breast cancer. Breast Cancer Res <u>13</u>, 224
- Mosele F, Stefanovska B, Lusque A, Tran Dien A, Garberis I, Droin N, Le Tourneau C, Sablin M-P, Lacroix L, Enrico D et al. (2020): Outcome and molecular landscape of patients with PIK3CA-mutated metastatic breast cancer. Ann Oncol <u>31</u>, 377–386
- Mosmann T (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods <u>65</u>, 55– 63
- Mosser DM (2003): The many faces of macrophage activation. J Leukoc Biol <u>73</u>, 209–212
- Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE (2004): Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. Blood <u>104</u>, 2224–2234
- Nagata Y, Lan Kh, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, Klos KS, Li P, Monia BP, Nguyen NT et al. (2004): PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. Cancer Cell <u>6</u>, 117–127
- Nanni P, Nicoletti G, Palladini A, Croci S, Murgo A, Ianzano ML, Grosso V, Stivani V, Antognoli A, Lamolinara A et al. (2012): Multiorgan Metastasis of Human HER-2+ Breast Cancer in Rag2–/–;Il2rg–/– Mice and Treatment with PI3K Inhibitor. PLoS ONE <u>7</u>, e39626
- Nardin A, Abastado JP (2008): Macrophages and cancer. Front Biosci <u>13</u>, 3494– 3505
- Navé BT, Ouwens M, Withers DJ, Alessi DR, Shepherd PR (1999): Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. Biochem J <u>344</u>, 427–431

- O'Regan R, Ozguroglu M, Andre F, Toi M, Jerusalem G, Heinrich M, Wilks S, Isaacs C, Xu B, Masuda N et al. (2013): Phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial of daily everolimus plus weekly trastuzumab and vinorelbine in trastuzumab-resistant, advanced breast cancer (BOLERO-3). J Clin Oncol 31 (Suppl.), Abstract 505
- O'Reilly KE, Rojo F, She Q, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL et al. (2006): mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. Cancer Res <u>66</u>, 1500–1508
- O'Reilly T, McSheehy PMJ, Kawai R, Kretz O, McMahon L, Brueggen J, Bruelisauer A, Gschwind H-P, Allegrini PR, Lane HA (2010): Comparative pharmacokinetics of RAD001 (everolimus) in normal and tumor-bearing rodents. Cancer Chemother Pharmacol <u>65</u>, 625–639
- Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ (2016): Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. Br J Pharmacol <u>173</u>, 649–665
- O'Sullivan C, Lewis CE (1994): Tumour-associated leucocytes: friends or foes in breast carcinoma. J Pathol <u>172</u>, 229–235
- O'Sullivan C, Lewis CE, Harris AL, McGee JO (1993): Secretion of epidermal growth factor by macrophages associated with breast carcinoma. Lancet <u>342</u>, 148– 149
- Paget S (1889): The distribution of secondary growths in cancer of the breast. Lancet <u>1</u>, 571–573
- Pang B, Cheng S, Sun S-P, An C, Liu Z-Y, Feng X, Liu G-J (2014): Prognostic role of PIK3CA mutations and their association with hormone receptor expression in breast cancer: a meta-analysis. Sci Rep <u>4</u>, 6255s
- Pelletier EM, Shim B, Goodman S, Amonkar MM (2008): Epidemiology and economic burden of brain metastases among patients with primary breast cancer: results from a US claims data analysis. Breast Cancer Res Treat <u>108</u>, 297–305
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA et al. (2000): Molecular portraits of human breast tumours. Nature <u>406</u>, 747–752

- Pestalozzi BC (2009): Brain metastases and subtypes of breast cancer. Ann Oncol <u>20</u>, 803–805
- Pollard JW (2004): Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. Nat Rev Cancer <u>4</u>, 71–78
- Polumuri SK, Toshchakov VY, Vogel SN (2007): Role of phosphatidylinositol-3 kinase in transcriptional regulation of TLR-induced IL-12 and IL-10 by Fc gamma receptor ligation in murine macrophages. J Immunol <u>179</u>, 236–246
- Poste G, Fidler IJ (1980): The pathogenesis of cancer metastasis. Nature <u>283</u>, 139– 146
- Powis G, Hill SR, Frew TJ, Sherrill KW (1995): Inhibitors of phospholipid intracellular signaling as antiproliferative agents. Med Res Rev <u>15</u>, 121–138
- Pukrop T, Dehghani F, Chuang HN, Lohaus R, Bayanga K, Heermann S, Regen T, van Rossum D, Klemm F, Schulz M et al. (2010): Microglia promote colonization of brain tissue by breast cancer cells in a Wnt-dependent way. Glia 58, 1477–1489
- Pukrop T, Klemm F, Hagemann T, Gradl D, Schulz M, Siemes S, Trumper L, Binder C (2006): Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines. Proc Natl Acad Sci U S A <u>103</u>, 5454–5459
- Qian B-Z, Pollard JW (2010): Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. Cell <u>141</u>, 39–51
- Razis E, Bobos M, Kotoula V, Eleftheraki AG, Kalofonos HP, Pavlakis K, Papakostas P, Aravantinos G, Rigakos G, Efstratiou I et al. (2011): Evaluation of the association of PIK3CA mutations and PTEN loss with efficacy of trastuzumab therapy in metastatic breast cancer. Breast Cancer Res Treat <u>128</u>, 447–456
- Regen T, van Rossum D, Scheffel J, Kastriti ME, Revelo NH, Prinz M, Bruck W,
 Hanisch UK (2011): CD14 and TRIF govern distinct responsiveness and
 responses in mouse microglial TLR4 challenges by structural variants of LPS.
 Brain Behav Immun <u>25</u>, 957–970

- Reiling N, Klug K, Krallmann-Wenzel U, Laves R, Goyert S, Taylor ME, Lindhorst TK, Ehlers S (2001): Complex encounters at the macrophage-mycobacterium interface: studies on the role of the mannose receptor and CD14 in experimental infection models with Mycobacterium avium. Immunobiology 204, 558–571
- Rietkötter E, Menck K, Bleckmann A, Farhat K, Schaffrinski M, Schulz M, Hanisch UK, Binder C, Pukrop T (2013): Zoledronic acid inhibits macrophage/microgliaassisted breast cancer cell invasion. Oncotarget <u>4</u>, 1449–1460
- Rocher C, Singla DK (2013): SMAD-PI3K-Akt-mTOR Pathway Mediates BMP-7 Polarization of Monocytes into M2 Macrophages. PLoS ONE <u>8</u>, e84009
- Rossi JF, Lu ZY, Jourdan M, Klein B (2015): Interleukin-6 as a therapeutic target. Clin Cancer Res <u>21</u>, 1248–1257
- Rostami R, Mittal S, Rostami P, Tavassoli F, Jabbari B (2016): Brain metastasis in breast cancer: a comprehensive literature review. J Neurooncol <u>127</u>, 407–414
- Russnes HG, Lingjærde OC, Børresen-Dale AL, Caldas C (2017): Breast Cancer Molecular Stratification: From Intrinsic Subtypes to Integrative Clusters. The American journal of pathology <u>187</u>
- Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, Oppenheim JJ, Murphy WJ (2000): Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. Blood <u>96</u>, 34–40
- Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ et al. (2004): High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. Science <u>304</u>, 554
- Sanchez CG, Ma CX, Crowder RJ, Guintoli T, Phommaly C, Gao F, Lin L, Ellis MJ (2011): Preclinical modeling of combined phosphatidylinositol-3-kinase inhibition with endocrine therapy for estrogen receptor-positive breast cancer. Breast Cancer Res <u>13</u>, R21
- Santa-Maria CA, Nye L, Mutonga MB, Jain S, Gradishar WJ (2016): Management of Metastatic HER2-Positive Breast Cancer: Where Are We and Where Do We Go From Here? Oncology (Williston Park) <u>30</u>, 148–155

- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005): Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. Science <u>307</u>, 1098–1101
- Schiavoni G, Gabriele L, Mattei F (2013): The tumor microenvironment: a pitch for multiple players. Front Oncol <u>3</u>, 90
- Schmelzle T, Hall MN (2000): TOR, a central controller of cell growth. Cell <u>103</u>, 253– 262
- Schmid MC, Avraamides CJ, Dippold HC, Franco I, Foubert P, Ellies LG, Acevedo LM, Manglicmot JRE, Song X, Wrasidlo W et al. (2011): Receptor tyrosine kinases and TLR/IL1Rs unexpectedly activate myeloid cell PI3kγ, a single convergent point promoting tumor inflammation and progression. Cancer Cell 19, 715–727
- Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, Diéras V, Hegg
 R, Im S-A, Shaw Wright G et al. (2018): Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in
 Advanced Triple-Negative Breast Cancer. N Engl J Med <u>379</u>, 2108–2121
- Schmid P, Cortes J, Pusztai L, McArthur H, Kümmel S, Bergh J, Denkert C, Park YH, Hui R, Harbeck N et al. (2020): Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. N Engl J Med <u>382</u>, 810–821
- Schmidt-Kittler O, Zhu J, Yang J, Liu G, Hendricks W, Lengauer C, Gabelli SB, Kinzler KW, Vogelstein B, Huso DL et al. (2010): PI3Kalpha inhibitors that inhibit metastasis. Oncotarget <u>1</u>, 339–348
- Schmitz F, Heit A, Dreher S, Eisenächer K, Mages J, Haas T, Krug A, Janssen K-P, Kirschning CJ, Wagner H (2008): Mammalian target of rapamycin (mTOR) orchestrates the defense program of innate immune cells. Eur J Immunol <u>38</u>, 2981–2992
- Seager Danciger J, Lutz M, Hama S, Cruz D, Castrillo A, Lazaro J, Phillips R, Premack B, Berliner J (2004): Method for large scale isolation, culture and cryopreservation of human monocytes suitable for chemotaxis, cellular adhesion assays, macrophage and dendritic cell differentiation. J Immunol Methods <u>288</u>, 123–134
- Sehgal SN, Baker H, Vezina C (1975): Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. J Antibiot (Tokyo) <u>28</u>, 727–732

- Sendur MAN, Zengin N, Aksoy S, Altundag K (2014): Everolimus: a new hope for patients with breast cancer. Curr Med Res Opin <u>30</u>, 75–87
- Serra V, Scaltriti M, Prudkin L, Eichhorn PJA, Ibrahim YH, Chandarlapaty S, Markman B, Rodriguez O, Guzman M, Rodriguez S et al. (2011): PI3K inhibition results in enhanced HER signaling and acquired ERK dependency in HER2-overexpressing breast cancer. Oncogene <u>30</u>, 2547–2557
- Shah M, Nunes MR, Stearns V (2018): CDK4/6 Inhibitors: Game Changers in the Management of Hormone Receptor–Positive Advanced Breast Cancer? Oncology (Williston Park) <u>32</u>, 216–222
- Shao M-m, Liu J, Vong JS, Niu Y, Germin B, Tang P, Chan AW, Lui PC, Law BK, Tan P-H et al. (2011): A subset of breast cancer predisposes to brain metastasis. Med Mol Morphol <u>44</u>, 15–20
- Shrivastava R, Asif M, Singh V, Dubey P, Ahmad Malik S, Lone M-U-D, Tewari BN, Baghel KS, Pal S, Nagar GK et al. (2019): M2 polarization of macrophages by Oncostatin M in hypoxic tumor microenvironment is mediated by mTORC2 and promotes tumor growth and metastasis. Cytokine <u>118</u>, 130–143
- Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P (2006): Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. Eur J Cancer <u>42</u>, 717– 727
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987): Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science <u>235</u>, 177–182
- Sobhani N, Generali D, Zanconati F, Bortul M, Scaggiante B (2018): Current status of PI3K-mTOR inhibition in hormone-receptor positive, HER2-negative breast cancer. World J Clin Oncol <u>9</u>, 172–179
- Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P (2009): Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. J Leukoc Biol <u>86</u>, 1065–1073

- Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS et al. (2001): Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 10869–10874
- Spano D, Zollo M (2012): Tumor microenvironment: a main actor in the metastasis process. Clin Exp Metastasis <u>29</u>, 381–395
- Steeg PS (2016): Targeting metastasis. Nat Rev Cancer 16, 201–218
- Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J (2005): Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. J Immunol <u>175</u>, 342–349
- Sturm JW, Magdeburg R, Berger K, Petruch B, Samel S, Bonninghoff R, Keese M, Hafner M, Post S (2003): Influence of TNFA on the formation of liver metastases in a syngenic mouse model. Int J Cancer <u>107</u>, 11–21
- Sugimoto Y, Whitman M, Cantley LC, Erikson RL (1984): Evidence that the Rous sarcoma virus transforming gene product phosphorylates phosphatidylinositol and diacylglycerol. Proc Natl Acad Sci U S A <u>81</u>, 2117–2121
- Szulzewsky F, Pelz A, Feng X, Synowitz M, Markovic D, Langmann T, Holtman IR, Wang X, Eggen BJL, Boddeke HWGM et al. (2015): Glioma-associated microglia/macrophages display an expression profile different from M1 and M2 polarization and highly express Gpnmb and Spp1. PLoS One <u>10</u>, e0116644
- Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL (2000): The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. Am J Pathol <u>157</u>, 411–421
- Tayyeb B, Parvin M (2014): Pathogenesis of breast cancer metastasis to brain: a comprehensive approach to the signaling network. Mol Neurobiol <u>53</u>, 446–454
- Thorpe LM, Yuzugullu H, Zhao JJ (2015): PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation, and therapeutic targeting. Nat Rev Cancer <u>15</u>, 7–24
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A <u>76</u>, 4350–4354

- Townson JL, Chambers AF (2006): Dormancy of solitary metastatic cells. Cell Cycle <u>5</u>, 1744–1750
- Tsiavou A, Degiannis D, Hatziagelaki E, Koniavitou K, Raptis S (2002): Flow cytometric detection of intracellular IL-12 release: in vitro effect of widely used immunosuppressants. Int Immunopharmacol <u>2</u>, 1713–1720
- Umemura N, Saio M, Suwa T, Kitoh Y, Bai J, Nonaka K, Ouyang G-F, Okada M, Balazs M, Adany R et al. (2008): Tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells are pleiotropic-inflamed monocytes/macrophages that bear M1- and M2type characteristics. J Leukoc Biol <u>83</u>, 1136–1144
- Uthaisangsook S, Day NK, Hitchcock R, Lerner A, James-Yarish M, Good RA, Haraguchi S (2003): Negative regulation of interleukin-12 production by a rapamycin-sensitive signaling pathway: a brief communication. Exp Biol Med (Maywood) <u>228</u>, 1023–1027
- van Ginderachter JA, Movahedi K, Hassanzadeh Ghassabeh G, Meerschaut S, Beschin A, Raes G, Baetselier P de (2006): Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. Immunobiology <u>211</u>, 487–501
- Vanhaesebroeck B, Alessi DR (2000): The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. Biochem J <u>346</u>, 561–576
- Vanhaesebroeck B, Leevers SJ, Panayotou G, Waterfield MD (1997): Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. Trends Biochem Sci <u>22</u>, 267–272
- Vanharanta S, Massagué J (2013): Origins of metastatic traits. Cancer Cell <u>24</u>, 410– 421
- Vivanco I, Sawyers CL (2002): The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. Nat Rev Cancer <u>2</u>, 489–501
- Vuong D, Simpson PT, Green B, Cummings MC, Lakhani SR (2014): Molecular classification of breast cancer. Virchows Arch <u>465</u>, 1–14
- Waks AG, Winer EP (2019): Breast Cancer Treatment: A Review. JAMA <u>321</u>, 288– 300

- Wallin JJ, Guan J, Prior WW, Edgar KA, Kassees R, Sampath D, Belvin M, Friedman LS (2010): Nuclear phospho-Akt increase predicts synergy of PI3K inhibition and doxorubicin in breast and ovarian cancer. Sci Transl Med <u>2</u>, 48ra66
- Wander SA, Hennessy BT, Slingerland JM (2011): Next-generation mTOR inhibitors in clinical oncology: how pathway complexity informs therapeutic strategy. J Clin Invest <u>121</u>, 1231–1241
- Wang G, Shi Y, Jiang X, Leak RK, Hu X, Wu Y, Pu H, Li W-W, Tang B, Wang Y et al. (2015): HDAC inhibition prevents white matter injury by modulating microglia/macrophage polarization through the GSK3beta/PTEN/Akt axis. Proc Natl Acad Sci U S A <u>112</u>, 2853–2858
- Wang L, Zhang Q, Zhang J, Sun S, Guo H, Jia Z, Wang B, Shao Z, Wang Z, Hu X (2011): PI3K pathway activation results in low efficacy of both trastuzumab and lapatinib. BMC Cancer <u>11</u>, 248
- Wang X, Yue P, Kim YA, Fu H, Khuri FR, Sun S-Y (2008): Enhancing Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)-Targeted Cancer Therapy by Preventing mTOR/Raptor Inhibition-Initiated, mTOR/Rictor-Independent Akt Activation. Cancer Research <u>68</u>, 7409–7418
- Weichhart T, Costantino G, Poglitsch M, Rosner M, Zeyda M, Stuhlmeier KM, Kolbe T, Stulnig TM, Hörl WH, Hengstschläger M et al. (2008): The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response. Immunity <u>29</u>, 565–577
- Weichhart T, Säemann MD (2008): The PI3K/Akt/mTOR pathway in innate immune cells: emerging therapeutic applications. Ann Rheum Dis <u>67</u>, iii70-74
- Weichhart T, Säemann MD (2009): The multiple facets of mTOR in immunity. Trends Immunol <u>30</u>, 218–226
- Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ (2005): Breast cancer metastasis: markers and models. Nat Rev Cancer <u>5</u>, 591–602
- Welch DR, Hurst DR (2019): Defining the Hallmarks of Metastasis. Cancer Res <u>79</u>, 3011–3027
- Wen SW, Ager EI, Christophi C (2013): Bimodal role of Kupffer cells during colorectal cancer liver metastasis. Cancer Biol Ther <u>14</u>, 606–613

- Whitman M, Kaplan DR, Schaffhausen B, Cantley L, Roberts TM (1985): Association of phosphatidylinositol kinase activity with polyoma middle-T competent for transformation. Nature <u>315</u>, 239–242
- Workman P, Clarke P (2012): PI3 Kinase in Cancer: From Biology to Clinic. Am Soc Clin Oncol Educ Book, e93-8
- Wu G, Xing M, Mambo E, Huang X, Liu J, Guo Z, Chatterjee A, Goldenberg D, Gollin S, Sukumar S et al. (2005): Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer. Breast Cancer Res <u>7</u>, R609-R616
- Wullschleger S, Loewith R, Hall MN (2006): TOR signaling in growth and metabolism. Cell <u>124</u>, 471–484
- Xie L, Sun F, Wang J, Mao X, Xie L, Yang S-H, Su D-M, Simpkins JW, Greenberg DA, Jin K (2014a): mTOR signaling inhibition modulates macrophage/microglia-mediated neuroinflammation and secondary injury via regulatory T cells after focal ischemia. J Immunol <u>192</u>, 6009–6019
- Xie S, Chen M, Yan B, He X, Chen X, Li D (2014b): Identification of a role for the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in innate immune cells. PLoS One <u>9</u>, e94496
- Yersal O, Barutca S (2014): Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. World J Clin Oncol <u>5</u>, 412–424
- Yunokawa M, Koizumi F, Kitamura Y, Katanasaka Y, Okamoto N, Kodaira M, Yonemori K, Shimizu C, Ando M, Masutomi K et al. (2012): Efficacy of everolimus, a novel mTOR inhibitor, against basal-like triple-negative breast cancer cells. Cancer Sci <u>103</u>, 1665–1671
- Zhou D, Huang C, Lin Z, Zhan S, Kong L, Fang C, Li J (2014): Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. Cell Signal <u>26</u>, 192–197

Danksagung

Ich möchte mich herzlichst bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Frau. Prof. Dr. Claudia Binder und Herrn Prof. Dr. Tobias Pukrop in der Abteilung Hämatologie und Onkologie der Universitätsmedizin Göttingen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt dabei meinem Betreuer und Doktorvater Herrn Prof. Dr. Tobias Pukrop für die Ermöglichung dieser Arbeit, die bedingungslose Unterstützung und unaufhörliche Förderung während der gesamten Zeit. Auch meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Claudia Binder danke ich für das große entgegengebrachte Vertrauen und die stets produktive Zusammenarbeit.

Weiterhin bedanke ich mich insbesondere bei Raquel Blazquez für die schnelle und bedingungslose Hilfe bei der Korrektur und Verbesserung dieser Arbeit. Ein großer Dank gilt auch dem weiteren Laborteam, das mir jederzeit mit Rat und Tat bei der Umsetzung der Laborarbeiten, speziellen Fragestellungen und auch darüber hinaus zur Seite stand.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uwe-Karsten Hanisch, in erster Linie den technischen Assistentinnen Elke und Susanne, danke ich für die Isolation und Bereitstellung der Mikroglia für meine Versuche.