

Aus der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Einfluss von Alpelisib in Kombination mit niedrig dosiertem Vinorelbin auf das
funktionale Verhalten von Mammakarzinomzellen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Jannis Patrik Trier
aus Bad Homburg v. d. H.

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

1. Gutachterin:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 20. März 2025

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1. Einleitung.....	1
2. Literaturhintergrund	4
2.1. Brustkrebs.....	4
2.1.1. Epidemiologische Relevanz	4
2.1.2. Klassifikationen und Definitionen.....	5
2.1.3. Prognose.....	6
2.1.4. Therapeutische Säulen	7
2.2. Metronomische Chemotherapie	7
2.2.1. Allgemeines	7
2.2.2. Mechanismen.....	9
2.2.3. MCT in der Klinik.....	12
2.3. Zielgerichtete Therapie.....	14
2.3.1. PI3K-Signalweg.....	14
2.3.2. <i>PIK3CA</i>	16
2.3.3. PI3K-Inhibition in der Klinik.....	19
2.4. PI3K und (Chemo)-Therapieresistenz	24
3. Zielsetzung der Arbeit.....	26
3.1. Forschungsfrage	27
3.2. Leitfragen	27
4. Material und Methoden	28
4.1. Materialien	28
4.1.1. Therapeutische Wirkstoffe.....	28
4.1.2. Kits.....	28
4.1.3. Chemotaxine.....	29
4.1.4. Chemikalien und Reagenzien.....	29
4.1.5. Zellen, Zellkulturmedien und Medienzusätze.....	30
4.1.6. Verbrauchsmaterialien	30
4.1.7. Gebrauchsmaterialien	31

4.1.8.	Geräte	31
4.1.9.	Software und Datenbanken	32
4.2.	Zelllinien	33
4.2.1.	Übersicht der Zelllinien	33
4.2.2.	MCF-7	33
4.2.3.	MDA-MB-231	33
4.2.4.	T-47D	34
4.2.5.	BT-549	35
4.2.6.	BT-20	35
4.2.7.	ZR-75-1	36
4.3.	Methoden	37
4.3.1.	Zellkultur	37
4.3.2.	Viabilität	37
4.3.3.	Proliferation	38
4.3.4.	Migration	39
4.3.5.	Das Lösungsmittel DMSO	43
4.3.6.	Statistische Auswertung	43
4.3.7.	Synergismus	43
5.	Ergebnisse	46
5.1.	Viabilität	46
5.1.1.	DMSO	46
5.1.2.	Vinorelbin plus Apelisib	46
5.1.3.	Synergistische Effekte	51
5.2.	Proliferation	54
5.2.1.	Vinorelbin plus Apelisib	54
5.2.2.	Synergistische Effekte	56
5.3.	Migration	58
5.3.1.	Vinorelbin plus Apelisib	58
6.	Diskussion	64
6.1.	Überlegungen zu DMSO	64

6.2.	Überlegungen zur Metronomik	64
6.2.1.	BT-20 – explorative Erhöhung der Wirkstoffkonzentration	66
6.3.	Überlegungen zur Behandlungsdauer mit Alpelisib	67
6.3.1.	MCF-7 und T-47D	68
6.4.	Überlegungen zum Synergismus.....	68
6.4.1.	MCF-7 und T-47D	68
6.4.2.	MDA-MB-231 und BT-549	70
6.5.	Überlegungen zur <i>PIK3CA</i> -Mutation	71
6.5.1.	MCF-7 und T-47D	71
6.5.2.	BT-20	72
6.6.	Überlegungen zum <i>PTEN</i> -Status	72
6.6.1.	ZR-75-1.....	72
6.6.2.	BT-549	74
6.6.3.	BT-20	74
6.7.	Überlegungen zum MAP-Kinase-Signalweg.....	75
6.7.1.	BT-20	75
6.7.2.	MDA-MB-231	77
6.8.	Zusammenfassende Bewertung der verwendeten Zelllinien	78
6.9.	Fazit	81
6.10.	Ausblick.....	83
7.	Zusammenfassung	85
8.	Literaturverzeichnis.....	87
9.	Anhang	VII
9.1.	Tabellenverzeichnis.....	VII
9.2.	Abbildungsverzeichnis.....	VII
9.3.	Rohdaten	IX
9.4.	Dissertationsbezogene Publikation.....	XXXI
10.	Danksagung	XXXII
11.	Tabellarischer Lebenslauf.....	XXXIII

Abkürzungsverzeichnis^{1,2}

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol, µM	mikromolar, Mikromol
5-FU	Fluorouracil
Abb.	Abbildung
AD	Aqua destilliert, destilliertes Wasser
AE	Adverse Event, unerwünschtes Ereignis (im Zusammenhang mit klinischen Studien)
AJCC	American Joint Committee on Cancer, amerikanischer gemeinsamer Ausschuss gegen Krebs
AK	Antikörper
ATCC	American Type Culture Collection
BrdU	Bromdesoxyuridin
bspw.	beispielsweise
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAPE	Capecitabin
CBR	Clinical Benefit Rate: Summe aus Anteilen Complete und Partial Remission sowie Stable Disease für mindestens 6 Monate
CI	Combination Index, kombinatorischer Index
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTX	Cyclophosphamid
d	day, Tag
DCR	Disease Control Rate: Summe aus Anteilen Complete und Partial Remission sowie Stable Disease
Destatis	Deutsches Statistik-Informationssystem, Statistisches Bundesamt
DLT	Dose Limiting Toxicity, Dosis-limitierende Toxizität
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Solution
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor, epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ER	Estrogenrezeptor, Östrogenrezeptor
et al.	et alii, et aliae, et alia, und andere
evtl.	eventuell
FCS	Fetal Calf Serum, fetales Kälberserum
g	Gramm
G	Erdbeschleunigung
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.
GSK3β	Glycogen Synthase Kinase-3 β
h	hour, Stunde

¹ Outcomeparameter im Rahmen klinischer Studien: s. Delgado und Guddati (2021) und Kilickap et al. (2018).

² Abkürzungen werden bei erstmaliger Erwähnung im Text eingeführt, nicht jedoch physikalische und chemische Einheiten, Formelzeichen, Zeitangaben und sprachübliche Abkürzungen.

HDI	Human Development Index, Index der menschlichen Entwicklung
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2, humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2, <i>ERBB2</i>
HR	Hormonrezeptor
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells, humane Endothelzellen aus Nabelschnurvenen
IC	Inhibitory Concentration, inhibitorische Konzentration
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
Ki-67	Antigen Kiel-67 Proliferationsmarker
L	Liter
m ²	Quadratmeter
MAP	Mitogen-Activated Protein
MBC	Metastatic Breast Cancer, metastasierter Brustkrebs
MCT	Metronomic Chemotherapy, metronomische Chemotherapie
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mol	molar, Mol
MTD	Maximum Tolerated Dose, maximal tolerierte Dosis
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
n	Anzahl
NCBI	National Center for Biotechnology Information
neg	negativ
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	nanomolar, Nanomol
NST	Non Special Type, nicht spezieller Typ
OBD	Optimal Biological Dose, optimale biologische Dosis
ORR	Objective (Overall) Response Rate: Summe aus Anteilen Complete und Partial Remission
OS	Overall Survival: Zeit von Randomisierung bis Tod
p	probabilitas, Signifikanzwert
P/S	Penicillin/Streptomycin
p-Akt	phosphoryliertes Akt
PDK	3-Phosphoinositide-Dependent protein Kinase
PFS	Progression Free Survival: Zeit von Randomisierung bis Fortschreiten der Erkrankung oder Tod
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
<i>PIK3CA</i>	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat 3-Kinase, katalytische Untereinheit Alpha bzw. das zugehörige Gen
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKB	Proteinkinase B, Akt bzw. das zugehörige Gen <i>AKT</i>
POD	Peroxidase
pos	positiv
PR	Progesteronrezeptor
<i>PTEN</i>	Phosphatase and Tensin homolog bzw. das zugehörige Gen
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
s.	siehe
SD	Standard-Deviation, Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

TNBC	Triple Negative Breast Cancer, dreifach negativer Brustkrebs
TNM-Klassifikation	Klassifikation nach Tumorgröße, Lymphknoteninfiltration (Nodalstatus) und (Fern-)Metastasierung
TTP	Time To Progression: Zeit von Randomisierung bis Krankheitsprogression
u. a.	unter anderem
UICC	Union Internationale Contre le Cancer, internationale Vereinigung gegen Krebs
v. a.	vor allem
VEGF, VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor (Rezeptor), vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (Rezeptor)
VRL	Vinorelbin
vs.	versus, im Vergleich, in Gegenüberstellung
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
ZfKD	Zentrum für Krebsregisterdaten

1. Einleitung

Im Jahr 2020 erkrankten in der Bundesrepublik Deutschland 70.550 Frauen neu an Brustkrebs. Damit ist Brustkrebs in Deutschland unverändert die häufigste Tumorerkrankung bei Personen weiblichen Geschlechts (Zentrum für Krebsregisterdaten im RKI [ZfKD] & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V [GEKID], 2023). Durch das Mammographie-Screening wird die Detektion von betroffenen Frauen heutzutage bereits in einem früheren Tumorstadium ermöglicht, als dies noch vor Einführung des Früherkennungsprogramms 2005 der Fall war (ZfKD & GEKID, 2023). Zudem konnte durch therapeutische Fortschritte die Mortalität im Laufe der Jahre gesenkt werden (Harbeck & Gnant, 2017; Rojas & Stuckey, 2016; Sun et al., 2017; ZfKD & GEKID, 2023). Unter den bösartigen Neubildungen belegte Brustkrebs dennoch über alle Altersgruppen und Geschlechter hinweg den dritten Platz bei den krebsbedingten Sterbefällen in Deutschland mit 19.104 Todesfällen im Jahr 2022 (Statistisches Bundesamt [Destatis], 2022). Auch in anderen Industrienationen präsentiert sich Brustkrebs als eine der am häufigsten zum Tode führenden Krebsarten (Harbeck & Gnant, 2017; Sung et al., 2021). Weltweit stellt Brustkrebs mittlerweile mit geschätzt 2,3 Millionen Neuerkrankungen pro Jahr eine der häufigsten diagnostizierten Krebserkrankung dar. Im Jahr 2020 verdrängte Brustkrebs mit einem Anteil von 11,7 % aller bösartigen Neubildungen das Lungenkarzinom (11,4 %) sogar auf den zweiten Platz (Bray et al., 2018; Sung et al., 2021).

Hat die Erkrankung den Status einer metastasierten Brustkrebserkrankung (MBC) erreicht, gilt sie als nicht heilbar (Cardoso et al., 2020; Cazzaniga et al., 2019c; Gennari et al., 2021; Harbeck & Gnant, 2017). Die Krankheitskontrolle und das Überleben sowie die Aufrechterhaltung einer angemessenen Lebensqualität stehen bei MBC daher im Vordergrund therapeutischer Bemühungen (Cardoso et al., 2020; Cazzaniga et al., 2019c; Gennari et al., 2021; Harbeck & Gnant, 2017; Perroud et al., 2016; Schmidt, 2016). MBC kann als chronische Erkrankung aufgefasst werden, mit dem Ansporn, die Erkrankung längerfristig zu kontrollieren (Schmidt, 2016).

Bei der Behandlung von Brustkrebs kommt die Trias aus chirurgischer Resektion, Strahlen- und Pharmakotherapie zum Einsatz. Die molekulare Subtypisierung hat darüber hinaus Einfluss auf die Entscheidung über weitere Behandlungsmöglichkeiten und die Prognose (Cardoso et al., 2020; Harbeck & Gnant, 2017). Mit der Entwicklung von Immuntherapien und dem Feld der zielgerichteten Therapeutika sind in den letzten Jahren weitere Behandlungsmöglichkeiten hinzugekommen (Al-Mahmood et al., 2018; Cardoso et al., 2020; Harbeck & Gnant, 2017; Sun et al., 2017). Dennoch bildet die Chemotherapie bei Metastasierung, insbesondere nach Ausschöpfung endokriner Behandlungsoptionen, häufig die Basis der Behandlung (Cardoso et al., 2020; Gennari et al., 2021; Harbeck & Gnant, 2017). Konventionelle Chemotherapieregime sind jedoch mit relevanten Toxizitäten verbunden

(Cazzaniga et al., 2019a; Cazzaniga et al., 2022; Krajnak et al., 2022; Lien et al., 2013; J. Liu et al., 2022). Daher wird neben der konventionellen Chemotherapie seit einigen Jahren die Strategie der metronomischen Chemotherapie (MCT) als Behandlungskonzept erforscht und umgesetzt. Bei der MCT erfolgt die Applikation oral und in kurzen Abständen, dafür jedoch mit einer Dosis, welche unterhalb der maximal tolerierten Dosis liegt (MTD) (Cazzaniga et al., 2019a; Cazzaniga et al., 2016a; Cazzaniga et al., 2022; Krajnak et al., 2022; J. Liu et al., 2022). Toxische Effekte sollen auf diese Weise reduziert werden, bei gleichzeitig angemessener Tumorkontrolle und Aufrechterhaltung von Lebensqualität (Cazzaniga et al., 2019a; Cazzaniga et al., 2016a; Cazzaniga et al., 2022; Krajnak et al., 2022; J. Liu et al., 2022; Perroud et al., 2016; Schmidt, 2016).

Eine weitere Notwendigkeit zur Exploration neuer Behandlungskonzepte ergibt sich durch das Auftreten von Therapieresistenzen im Verlauf (Fuso et al., 2022; Li et al., 2021). Der Phosphoinositid-3-Kinase-Signalweg (PI3K-Signalweg) fördert zelluläre Funktionen wie Proliferation, Angiogenese, Migration und hemmt die Apoptose (Bilanges et al., 2019; Ciruelos Gil, 2014). Gleichzeitig ist das Gen *PIK3CA*, welches für die p110 α -Isoform von PI3K kodiert (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat 3-Kinase, katalytische Untereinheit Alpha), bei Brustkrebs häufig mutiert und die PI3K-Signalgebung im Sinne eines gain-of-function verstärkt (Martínez-Sáez et al., 2020; Millis et al., 2016; Millis et al., 2019). Der PI3K-Signalweg ist für die Entwicklung von Therapieresistenzen relevant und stellt einen möglichen Angriffspunkt für eine zielgerichtete Therapie dar (Badinloo & Esmaeili-Mahani, 2014; Khezri et al., 2022; Sobhani et al., 2018). Es gibt zudem Erkenntnisse, dass ein metronomisches Chemotherapiedesign evtl. in der Lage ist, Therapieresistenzen zu überwinden, was auf den multimodalen Wirkmechanismus der MCT im Vergleich zu einer konventionellen Chemotherapie zurückgeführt wird (N. André et al., 2017; Biziota et al., 2017; Romiti et al., 2017).

Die vorliegende Arbeit knüpft an diese Problemstellungen an. Es wurde die Kombination eines Chemotherapeutikums in einem metronomischen Behandlungsregime mit einer zielgerichteten Therapie untersucht. Als Chemotherapeutikum kam niedrig dosiertes Vinorelbin (VRL) zur Anwendung, ein bei Brustkrebs etabliertes Mikrotubulotoxin aus der Gruppe der Vinca-Alkaloide. Bei akzeptabler Toxizität ist metronomisches VRL klinisch effektiv (Cazzaniga et al., 2022; Cazzaniga et al., 2019b; Krajnak et al., 2022; J. Liu et al., 2022). Als zielgerichtetes Therapeutikum kam Alpelisib zum Einsatz, ein selektiver p110 α -Inhibitor der PI3K (Fuso et al., 2022; Li et al., 2021). In Kombination mit einer endokrinen Behandlung erzielte Alpelisib in Studien eine Verbesserung klinischer Outcomeparameter bei Brustkrebs, jedoch unter Inkaufnahme charakteristischer Nebenwirkungen der Therapie (F. André et al., 2021; F. André et al., 2019; Rugo et al., 2020; Rugo et al., 2021). Für Alpelisib wurden verschiedene Konzentrationen ausgewählt: Zum einen eine Konzentration, die der

Plasmakonzentration von Patient:innen unter Behandlung entspricht, sowie zum anderen eine Serie niedrigerer Konzentrationen.

Die Umsetzung dieses Dosis-reduzierten Ansatzes sollte zeigen, ob in Kombination beider Wirkstoffe synergistische Effekte im Hinblick auf die Tumorkontrolle auftreten. Perspektivisch könnte eine klinische Evaluation erfolgen und durch ein Dosis-reduziertes Behandlungsregime der beteiligten Wirkstoffe ein angemessener Ausgleich zwischen Tumorkontrolle einerseits und Reduktion unerwünschter Wirkungen der Therapie andererseits erreicht werden. Des Weiteren ergäbe sich vor dem Hintergrund von zu erwartenden Therapieresistenzen im Verlauf der Brustkrebsbehandlung ein neuer potenzieller Kombinationsansatz bei MBC.

Die Kombination aus metronomisch dosiertem VRL und Alpelisib wurde nach Sichtung der zugänglichen Literatur bislang noch nicht evaluiert. Die vorliegende Arbeit strebt an, einen Beitrag zur Schließung dieser Forschungslücke zu leisten. Hierfür wurde grundlegend untersucht, welche Effekte sich bei der gemeinsamen Anwendung der beiden Wirkstoffe in Zellkultur zeigen. Es wurden die Aspekte Viabilität (alamarBlue®), Proliferation (Bromdesoxyuridin (BrdU)-Inkorporation) und Migration (Boydenkammer) betrachtet. Im Rahmen der statistischen Auswertungen wurden u. a. Analysen zu einem etwaigen Synergismus der Wirkstoffe mithilfe der Methode des kombinatorischen Index (CI) durchgeführt (Chou, 2006; Chou & Talalay, 1983, 1984). Die Untersuchungen und Analysen erfolgten an einer Auswahl von Brustkrebszelllinien, die sowohl den *PIK3CA*-Wildtyp (WT) als auch verschiedene *PIK3CA*-Mutanten abdecken.

2. Literaturhintergrund

2.1. Brustkrebs

2.1.1. Epidemiologische Relevanz

Für das weibliche Geschlecht stellt Brustkrebs nach wie vor mit 70.550 Neudiagnosen im Jahr 2020 die am häufigsten auftretende Tumorerkrankung in Deutschland dar (ZfKD & GEKID, 2023). Zum Vergleich: Nur ca. 1 % der Brustkrebsfälle insgesamt betrifft Männer (740 Neuerkrankungen pro Jahr) (ZfKD & GEKID, 2023). Das mediane Erkrankungsalter der Frauen beträgt 65 Jahre (ZfKD & GEKID, 2023). Ca. 17 % der Frauen sind zum Zeitpunkt der Diagnose jünger als 50 Jahre, 40 % sind älter als 70 Jahre (ZfKD & GEKID, 2023). Etwa 12,5 % aller Frauen erleiden in ihrem Lebensverlauf Brustkrebs (Rojas & Stuckey, 2016; ZfKD & GEKID, 2019, 2023). Für das Jahr 2020 konnte für Deutschland eine 5-Jahres-Prävalenz von 315.000 Fällen bei Frauen festgestellt werden (Männer: 2.800 Fälle) (ZfKD & GEKID, 2023). Im Rahmen der Brustkrebsfrüherkennung existiert seit 2005 das Mammographie-Screening für Frauen zwischen 50 und 65 Jahren, wodurch die Erkrankung bereits in früheren Tumorstadien detektiert werden kann (Rojas & Stuckey, 2016; ZfKD & GEKID, 2023). Mitte 2024 wurde dieses in Deutschland für Frauen bis 75 Jahre ausgedehnt (ZfKD & GEKID, 2023). Trotz der erreichten früheren Erkennung rangierte Brustkrebs im Jahr 2022 mit 19.104 Todesfällen in Deutschland unter den bösartigen Neubildungen auf dem dritten Platz bei den krebsbedingten Sterbefällen und macht damit einen Anteil von 8,3 % aus (Destatis, 2022).

Auch in weltweiter Betrachtung spielen Krebserkrankungen im Allgemeinen und Brustkrebs im Speziellen eine große Rolle (Rojas & Stuckey, 2016; Sung et al., 2021). GLOBOCAN³ berücksichtigte für das Jahr 2020 185 Länder bzw. 20 Weltregionen und stellte für Krebserkrankungen die Inzidenzen und Mortalitäten aufgeschlüsselt u. a. nach Geschlecht und 18 Altersgruppen dar (Sung et al., 2021). In Abhängigkeit des Entwicklungsstandes⁴ der betrachteten Länder belegen bösartige Neubildungen in der Todesursachenstatistik bei Personen bis 70 Jahre meist einen der ersten vier Plätze (Sung et al., 2021). In Ländern mit höherem Human Development Index (HDI) steht bei Menschen bis 70 Jahre Krebs als Todesursache sogar auf dem ersten Platz (Sung et al., 2021). In den Ländern mit einem niedrigen HDI tauchen Krebserkrankungen bei den Todesursachen erst zwischen dem fünften und neunten Platz auf (Sung et al., 2021).

Mit 2,3 Millionen Neuerkrankungen pro Jahr belegte Brustkrebs im weltweiten Ranking über alle Geschlechter hinweg im Jahr 2020 den ersten Platz unter den bösartigen Neubildungen

³ Global Cancer Statistics. <https://www.iarc.who.int/>. Stand: 2024, letzter Zugriff: 28.01.2024.

⁴ Auf Basis des HDI. Indexbildung aus Lebenserwartung, Bildung und Bruttoinlandsprodukt. <https://www.who.int/data/gho/indicator-metadata-registry/imr-details/3480>. Stand: 2024, letzter Zugriff: 27.01.2024.

(11,7 %) und überholte damit das Lungenkarzinom (11,4 %) (Bray et al., 2018; Sung et al., 2021). Betrachtet man lediglich die Gruppe der Frauen, ergibt sich eine anteilige Inzidenz von 24,5 % für Brustkrebs an allen Tumorerkrankungen (Sung et al., 2021), wobei Brustkrebs in Australien/Neuseeland, Nordamerika und Europa (mit Ausnahme von Osteuropa) die höchsten Inzidenzen im weltweiten Vergleich verzeichnet (79,6-95,5/100.000 Frauen) (Sung et al., 2021). Mit 685.000 Todesfällen pro Jahr rangiert Brustkrebs nach den Karzinomen von Lunge, Kolorektum, Leber und Magen an fünfter Stelle der weltweiten krebsbedingten Todesursachen (Sung et al., 2021). Die Mortalität beträgt in Australien/Neuseeland, Nordamerika und Europa (mit Ausnahme von Osteuropa) 12,1-15,6/100.000 Frauen (Sung et al., 2021). Länder verhalten sich in Bezug auf Inzidenz und Mortalität von Brustkrebs je nach Ausprägung des HDI unterschiedlich. Länder mit hohem HDI weisen höhere Inzidenzen bei geringerer Mortalität auf (Rojas & Stuckey, 2016; Sung et al., 2021; Tao et al., 2015). In Ländern mit niedrigem HDI zeigen sich hingegen niedrigere Inzidenzen bei höherer Mortalität (Rojas & Stuckey, 2016; Sung et al., 2021; Tao et al., 2015).

2.1.2. Klassifikationen und Definitionen

Auf Basis der TNM-Klassifikation (Tumor, Nodalstatus, Metastasierung) werden solide Tumoren bewertet und durch die Union Internationale Contre le Cancer (UICC) bzw. das American Joint Committee on Cancer (AJCC) in Stadien überführt (Staging) (Tab. 1). Zur Prognoseeinschätzung werden durch das AJCC weitere Parameter im Sinne eines prognostischen Stagings berücksichtigt (Cserni et al., 2018; Tsang & Tse, 2020; Wittekind, 2017; Zhu & Doğan, 2021). Momentan hat die achte Auflage (2017) Gültigkeit (Cserni et al., 2018; Wittekind, 2017; Zhu & Doğan, 2021).

Tabelle 1: Stadieneinteilung Brustkrebs nach UICC. UICC = Union Internationale Contre le Cancer; TNM = Tumor, Nodalstatus, Metastasierung. Quellen: Wittekind (2017) und Cserni et al. (2018).

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	IA T1	N0	M0
	IB T0; T1	N1mi	M0
II	IIA T0; T1	N1	M0
	T2	N0	M0
	IIB T2	N1	M0
	T3	N0	M0
III	IIIA T0; T1; T2	N2	M0
	T3	N1; N2	M0
	IIIB T4	N0; N1; N2	M0
	IIIC alle T	N3	M0
IV	alle	alle	M1

Auf immunhistochemischer Ebene wird nach Status des Östrogen- (ER) und Progesteronrezeptors (PR) sowie Expression des humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors 2 (HER2, *ERBB2*) differenziert (Tab. 2) (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF [Leitlinienprogramm Onkologie], 2021; Tsang & Tse, 2020).

Tabelle 2: Immunhistochemische Subtypisierung Brustkrebs. ER = Östrogenrezeptor; PR = Progesteronrezeptor; HER2 = humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2; Ki-67 = Antigen Kiel-67 Proliferationsmarker. Quellen: Lokuhetty et al. (2019), Leitlinienprogramm Onkologie (2021) und Dowsett et al. (2011).

Subtyp	ER	PR	HER2	Ki-67
Luminal A	+	+	-	niedrig
	+	-	-	niedrig
	-	+	-	niedrig
Luminal B HER2 negativ	+	+	-	hoch
	+	-	-	hoch
	-	+	-	hoch
Luminal B HER2 positiv	+	+	+	hoch oder niedrig
	+	-	+	hoch oder niedrig
	-	+	+	hoch oder niedrig
HER2 positiv	-	-	+	hoch oder niedrig
Triple-negativ	-	-	-	hoch oder niedrig

Die immunhistochemische Subtypisierung folgt klinisch-therapeutischen Erwägungen, besitzt prognostische Bedeutung und ist mit den molekularen Subtypen (Synonyme: intrinsisch, biologisch) auf Basis von Genexpressionsanalysen assoziiert (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021; Lokuhetty et al., 2019; Tsang & Tse, 2020; Zhu & Doğan, 2021). Es ergibt sich eine gängige Einteilung in Luminal A, Luminal B, HER2_{pos}, Basal-Like sowie weitere, seltenere Typen (The Cancer Genome Atlas Network [TCGAN], 2012; Foulkes et al., 2010; Hollestelle et al., 2010; Jiang et al., 2016; Lokuhetty et al., 2019; Tsang & Tse, 2020). Zwar ist in den meisten Fällen ein triple-negativer Subtyp (TNBC) als Basal-Like zu bezeichnen, allerdings trifft dies nicht immer zu (TCGAN, 2012; Foulkes et al., 2010; Prat et al., 2013; Tsang & Tse, 2020). Neben der Prognosebewertung ist der molekulare Subtyp für die individuelle Therapieausrichtung zunehmend relevant (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021; Zhu & Doğan, 2021).

2.1.3. Prognose

Die Prognose ist abhängig vom Alter, dem Tumorstadium, dem histologischen Tumorgrad, dem Tumorsubtyp sowie der lymphovaskulären Affektion (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021; Lokuhetty et al., 2019). Insgesamt weisen ER_{pos} und PR_{pos} Tumoren eine bessere Prognose auf, wohingegen HER2_{pos} Tumoren und insbesondere TNBC aggressiver verlaufen und prognostisch ungünstiger sind (Foulkes et al., 2010; Lokuhetty et al., 2019; Tsang & Tse, 2020).

Bei frühen Formen von Brustkrebs beträgt das 5-Jahres-Überleben in Europa etwa 96 % (Gennari et al., 2021). Deutschland verzeichnet bei den UICC-Stadien ein 5-Jahres-Überleben von 74 % im Stadium III (ZfKD & GEKID, 2023). Nach Metastasierung beträgt das Gesamtüberleben (OS) im Median etwa drei Jahre (Cardoso et al., 2020). Das 5-Jahres-Überleben bei MBC beläuft sich je nach Quelle auf ca. 25-38 % (Cardoso et al., 2020; Gennari et al., 2021). Für Deutschland wird für Personen im Stadium IV nach UICC ein 5-Jahres-Überleben von 33 % angegeben (ZfKD & GEKID, 2023). Damit verschlechtert sich die Prognose nach Metastasierung deutlich.

2.1.4. Therapeutische Säulen

Die Säulen der Brustkrebsbehandlung umfassen chirurgisch-operative Verfahren, die Strahlentherapie und medikamentöse Ansätze. Auf Ebene der Pharmakotherapie sind die anti-Hormonbehandlung und gegen HER2 gerichtete Therapeutika zentrale Bausteine. Ferner kommen Chemotherapeutika und zielgerichtete Substanzen zur Anwendung (Cardoso et al., 2020; Gennari et al., 2021; Harbeck & Gnant, 2017). Neuere Therapieansätze umfassen die Immun-Checkpoint-Blockade (Cardoso et al., 2020; Gennari et al., 2021).

Bei MBC mit Hormonrezeptor (HR)_{neg}-Status oder Resistenz gegen eine endokrine Therapie und HER2_{neg} ist die Chemotherapie in der Regel Mittel der Wahl (Al-Mahmood et al., 2018; Harbeck & Gnant, 2017). Die konventionelle Hochdosischemotherapie hat zum Ziel, möglichst viele Tumorzellen in möglichst kurzer Zeit abzutöten (Munzone & Colleoni, 2015). Ferner werden konventionelle Chemotherapieregime bei ausgeprägter Symptomatik und/oder zügigem Handlungsdruck eingesetzt (Gennari et al., 2021; Harbeck & Gnant, 2017; Schmidt, 2016).

Für VRL werden u. a. Neutropenie/Leukopenie, Myelosuppression, periphere Neuropathie und gastrointestinale Störungen als typische Nebenwirkungen beschrieben (Al-Mahmood et al., 2018; Moudi et al., 2013; Sri S, 2016). Bei der klassischen Chemotherapie liegt die Dosis im Bereich der MTD (Briasoulis et al., 2013; Cazzaniga et al., 2019a; Kerbel & Kamen, 2004). Da bei MBC nicht Heilung, sondern die Lebenszeitverlängerung und die Symptomkontrolle im Vordergrund stehen (Palliation), stellt das Konzept der MCT einen Ansatz zur Reduktion assoziierter Nebenwirkungen und somit zur Erhaltung einer möglichst hohen Lebensqualität dar (Cazzaniga et al., 2019a; Cazzaniga et al., 2016a; Perroud et al., 2016; Romiti et al., 2017; Schmidt, 2016).

2.2. Metronomische Chemotherapie

2.2.1. Allgemeines

Unter MCT wird die orale Applikation herkömmlicher Chemotherapeutika (z. B. VRL) in einer niedrigen Dosis, dafür regelmäßig und unterbrechungsfrei über einen längeren Zeitraum,

verstanden (Cazzaniga et al., 2021a; Lien et al., 2013; Romiti et al., 2017). Der Begriff geht ursprünglich auf Hanahan et al. (2000) zurück.

Die geringere Toxizität und orale Einnahmemöglichkeit führen zu einer größeren Therapieakzeptanz seitens der Patient:innen⁵ (Cazzaniga et al., 2017b; Cazzaniga et al., 2014; Saridaki et al., 2012). Nebenwirkungen wie Knochenmarksuppression und Blutbildveränderungen, Mukositis, Neuropathien, Übelkeit und Erbrechen, Müdigkeit sowie Haarverlust treten unter MCT im Vergleich zu konventionellen Chemotherapieeregimen eher seltener und weniger ausgeprägt auf (Cazzaniga et al., 2019b; Romiti et al., 2017). Insbesondere für ältere Patient:innen wirkt sich das reduzierte Nebenwirkungsprofil günstig aus, da diese eher unter Organdysfunktionen, Begleiterkrankungen und kognitiven Einschränkungen leiden sowie polypharmakotherapeutisch eingestellt sind (Munzone & Colleoni, 2015). Bei Anwendung eines metronomischen Behandlungsregimes sollte jedoch kein akuter Handlungsdruck bestehen (Cazzaniga et al., 2021a; Schmidt, 2016). Unter den Subtypen wird ein HR_{pos}/HER2_{neg} Status nach Ausschöpfung endokriner Möglichkeiten als beste Konstellation für die MCT betrachtet, wobei zunehmend auch von einem effektiven Ansprechen des TNBC-Kollektivs berichtet wird (Cazzaniga et al., 2016a; Cazzaniga et al., 2019b).

Weitere Vorteile bestehen darin, dass für Chemotherapeutika auch in globaler Betrachtung eine (meist) gute Flächenverfügbarkeit besteht und die Kosten der Behandlung (relativ) gering sind, wodurch die Therapie insbesondere für Länder mit einem niedrigeren HDI interessant erscheint (Cazzaniga et al., 2021a; Cazzaniga et al., 2019b; Munzone & Colleoni, 2015). Allerdings merken Cazzaniga et al. (2021a) kritisch an, dass kein ausreichend großes Forschungsinteresse seitens der Industrie auf diesem Feld bestehe und die Finanzierung großer Studien durch andere Akteure gewährleistet werden müsste.

Die MCT stellt bei MBC eine an Bedeutung gewinnende Alternative zur konventionellen Chemotherapie in ausgewählten Situationen dar (Cazzaniga et al., 2021a; Cazzaniga et al., 2019b; Romiti et al., 2017). Die am häufigsten eingesetzten Wirkstoffgruppen sind Mitose-Hemmstoffe, Topoisomerase-Hemmstoffe, Alkylantien und Antimetabolite (Lien et al., 2013; Romiti et al., 2017). Konkret sind es bei Brustkrebs Methotrexat, Capecitabin (CAPE), Cyclophosphamid (CTX) und VRL (Cazzaniga et al., 2021a; Romiti et al., 2017).

VRL ist ein halbsynthetisches Mikrotubulotoxin aus der Gruppe der Vinca-Alkaloide (Abb. 1). Es stört die Bildung des Spindelapparates während der Mitose und arretiert das Zellwachstum

⁵ Sofern aus der Publikation/Studie hervorgeht, dass ausschließlich weibliche Personen berücksichtigt wurden, wird dies mit „Patientinnen“ beschrieben. Sofern auch Männer inkludiert wurden oder aus der Publikation nicht explizit hervorgeht, dass ausschließlich Frauen eingeschlossen wurden, wird von „Patient:innen“ gesprochen. Außerhalb zitierter Publikationen erfolgt generell eine Verwendung des Doppelpunktes im Sinne einer geschlechtsneutralen Ausdrucksweise.

in der Metaphase (Moudi et al., 2013; Sri S, 2016). Die Summenformel lautet $C_{45}H_{54}N_4O_8$, das Molekulargewicht beträgt 778,9 g/mol (Al-Mahmood et al., 2018; Cazzaniga et al., 2019a; National Center for Biotechnology Information [NCBI], 2024a). Die Applikation kann oral oder intravenös erfolgen, sowohl in Einzeltherapie als auch in Kombination mit anderen Wirkstoffen (Al-Mahmood et al., 2018; Amadori et al., 2001; Gebbia & Puozzo, 2005). VRL wird nach oraler Einnahme zügig absorbiert, besitzt eine geringe Plasmaproteinbindung, weist eine Bioverfügbarkeit von etwa 40 % auf und wird primär hepato-biliär abgebaut und ausgeschieden (Gebbia & Puozzo, 2005). Die Pharmakokinetik verhält sich linear (Bocci & Kerbel, 2016; Gebbia & Puozzo, 2005).

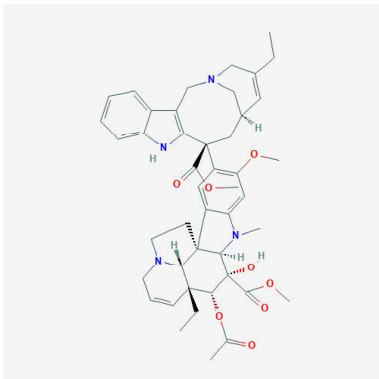


Abbildung 1: Strukturformel Vinorelbine. Quelle: NCBI (2024a).

2.2.2. Mechanismen

Mechanistisch handelt es sich um eine multimodale Therapie (N. André et al., 2017; Cazzaniga et al., 2021a; Munzone & Colleoni, 2015; Romiti et al., 2017; Schwartz, 2009). Ursprünglich wurde beobachtet, dass Vinblastin auch in deutlich geringeren Konzentrationen als in der MTD Endothelzellen beeinträchtigen kann. Hieraus folgte die Überlegung, dass eine MCT die anti-tumoröse Wirkung gegen Endothelzellen des wachsenden Tumorgewebes bei Limitierung der typischen Nebenwirkungen der Behandlung aufrechterhalten könnte (Hanahan et al., 2000; Kerbel & Kamen, 2004; Shaked et al., 2005). Die Kombination von niedrig dosiertem Vinblastin plus einem Antikörper (AK) gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF)-Rezeptor konnte zu einer stärkeren Rückbildung verschiedener Tumoren im Mausmodell führen, u. a. bei Brustkrebs. Wurden die Wirkstoffe hingegen einzeln gegeben, verzögerte sich zwar das Tumorstadium, es kam jedoch zu Rezidiven im Verlauf (Munoz et al., 2005). Die antiangiogenen Effekte dieser Kombination aus MCT und anti-VEGFR-AK zeigten sich zudem bei ursprünglich chemoresistenten Zelllinien (Munoz et al., 2005). Eine optimale biologische Dosis (OBD) in Bezug auf die Reduktion endothelialer Vorläuferzellen im peripheren Blut wurde bereits 2005 bei Shaked et al. (2005) in MDA-MB-231 abgeleiteten Tumoren in

Mausmodellen beschrieben. Für Vinblastin und VRL wurden in diesen Versuchen⁶ eine OBD von 0,33 mg/kg Körpergewicht (KG) bzw. 9 mg/kg KG benannt (Shaked et al., 2005).

Bei konventioneller Chemotherapie erhalten Tumorzellen die Chance, die therapiefreien Phasen zur Regenerierung zu nutzen, wodurch Proliferation, Migration und Metastasierung durch die MTD-Therapie sogar gefördert werden könnten (Kerbel & Kamen, 2004; Kerbel & Shaked, 2017; Shaked et al., 2016). Umgekehrt entfallen bei kontinuierlicher Gabe die erforderlichen Regenerierungsphasen, sodass Tumorzellen in ihrer Fähigkeit zur Reparatur gehemmt werden könnten, was dem Tumorwachstum wiederum entgegenwirken könnte (Kerbel & Kamen, 2004; Kerbel & Shaked, 2017; Munoz et al., 2005; Shaked et al., 2016).

In Zellkulturexperimenten war metronomisches VRL in der Lage, Endothelzellen in ihrer Proliferation, Migration und Gefäßausbildung zu hemmen. Für Zellen humaner Nabelschnurvenen (HUVEC) war die inhibitorische Konzentration₅₀ (IC₅₀) der Zellproliferation nach 96-stündiger metronomischer in vitro-Behandlung etwa vierfach geringer als nach 24 h. Umgekehrt schienen hohe Dosen VRL die Angiogenese bei Nabelschnurvenen sogar zu fördern (Biziota et al., 2016; Biziota et al., 2017). Neben direkten zytotoxischen Effekten wird die MCT eher über indirekte Mechanismen erklärt (Cazzaniga et al., 2021a; Munoz et al., 2005; Schwartz, 2009). So wird die Konzentration von Thrombospondin-1, welches die Angiogenese natürlicherweise hemmt, durch die MCT erhöht (Cazzaniga et al., 2019b; Kerbel & Kamen, 2004; Munoz et al., 2005). Des Weiteren kommt es zur Freisetzung weiterer endogener Angiogenese-Inhibitoren und die Menge u. a. des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1 α , VEGF und Interleukin-8 werden gesenkt, was der Angiogenese/Tumorentstehung ebenfalls entgegenwirkt (Biziota et al., 2016; Cazzaniga et al., 2021a).

Darüber hinaus kommt es zu einer Modulation der Immunantwort (N. André et al., 2017; Cazzaniga et al., 2021a; Cazzaniga et al., 2019b). Die MCT vermag möglicherweise die Menge zirkulierender regulatorischer T-Zellen zu senken und umgekehrt kommt es zu einer Erhöhung von zytotoxischen T-Zellen, natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen (Biziota et al., 2017; Shaked et al., 2016). Unter konventioneller Chemotherapie verhielt es sich bei Shaked et al. (2016) gegensätzlich. Dendritische Zellen sind für die Tumorabwehr relevant und verschiedene Chemotherapeutika (z. B. Vinblastin) stimulierten in Zelllinienversuchen in niedrigen, nicht-toxischen Konzentrationen (0,1-1 μ mol/L) deren Ausreifung und wirkten dadurch immunstimulierend (Tanaka et al., 2009). Konträr werden Chemotherapeutika ansonsten immunsuppressive Effekte zugeschrieben, dies bezieht sich jedoch auf die konventionellen hohen Dosen (Tanaka et al., 2009).

⁶ MDA-MB-231/LM2-4 (metastatische Variante) aus Lungenmetastasen, s. Shaked et al. (2005)

Auch scheint die MCT auf Tumorstammzellen Einfluss zu nehmen, welche Metastasierung und Therapieresistenzen fördern (Biziota et al., 2017; Hermann et al., 2008). Für Tumorstammzellen wird eine starke Interaktion zur Tumor-Mikroumgebung und der Tumor-Gefäßstruktur angenommen (Hermann et al., 2008). Die MCT mit Gemcitabin war bei Pankreaskarzinom-Stammzellen in der Lage, die Proliferation zu hemmen (Hermann et al., 2008).

Eine Übersicht über die verschiedenen Mechanismen der MCT ist der Abb. 2 zu entnehmen (Cazzaniga et al., 2019b). Die Erkenntnisse zu den Mechanismen der MCT werden in Zukunft aller Wahrscheinlichkeit nach weiter anwachsen. Endokrine Effekte könnten von Relevanz sein und die Immunmodulation bedarf ebenfalls weiterer Forschung (Cazzaniga et al., 2021a; Cazzaniga et al., 2019b; Munzone & Colleoni, 2015).

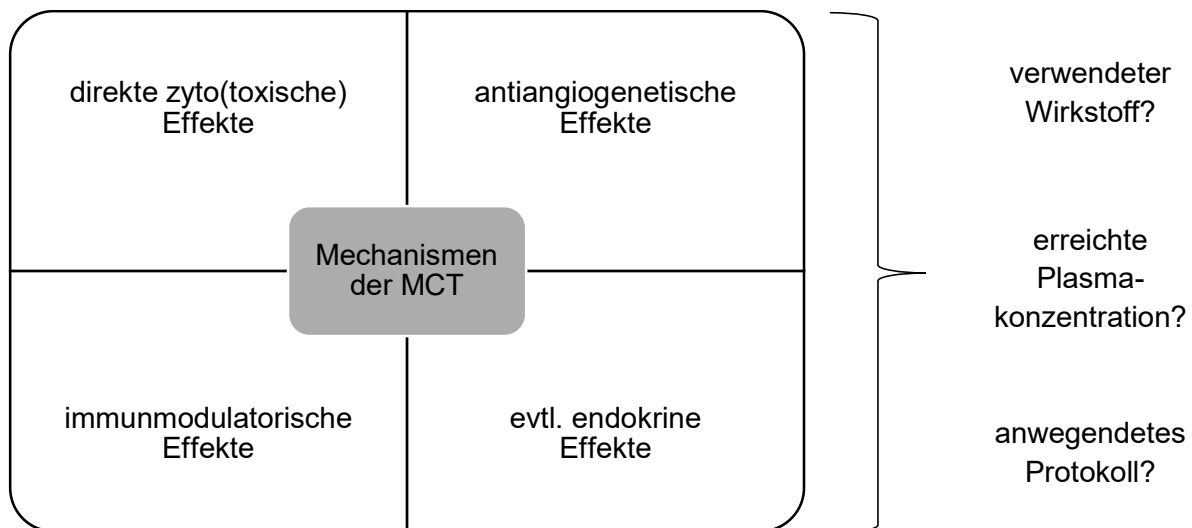


Abbildung 2: Multimechanismus der metronomischen Chemotherapie (MCT). Eigene Grafik, auf Basis von: Cazzaniga et al., 2019b.

Bereits in den ersten Jahren nach Aufkommen des metronomischen Ansatzes wurde die Notwendigkeit zur Ermittlung geeigneter Wirkstoffe, Dosierungen und Behandlungsregime gefordert sowie auf den Bedarf geeigneter Biomarker hingewiesen (Kerbel & Kamen, 2004). Allerdings konnten hierzu bis heute keine abschließenden Empfehlungen ausgesprochen werden (Cazzaniga et al., 2021a; Cazzaniga et al., 2019b; Lien et al., 2013). Auch im Rahmen präklinischer Studien vielversprechend klingende Biomarker scheiterten bisher häufig am Transfer in die klinische Praxis und führten zu ernüchternden Ergebnissen (Kerbel & Shaked, 2017; Shaked et al., 2005). Aufgrund der vielfältigen Aspekte, auf welche die MCT Einfluss nimmt, ist dieses Behandlungskonzept von zunehmendem Interesse.

2.2.3. MCT in der Klinik

Im Folgenden soll eine Übersicht über die klinische Anwendung der MCT mit dem Fokus auf VRL bei der Therapie des MBC gegeben werden.

Eine 80 Publikationen und knapp 3.700 Patient:innen einschließende systematische Literaturrecherche von 2013 zur MCT kam zu dem Ergebnis, dass niedrig dosierte Chemotherapeutika einen adäquaten klinischen Nutzen zeigen und toxische Effekte selten auftreten (Lien et al., 2013). Die häufigste Tumorentität war hierbei Brustkrebs mit 26,3 %, das am häufigsten eingesetzte Chemotherapeutikum CTX mit 43 %; VRL machte 14 % aus (Lien et al., 2013). Die Objective Response Rate (ORR) betrug 26,0 %, die Clinical Benefit Rate (CBR) 46,5 %, das Progression Free Survival (PFS) im Mittel 4,6 Monate und die Disease Control Rate (DCR) 56,3 %, wobei die berichteten Outcomeparameter zwischen den Studien divergierten (Lien et al., 2013). Die Autor:innen konnten keine Zusammenhänge zwischen den klinischen Outcomeparametern und den Therapieregimen ableiten (Lien et al., 2013). Schwere Neutropenien kamen bei 5,4 % aller Patient:innen vor und waren unter den unerwünschten Ereignissen (AE) Grad 3/4 am häufigsten. Insgesamt zeigte die MCT jedoch ein gutes Verträglichkeitsprofil (Lien et al., 2013). Eine etwas jüngere Metaanalyse von 2017 (Y. Liu et al., 2017) berücksichtigte explizit nur Brustkrebs und wertete 22 Studien mit 1.360 Patient:innen aus, wobei sich ein Teil der einbezogenen Studien bereits bei Lien et al. (2013) findet. Die mittlere ORR betrug 34,1 %, das 6-Monats-PFS 56,8 % und die CBR 55,6 %. Auch in dieser Analyse waren nicht alle Outcomeparameter für alle Studien vorhanden (Y. Liu et al., 2017). Mit 29,5 % Grad 3/4 AE lagen diese im Mittel höher als in anderen Untersuchungen und in Kombinationsregimen traten toxische Effekte zudem häufiger auf als bei alleiniger MCT (Y. Liu et al., 2017). Dennoch postulierten die Autor:innen ein insgesamt günstiges Verhältnis von klinischer Wirksamkeit zu Verträglichkeit (Y. Liu et al., 2017). Vergleicht man die Outcomeparameter der beiden Metaanalysen, ist zu erkennen, dass Brustkrebs in der Studie von Y. Liu et al. (2017) im Vergleich zu der Analyse von Lien et al. (2013) die günstigeren Ergebnisse erzielte (Y. Liu et al., 2017).

In der VICTOR-6-Studie von Cazzaniga et al. (2019c) wurden in einer multizentrischen, retrospektiven Kohortenanalyse 584 Frauen unter MCT bei MBC betrachtet. Ziel dieser Studie war neben Outcomeparametern primär die Beschreibung der Patientinnen-Charakteristik (Cazzaniga et al., 2019c). Die meisten Patientinnen mit MCT erhielten diese in Monotherapie (79,3 %), VRL war am häufigsten (34,6 %). Gleichzeitig konnten für VRL im Vergleich zu den anderen Chemotherapeutika in der Erstlinienbehandlung die besten Werte für die Ansprechrate (44 % solo; 36,7 % kombiniert) und die Krankheitskontrolle (88 % solo; 82,4 % kombiniert) festgestellt werden. Das PFS betrug 7,2 Monate bei VRL-Monotherapie und 9,5 Monate bei kombinierten VRL-Regimen. Die mittlere Zeit von Therapiebeginn bis zum vorzeitigen Beenden der Maßnahme betrug 6,3 Monate und zeigte sich unabhängig des

Chemotherapeutikums (Cazzaniga et al., 2019c). Es konnte kein Zusammenhang zwischen den Outcomeparametern und den verwendeten Therapieregimen hergestellt werden, wie bereits in vorherigen Analysen (Cazzaniga et al., 2019c; Lien et al., 2013; Y. Liu et al., 2017). Auch die Tumorcharakteristik ließ diesbezüglich keine Rückschlüsse zu (Cazzaniga et al., 2019c). Unter den Grad 3/4 AE dominierten hämatologische Aspekte (38,2 %); diese traten mit 5,8 % aber selten auf, was mit Lien et al. (2013) vergleichbar ist (Cazzaniga et al., 2019c). Die Autor:innen schlussfolgerten, dass VRL für eine MCT vielversprechend zu sein scheint (Cazzaniga et al., 2019c).

In der VICTOR-1-Studie wurde die Kombination von metronomisch dosiertem VRL mit einer fixen, ebenfalls metronomischen Dosis CAPE bei MBC untersucht (Cazzaniga et al., 2014). In Phase I konnte eine MTD von 40 mg VRL 3x/Woche bei 500 mg CAPE 3x/d ermittelt werden. Phase II zeigte, dass Grad 3/4 AE insgesamt selten waren und überwiegend das hämatologische System betrafen. Klinisch profitierten 18 von 31 Patientinnen (CBR 58,1 %) (Cazzaniga et al., 2014). Die VICTOR-2-Studie bestätigte zum einen die gute Verträglichkeit der vorangegangenen VICTOR-1-Studie und zum anderen konnten die Tumorsubtypen (65 % HR_{pos} vs. 35 % TNBC) unabhängig voneinander bewertet werden (Cazzaniga et al., 2016b). Für die HR_{pos}-Gruppe ergab sich eine CBR von 55,8 %, das PFS betrug 8,2 Monate. Während bei TNBC eine CBR von 35,7 % und ein PFS von 4,7 Monaten resultierten (Cazzaniga et al., 2016b). Zwar waren die Ergebnisse bei TNBC schlechter als bei HR_{pos}, allerdings ist das Ansprechen auf die MCT bei bereits vorbehandelten Patientinnen mit diesem Tumorsubtyp als klinisch relevant zu bezeichnen (Cazzaniga et al., 2016b).

Montagna et al. (2017) untersuchten die Effektivität und Toxizität einer metronomischen Kombinationsbehandlung bei HR_{pos} MBC, bestehend aus 500 mg CAPE 3x/d, 50 mg CTX 1x/d und 40-50 mg VRL 3x/Woche. Primärer Endpunkt war die Time to Progression (TTP), welche für die Gruppe der nicht vorbehandelten Patientinnen 25,1 Monate betrug und für die vorbehandelte Kohorte 11,2 Monate (Montagna et al., 2017). Insgesamt wurde das Therapieregime gut vertragen. Grad 4 AE traten nicht auf, Grad 3 AE waren bei der vorbehandelten Gruppe seltener, hier trat v. a. das Hand-Fuß-Syndrom auf, allerdings machte dieses lediglich 7 % aus (Montagna et al., 2017). Die Autor:innen leiteten eine gute klinische Wirksamkeit bei geringer Toxizität für dieses Behandlungsregime ab (Montagna et al., 2017).

Auf Basis von Dosisfindungsstudien zu metronomischem VRL werden in Monotherapie meist eine Gabe von 50 mg VRL 3x/Woche und bei Kombinationsregimen 30-40 mg VRL 3x/Woche empfohlen (Briasoulis et al., 2013; Briasoulis et al., 2009; Cazzaniga et al., 2019b). Bei Saridaki et al. (2012) waren es 60 mg VRL 3x/Woche. In den Studien wurden Serumkonzentrationen in einem Bereich von 0,51-2,6 ng/ml ermittelt (Briasoulis et al., 2013; Briasoulis et al., 2009).

In der Zusammenschau ist festzuhalten, dass die Datenlage für metronomisch dosiertes VRL sowohl zu den bekannten Mechanismen als auch in der klinischen Anwendung umfangreich ist (Bocci & Kerbel, 2016; Cazzaniga et al., 2019b; C.-T. Liu et al., 2021; Saridaki et al., 2012). VRL erzeugt auch in niedriger Dosierung klinisch relevante Effekte und weist gleichzeitig ein gutes Verträglichkeitsprofil auf.

2.3. Zielgerichtete Therapie

Es gibt Untersuchungen zur Kombination von MCT mit einer endokrinen Behandlung, z. B. Letrozol oder Fulvestrant (Adamo et al., 2019; Cazzaniga et al., 2017a; Cazzaniga et al., 2019b). Allerdings existiert keine Empfehlung zur Einleitung einer MCT, solange auf die endokrine Behandlung ein Therapieansprechen besteht (Cardoso et al., 2020; Cazzaniga et al., 2017a).

Die Kombination einer MCT mit weiteren zielgerichteten Therapien wurde ebenfalls bereits untersucht (Bocci & Kerbel, 2016; Cazzaniga et al., 2019a; Romiti et al., 2017). Bspw. in Kombination mit Bevacizumab (anti-VEGF), Erlotinib (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor-Inhibitor, anti-EGFR), Veliparib (Poly-ADP-Ribose-Polymerase-Inhibitor) und Trastuzumab (anti-HER2) (Montagna et al., 2014; Romiti et al., 2017).

Zielgerichtete Therapeutika kommen dann in Frage, wenn eine entsprechende Zielstruktur (Target) als geeignet identifiziert werden kann. Ein weiterer potenzieller Angriffspunkt ist die PI3K aufgrund des häufigen Auftretens von *PIK3CA*-Mutationen bei Brustkrebs.

2.3.1. PI3K-Signalweg

Die Entdeckung des Enzyms PI3K wurde 1985 erstmals beschrieben (Whitman et al., 1985) und der zugehörige PI3K-Signalweg erlangt seitdem zunehmend an Bedeutung bei der Erforschung von Tumoren, einschließlich Brustkrebs (Bilanges et al., 2019; Khezri et al., 2022; Martínez-Sáez et al., 2020; Millis et al., 2019). Bisher konnten diverse Veränderungen innerhalb der PI3K-Signalkaskade im Zusammenhang mit Tumoren identifiziert werden (T. W. Miller et al., 2011; Millis et al., 2019; Vivanco & Sawyers, 2002). Die PI3K ist in eine intrazelluläre Kaskade eingebettet, welche bei Aktivierung die Zellproliferation, das Zellwachstum, die Angiogenese und die Migration fördert sowie die Apoptose hemmt (Bilanges et al., 2019; Ciruelos Gil, 2014; Khezri et al., 2022; Vivanco & Sawyers, 2002). Es sind drei Klassen der PI3K bekannt, wobei die Klasse Ia aus onkologischer Perspektive am intensivsten untersucht ist (Bilanges et al., 2019; Ciruelos Gil, 2014; Vivanco & Sawyers, 2002). In einem heterodimeren Aufbau interagieren eine regulatorische und eine katalytische Untereinheit. Es sind fünf regulatorische Untereinheiten (p50 α , p55 α , p55 γ , p85 α , p85 β) und drei katalytische Isoformen (p110 α , p110 β , p110 δ) der PI3K Ia bekannt (Bilanges et al., 2019; Ciruelos Gil, 2014; Vivanco & Sawyers, 2002). Neben p110 α ist die Isoform p110 β im Körper ubiquitär

präsent (Keegan et al., 2018; Ni et al., 2012). Die p85 regulatorische Untereinheit enthält eine SH2-Domäne, welche einen Link zur katalytischen Untereinheit p110 herstellen kann (Miled et al., 2007; Vivanco & Sawyers, 2002). PI3K bindet infolge der Aktivierung einer Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK) durch einen extrazellulären Liganden entweder direkt oder vermittelt über weitere Adaptoren wie Insulin-Rezeptor-Substrat 1 (IRS1) mit SH2-Domänen von p85 an die RTK. Die Hemmung der katalytischen Untereinheit wird daraufhin aufgehoben (Abb. 3) (Khezri et al., 2022; Miled et al., 2007; Vivanco & Sawyers, 2002). Eine Aktivierung von PI3K kann u. a. zusätzlich über den MAP-Kinase (*Mitogen-Activated Protein-Kinase*)-Signalweg vermittelt werden (Khezri et al., 2022; Molina & Adjei, 2006; Vivanco & Sawyers, 2002). Die Verschaltung des PI3K-Signalweges mit der MAP-Kinase-Kaskade scheint auch für Therapieresistenzen und Escapemechanismen eine Rolle zu spielen (Engelman et al., 2008; Khezri et al., 2022; Sos et al., 2009). Untersuchungen zeigen auch eine Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges durch die regulatorische Untereinheit p85 und damit unabhängig von der katalytischen Komponente (Bilanges et al., 2019). Die konsekutiv aktivierte PI3K phosphoryliert membranständiges Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) (Cantley, 2002; Vivanco & Sawyers, 2002). PIP₃ agiert als second messenger und dirigiert die PH-Domäne enthaltende Proteinkinase B (PKB, Akt, *AKT*) ebenfalls zur Zellmembran (Bilanges et al., 2019; Cantley, 2002; Vivanco & Sawyers, 2002). Es gibt drei Isoformen, welche selbst alle protoonkogen sind (Bilanges et al., 2019; Khezri et al., 2022). Die Serin-/Threonin-Kinase PKB wird ihrerseits durch die Kinase PDK1 (3-Phosphoinositide-Dependent protein Kinase-1) an der Position Thr308 und durch mTORC2 (mammalian Target Of Rapamycin, \triangleq PDK2) an der Position Ser473 phosphoryliert und durch beide Reaktionen vollständig aktiviert (Bilanges et al., 2019; Vivanco & Sawyers, 2002). PDK1 kann darüber hinaus weitere Kinasen phosphorylieren, welche ebenfalls das Zellwachstum stimulieren (Bilanges et al., 2019; Cantley, 2002). Die Folgen sind insbesondere die Förderung von Proliferation, Angiogenese und die Hemmung der Apoptose (Khezri et al., 2022; Vivanco & Sawyers, 2002). Mittels der Phosphatase PTEN (Phosphatase and Tensin homolog, *PTEN*) kann der second messenger PIP₃ zu PIP₂ dephosphoryliert werden (Khezri et al., 2022; Vivanco & Sawyers, 2002). *PTEN* ist somit ein Tumorsuppressor. Auch *PTEN*-Mutationen konnten in vielen Tumoren, insbesondere fortgeschrittenen Krebserkrankungen, nachgewiesen werden (Cantley, 2002; Millis et al., 2019; Vivanco & Sawyers, 2002).

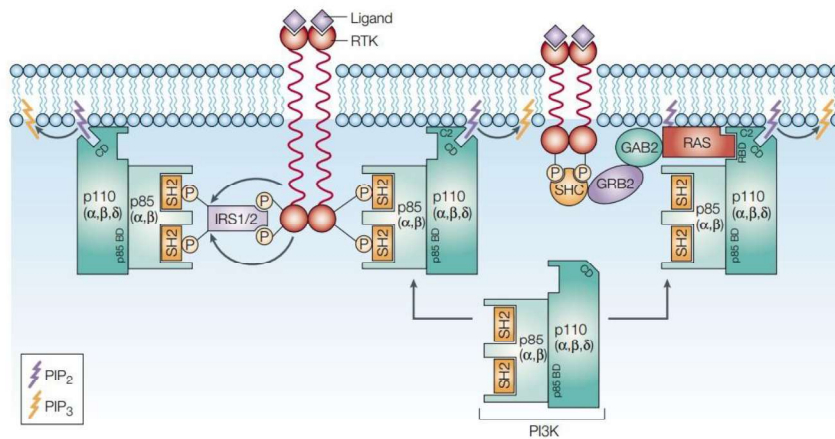


Abbildung 3: Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-Aktivierung. RTK = Rezeptor-Tyrosin-Kinase; IRS = Insulin-Rezeptor-Substrat; P = Phosphatgruppe; PIP₂ = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PIP₃ = Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat; CD = katalytische Domäne; BD = bindende Domäne; RBD = RAS-bindende Domäne; SH2 = SH2 Domäne; Adaptorproteine: SHC, GRB2, GAB2. Quelle: Vivanco und Sawyers (2002).

Für das Zellwachstum ist die Schnittstelle von PKB zu mTORC1 von Bedeutung, wodurch die Proteinbiosynthese gefördert wird (Bilanges et al., 2019; Vivanco & Sawyers, 2002). Die Hemmung der Apoptose basiert u. a. auf einer PKB-abhängigen Phosphorylierung der Moleküle BAD und BAX (Bilanges et al., 2019; Vivanco & Sawyers, 2002). Außerdem kommt es durch PKB zur Phosphorylierung von Caspasen, welche hierdurch inhibiert werden (Khezri et al., 2022; Vivanco & Sawyers, 2002). Für die Förderung der Proliferation spielt die Phosphorylierung der Kinase GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase-3 β) durch PKB ebenfalls eine wichtige Rolle, da GSK3 β in der Folge Cyclin D1 nicht mehr phosphorylieren und dem Proteasom-System zuführen kann (Bilanges et al., 2019; Vivanco & Sawyers, 2002). Weitere Effekte lassen sich auf vermittelte Interaktionen der PKB mit NF- κ B und p53 zurückführen (Khezri et al., 2022; Vivanco & Sawyers, 2002). AKT-unabhängige Mechanismen von PI3K werden z. B. im Zusammenhang mit zytoskelettalen Aspekten und bei der Zellbewegung diskutiert (Bilanges et al., 2019; Vivanco & Sawyers, 2002).

Aufgrund der vielfältigen Prozesse, an denen PI3K beteiligt ist (Proliferation, Angiogenese, Migration, Apoptose-Hemmung) und aufgrund des häufigen Auftretens von Veränderungen des PI3K-Signalweges bei Tumorerkrankungen, stellt das Enzym/der Signalweg ein vielversprechendes Ziel in der Behandlung von Brustkrebs dar (Bilanges et al., 2019; Khezri et al., 2022).

2.3.2. PIK3CA

Die katalytische Untereinheit p110 α (assoziiertes Gen *PIK3CA*) besteht aus fünf Domänen: p85 α -bindende Domäne, Ras-bindende Domäne, C2-Domäne, helikale Domäne und Kinase-Domäne (Abb. 4) (S. Liu et al., 2014; Thirumal Kumar & George Priya Doss, 2017; Weinberg, 2014). *PIK3CA*-Mutationen treten bei Brustkrebs häufig auf und betreffen meist die helikale

Domäne (Positionen 542 und 545) oder die Kinase-Domäne (Position 1047) (Martínez-Sáez et al., 2020; Millis et al., 2019). Durch die Mutationen kommt es zu einem gain-of-function (Fritsch et al., 2014; Janku et al., 2014; Thirumal Kumar & George Priya Doss, 2017). Sowohl Mutationen an der Position 542 als auch an der Position 545 sind tumortreibend; am häufigsten ist ein Lysin-Austausch (E542K, E545K) (Thirumal Kumar & George Priya Doss, 2017). Bei der Mutation E545K (Exon neun) kommt es zu einer Unterbrechung der inhibitorischen Eigenschaften der helikalen Domäne gegenüber der p85 regulatorischen Untereinheit (S. Liu et al., 2014; Millis et al., 2016). Aus H1047R (Exon 20) resultiert eine Konformationsänderung in der katalytischen Untereinheit (Millis et al., 2016). Die Mutation H1047R der Kinase-Domäne ist möglicherweise die relevantere Veränderung aus onkogener Sicht (Janku et al., 2013; Thirumal Kumar & George Priya Doss, 2017). Neben den am häufigsten auftretenden Mutationen H1047R, E545K und E542K detektierten umfangreiche Analysen von Tumorisolaten und Zelllinien weitere Mutationen auch in anderen Exons von *PIK3CA* (COSMIC, 2024; Saal et al., 2005). Dies deckt sich mit Analysen, die ergaben, dass *PIK3CA*-Mutationen in den Exons neun und 20 gemeinsam einen Anteil von etwa 60-80 % bei Brustkrebs ausmachen (Martínez-Sáez et al., 2020; Millis et al., 2016; Xiao et al., 2021). Weitere Mutationen der katalytischen Untereinheit sind u. a. H1047L und N345K (COSMIC, 2024; Martínez-Sáez et al., 2020; Xiao et al., 2021).

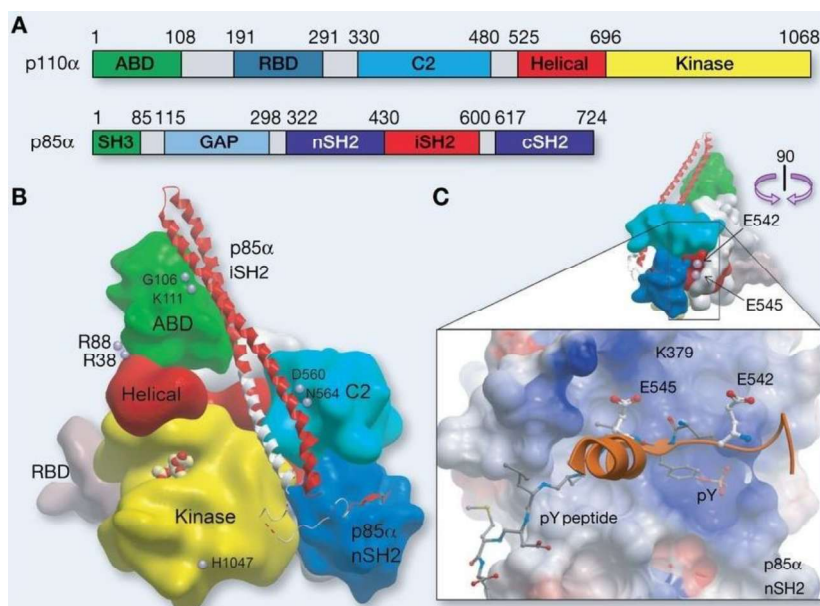


Abbildung 4: p85 α /p110 α Komplex. A: Domänen von p85 α und p110 α . B: Schema der Oberflächenstruktur des p85 α -p110 α Komplexes. C: Detailansicht der p85 α -p110 α -Interaktion. Quelle: S. Liu et al. (2014).

Bezugnehmend auf den molekularen Tumorsubtyp dominieren unterschiedliche Alterationen (TCGAN, 2012; Juric et al., 2018; Lefebvre et al., 2016; Wu et al., 2005). So findet sich bei dem Subtyp Luminal A die höchste Rate an Missense-Mutationen des Gens, wohingegen der Basal-Like Subtyp eher mit Amplifikationen von *PIK3CA* imponiert. In Relation stehen bei dem

Basal-Like Subtyp allerdings Mutationen von *PTEN* stärker im Vordergrund (Brachmann et al., 2009; TCGAN, 2012; Lokuhetty et al., 2019). Sowohl somatische Mutationen als auch Amplifikationen besitzen tumortreibendes Potential (Wu et al., 2005).

Bei der Analyse von 19.784 Isolaten solider Tumoren im Hinblick auf Veränderungen im PI3K-Signalweg konnten *PIK3CA*-Mutationen bei 31 % der Brustkrebsfälle nachgewiesen werden. Mit nahezu gleicher Häufigkeit kam ein *PTEN*-Proteinverlust in 34 % der Fälle vor. *PTEN*-Mutationen zeigten sich hingegen nur in 5 % der Fälle (Millis et al., 2016). In einer nachfolgenden Untersuchung unter Einbeziehung von 60.991 Tumorproben ergab sich über alle Tumorentitäten hinweg eine Rate von 44 % mutierter Gene im PI3K-Signalweg (Millis et al., 2019). Berücksichtigt wurden neben *PIK3CA*, *PTEN* und *AKT* auch seltenere Genveränderungen mit Tumor-Assoziation (Millis et al., 2019). Mit 33 % *PIK3CA*-Mutationen in der Brustkrebsgruppe konnten vorangegangene Ergebnisse bestätigt werden (Millis et al., 2016; Millis et al., 2019). (Sonstige) Mutationen von *PTEN* und *AKT* (3 %) waren insgesamt deutlich seltener (Millis et al., 2016). Die Differenzierung zwischen *PTEN*-Proteinverlust und *PTEN*-Mutation ergibt sich derart, dass ein *PTEN*-Proteinverlust nicht zwangsläufig Folge einer Mutation ist und umgekehrt nicht jede *PTEN*-Mutation zu einem Verlust des Genprodukts führt (Janku et al., 2014; Millis et al., 2016). Letzteres lag wohl aber in knapp drei Viertel aller untersuchten Tumorisolate vor (Millis et al., 2016). Konkret scheint es für die Tumorigenität von größerer Relevanz zu sein, wieviel *PTEN*-Produkt tatsächlich in der Zelle vorliegt und weniger die Betrachtung einer konkreten Mutation (Weigelt et al., 2011). In nur etwa 5 % der Fälle treten bei Brustkrebs *PIK3CA*- und *PTEN*-Mutationen gleichzeitig auf (Millis et al., 2016). Dies steht in Einklang zu der Analyse von Saal et al. (2005), welche in lediglich zwei Fällen ein gleichzeitiges Auftreten von *PIK3CA*- und *PTEN*-Mutation bei untersuchten Gewebeproben und Brustkrebszelllinien beschrieben. Die Auswertung von 1.090 histopathologischen Proben verschiedener Tumoren auf das gleichzeitige Auftreten von *PIK3CA*-Mutationen und Veränderungen von *PTEN* zeigten in einer anderen Untersuchung ebenfalls nur in 1 % der Fälle ein gemeinsames Auftreten (Janku et al., 2014). Saal et al. (2005) schlussfolgerten, dass sich beide Mutationen im Auftreten gegenseitig eher ausschließen oder zumindest nicht wahrscheinlich in Kombination auftreten.

Insgesamt lieferten die Analysen von Millis et al. (2016; 2019) ähnliche Ergebnisse, wie sie auch durch das Cancer Genome Atlas Network (2012) ermittelt wurden. In einer retrospektiven Analyse von Lefebvre et al. (2016) fanden sich *PIK3CA*-Mutationen in 37 % der Fälle von frühem Brustkrebs und in 40 % der Fälle von MBC. Dies ist vereinbar mit Saal et al. (2005), bei denen ebenfalls etwa gleichbleibende Häufigkeiten von *PIK3CA*-Mutationen über die Tumorstadien I-IV beschrieben wurden. Bei Wu et al. (2005) fanden sich 20,6-33,3 % somatische Mutationen von *PIK3CA*, je nachdem, ob es sich um Zelllinien oder primäre

Tumorisolate handelte. Außerdem wurde gezeigt, dass die Aktivität von *AKT* mit dem *PIK3CA*-Mutationsstatus korreliert (Wu et al., 2005).

Auch die Expression von HR ist bei *PIK3CA*-Mutationen verstärkt, bzw. HR_{pos}-Proben weisen auch häufiger *PIK3CA*-Mutationen auf (Millis et al., 2016; Pang et al., 2014; Saal et al., 2005; Xiao et al., 2021). Je nach Literatur trifft der Status einer vorhandenen *PIK3CA*-Mutation auf über ein Drittel aller Fälle mit HR-Positivität zu (Bosch et al., 2015; Xiao et al., 2021). Dieser Zusammenhang gilt auch für das gemeinsame Auftreten von *PIK3CA*-Mutationen und HER2 (Millis et al., 2016; Saal et al., 2005). Dies steht in Widerspruch zu einer Publikation von Bachman et al. (2004), die keinen Zusammenhang zwischen HR-/HER2-Status und *PIK3CA*-Mutation feststellten. Allerdings war deren Stichprobengröße für Korrelationsanalysen evtl. zu gering und die Ergebnisse anderer Autor:innen sind möglicherweise zuverlässiger (Bachman et al., 2004; Saal et al., 2005). Auch bei TNBC treten *PIK3CA*-Mutationen auf, jedoch seltener im Vergleich zu HR_{pos}-Subtypen (Martínez-Sáez et al., 2020; Xiao et al., 2021). Für die Gene *PIK3CD* und *PIK3CG* der anderen p110 α -Isoformen sind keine Mutationen bekannt (Furet et al., 2013). Aufgrund der häufigen Veränderung von *PIK3CA*, stellt *PIK3CA* bzw. dessen Genprodukt p110 α eine aussichtsreiche Zielstruktur in der Behandlung von Brustkrebs dar.

2.3.3. PI3K-Inhibition in der Klinik

Die Firma Novartis entwickelte den Wirkstoff Alpelisib (NVP-BYL719, Piqray®) (Abb. 5), welcher PI3K an der p110 α Untereinheit selektiv inhibiert (Fritsch et al., 2014; Furet et al., 2013; Juric et al., 2018). Mit dieser selektiven Inhibition steht ein therapeutischer Ansatz im PI3K-Signalweg zur Verfügung, welcher im Vergleich zu den unselektiven PI3K-Inhibitoren ein geringeres Nebenwirkungsprofil aufweist (Ciruelos Gil, 2014; Fritsch et al., 2014). Die Summenformel lautet C₁₉H₂₂F₃N₅O₂S, das Molekulargewicht beträgt 441,5 g/mol (Bertho et al., 2021; Leenhardt et al., 2021; NCBI, 2024b). Die Applikation erfolgt oral (Bertho et al., 2021; Leenhardt et al., 2021). Alpelisib wird nach oraler Einnahme zügig absorbiert, weist eine Bioverfügbarkeit von etwa 60 % auf und wird primär hepato-biliär ausgeschieden (Bertho et al., 2021; Leenhardt et al., 2021). Unter dem Handelsnamen Piqray® (Novartis) ist Alpelisib seit Juli 2020 in der Europäischen Union zugelassen. Das Medikament kann Patient:innen zur Therapie des HR_{pos} fortgeschrittenen oder MBC bei/nach Krankheitsprogression unter einer anti-Hormonbehandlung und bestehender *PIK3CA*-Mutation zusammen mit Fulvestrant gegeben werden (Bertho et al., 2021). Die empfohlene Dosis beträgt 300 mg/d (Bertho et al., 2021). Im Jahr 2021 wurde Piqray® durch Novartis bis auf Weiteres vom deutschen Markt genommen (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e. V [DGHO] et al., 2021). Dies wird durch Uneinigkeiten in der Preisgestaltung zwischen Novartis und den Krankenkassen begründet. Zudem erscheint den Kostenträgern die Verschreibung des Präparats nach Kosten-Nutzen-Analyse derzeit nicht verhältnismäßig.

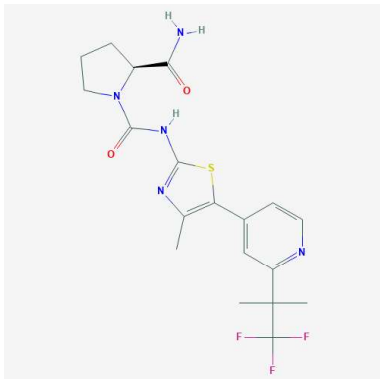


Abbildung 5: Strukturformel Alpelisib. Quelle: NCBI (2024b).

Die geringere Toxizität von Selektiv-Inhibitoren im Vergleich zu Pan-Inhibitoren ist generell ein Motivator zur Entwicklung zielgerichteter Therapeutika (Costa et al., 2015; Fuso et al., 2022; Li et al., 2021). Die Affinität von Alpelisib zu PI3K α ist etwa 50-fach stärker im Vergleich zu anderen Kinasen, welche nicht der Klasse Ia angehören (Fritsch et al., 2014). Eine Tumorantwort zeigte sich bei den somatischen *PIK3CA*-Mutationen (E545K, H1047R) und ebenfalls bei amplifiziertem *PIK3CA*, sowohl in vitro als auch in vivo (Fritsch et al., 2014). Unter der Bezeichnung NVP-BYL719 starteten erste klinische Studien zu Alpelisib im Jahr 2010 (Furet et al., 2013).

In einer klinischen Phase Ia-Studie von Juric et al. (2018) wurde der Einfluss von Alpelisib auf Tumoren mit Mutation von *PIK3CA* untersucht. Ziel war die Ermittlung der MTD von Alpelisib bzw. die Analyse der für eine Phase II zu empfehlenden Dosis, bei welcher auch Tumoren mit *PIK3CA*-WT berücksichtigt wurden (Juric et al., 2018). Von den insgesamt 134 Patient:innen (Altersmedian 59 Jahre) entfielen die meisten auf Brustkrebs, gefolgt von kolorektalen Karzinomen. Eine MTD von 400 mg/d oder 2 x 150 mg/d konnte ermittelt werden, wobei ein objektives Tumoransprechen bereits ab 270 mg/d zu beobachten war (Juric et al., 2018). Auch in der Phase Ib-Studie zur Kombination von Alpelisib plus Fulvestrant betrug die MTD von Alpelisib 400 mg/d (Juric et al., 2019). Im Median betrug die Alpelisib-Expositionszeit 11,9 Wochen (Juric et al., 2018). Die häufigsten AE ($\geq 15\%$) waren: Hyperglykämie (51,5%), Übelkeit (50,0%), Hautveränderungen (42,5%), Appetitminderung (41,8%), Durchfall (40,3%) und Erbrechen (31,3%). Weitere AE traten seltener auf (Juric et al., 2018). Vor dem Hintergrund, dass PI3K in den Insulinstoffwechsel eingebunden ist, erscheint ein Anstieg des Blutzuckerspiegels und eine diabetische Stoffwechsellage als Nebenwirkung der Alpelisib-Behandlung nachvollziehbar (Juric et al., 2018; Vivanco & Sawyers, 2002). Dem wurde durch Dosisanpassung, Metformin- und Insulingabe entgegengewirkt, wobei sechs Personen (4,5%) die Studie vorzeitig beenden mussten (Juric et al., 2018). Bei 14 (10,4%) Patient:innen traten schwerwiegende AE ($\geq 4\%$) auf: Übelkeit, Erbrechen, Abdominalschmerzen, Dyspnoe, Hyperglykämie und Fieber (Juric et al., 2018). Von den 13 (9,7%) Todesfällen im Rahmen der Studie schienen jedoch keine therapieassoziiert zu sein (Juric et al., 2018). Bei Patientinnen

mit Brustkrebs (ER_{pos}/HER2_{neg}) und *PIK3CA*-Mutation war die ORR 4,3 %, die DCR 60,9 % und die CBR 17,4 %. Die CBR schnitt bei Brustkrebs mit einem besseren Ergebnis im Vergleich zu den anderen inkludierten Tumorentitäten ab (Juric et al., 2018). Bei Patientinnen (ER_{pos}/HER2_{neg}) ohne *PIK3CA*-Mutation zeigte sich kein klinischer Vorteil durch die Behandlung mit Alpelisib (Juric et al., 2018). Die maximale Plasmakonzentration von Alpelisib wurde nach Applikation innerhalb weniger Stunden erreicht und betrug ab einer Dosis von ca. 180 mg/d oder 2 x 120 mg/d etwa 1.000 ng/ml. Trotz der Nebenwirkungen bewerteten Juric et al. (2018) das Nutzen-Risiko-Profil für Alpelisib als eher günstig. Bei einem vergleichbaren Nebenwirkungsspektrum der Phase Ib-Studie für die Kombination von Alpelisib plus Fulvestrant schlussfolgerten die Autor:innen ebenfalls ein akzeptables Toxizitätsprofil (Juric et al., 2019). Für weitere Studien, welche Alpelisib in Kombination mit Fulvestrant untersuchten, wurde eine Dosis von 300 mg/d Alpelisib ausgewählt (Juric et al., 2019; Juric et al., 2018).

In einer klinischen Phase Ib-Studie von Mayer et al. (2017) wurde der Einfluss von Alpelisib (Dosis-escalierend) in Kombination mit dem Aromatase-Inhibitor Letrozol (2,5 mg/d) bei 26 Patientinnen (Altersmedian 53 Jahre) mit MBC (ER_{pos}/HER2_{neg}) und Resistenz gegen eine endokrine Behandlung untersucht. Ziele waren die Evaluierung von Nebenwirkungen, die Bestimmung der MTD sowie die Gewinnung von Erkenntnissen über die Wirksamkeit (Mayer et al., 2017). Die MTD der Dualbehandlung betrug 300 mg/d. Unter 350 mg/d traten bei zwei Patientinnen Dosis-limitierende Toxizitäten (DLT) auf. Die AE umfassten u. a. Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Mukositis, Müdigkeit, Hautausschlag (DLT bei 350 mg/d) und Hyperglykämie (Mayer et al., 2017). Es zeigte sich ein partielles Therapieansprechen bei 25 % der Patientinnen mit *PIK3CA*-Mutation, im Vergleich zu 10 % bei der Gruppe mit *PIK3CA*-WT. Die CBR betrug für die Kohorte mit *PIK3CA*-Mutation 44 % (≥ 6 Monate) bzw. 38 % (≥ 12 Monate), im Vergleich zu jeweils 20 % bei *PIK3CA*-WT (Mayer et al., 2017). Im Unterschied zu MBC zeigte die Kombination aus Alpelisib (300 mg/d) plus Letrozol (2,5 mg/d) in der Phase II NEO-ORB-Studie bei 257 operablen HR_{pos}-Patientinnen im adjuvanten Umfeld hingegen keinen Vorteil gegenüber Placebo (Mayer et al., 2019).

Rodón et al. (2018) beschrieben eine klinische Phase Ib-Studie zur Dosisfindung von Alpelisib bei gleichzeitiger Gabe von Paclitaxel bei 19 Patient:innen mit soliden Tumoren, am häufigsten Brustkrebs (Altersmedian 57 Jahre). Paclitaxel wurde in einer fixen Dosierung appliziert (80 mg/m² 1 x pro Woche). Aufgrund von AE unterblieb die Dosiserweiterung von Alpelisib im Verlauf und die Studie wurde vorzeitig beendet (Rodón et al., 2018). Für Alpelisib konnte eine MTD von 150 mg/d plus Paclitaxel 80 mg/m² 1 x pro Woche ermittelt werden. Dabei betrug die maximale Plasmakonzentration von Alpelisib nach etwa 3 h 1.390 ng/ml und war damit etwas höher als bei Juric et al. (2018) (Rodón et al., 2018). Die häufigsten AE (≥ 40 %) waren: Durchfall, Hyperglykämie, Anämie, Asthenie und Übelkeit. Bei den Grad 3/4 AE (≥ 10 %) waren es: Hyperglykämie, Anämie, Durchfall, Lymphopenie, Neutropenie und Leukopenie,

wobei drei Personen (15,8 %) die Studie vorzeitig verlassen mussten (Rodón et al., 2018). Als DLT waren Leukopenie, Hyperglykämie und akute Nierenschädigung zu nennen (Rodón et al., 2018). Ein Todesfall war während der Studie aufgrund von Krankheitsprogression zu verzeichnen (Rodón et al., 2018). Die häufig auftretende und therapiebedürftige Hyperglykämie deckt sich mit Erfahrungen aus anderen Studien und wurde durch Dosisanpassung, Metformin- und Insulingabe behandelt (F. André et al., 2019; Juric et al., 2018; Rodón et al., 2018).

Mit der Kombination aus nab-Paclitaxel und Alpelisib evaluierten Sharma et al. (2021) in einer Studie bei Patientinnen mit HER2_{neg} MBC (Altersmedian 55 Jahre, Phase I n=13, Phase II n=30) die zu empfehlende Phase II Dosis sowie die ORR und weitere sekundäre Parameter. Nab-Paclitaxel wurde mit 100 mg/m² fix dosiert, für Alpelisib erfolgten Dosissteigerungen von 250 bis 350 mg/d. Im Unterschied zu Rodón et al. (2018) musste die Studie nicht vorzeitig beendet werden und es konnte eine Dosis von 350 mg/d anstatt 150 mg/d Alpelisib für die Phase II empfohlen werden (Sharma et al., 2021). Das Toxizitätsspektrum zwischen Rodón et al. (2018) und Sharma et al. (2021) ist vergleichbar, die Ausprägung der Schweregrade war in der jüngeren Studie insgesamt geringer. Alle Patientinnen erhielten prophylaktisch Antihistaminika und Hyperglykämien wurden mit Metformin behandelt (Sharma et al., 2021). Sharma et al. (2021) konnten zeigen, dass Alpelisib auch bei TNBC in Kombination mit einer Chemotherapie bei akzeptablem Toxizitätsprofil und überwiegend kontrollierbaren Nebenwirkungen effektiv ist.

F. André et al. (2019) untersuchten in der Phase III SOLAR-1-Studie den Einfluss von Alpelisib (300 mg/d) in Kombination mit Fulvestrant (500 mg intramuskulär, Tage 1+15 Zyklus 1, anschließend Tag 1 der Zyklen) bei HR_{pos}/HER2_{neg} Brustkrebs unter Berücksichtigung des *PIK3CA*-Status auf das PFS (primärer Endpunkt). Bei der randomisierten, Placebo-kontrollierten doppelverblindeten Studie in 34 Ländern wurden 572 Patient:innen (341 mit *PIK3CA*-Mutation) eingeschlossen, bei denen trotz endokriner Therapie ein Fortschreiten der Erkrankung festzustellen war (Altersmedian 63 Jahre) (F. André et al., 2019). In der Placebo-Gruppe zeigten sich keine Unterschiede zwischen der Kohorte mit *PIK3CA*-Mutation und der Kohorte mit *PIK3CA*-WT bzgl. des PFS (5,7 Monate vs. 5,6 Monate) (F. André et al., 2019). Hingegen betrug das PFS bei Alpelisib in Kombination mit Fulvestrant für diejenigen mit *PIK3CA*-Mutation elf Monate und bei Personen ohne *PIK3CA*-Mutation lediglich 7,4 Monate (F. André et al., 2019). Nach zwölf Monaten betrug der PFS-Anteil von Patient:innen mit *PIK3CA*-Mutation 46,3 % bei Alpelisib-Fulvestrant und 32,9 % bei Placebo-Fulvestrant (F. André et al., 2019). Ohne *PIK3CA*-Mutation war der Unterschied zwischen den beiden Gruppen geringer (28,4 % vs. 22,2 %) (F. André et al., 2019). Die häufigsten AE waren: Hyperglykämie, Hautausschlag, Durchfall, Übelkeit und Appetitminderung (F. André et al., 2019; Rugo et al., 2020). Die Hyperglykämie trat unter Alpelisib in 63,7 % der Fälle auf, bei

der Placebo-Gruppe waren es 9,8 %. Auch die anderen AE traten bei Alpelisib häufiger auf (F. André et al., 2019). Bei den Grad 3/4 AE (≥ 10 %) waren es Hyperglykämie, Hautausschlag und Durchfall (F. André et al., 2019; Rugo et al., 2020). Ein vorzeitiges Ausscheiden aus der Studie zeigte sich bei 25,0 % der Personen in der Alpelisib-Fulvestrant-Gruppe und in 4,2 % der Fälle der Placebo-Fulvestrant-Gruppe. Während der Studie kam es zu 19 Todesfällen, davon fünf bzw. acht infolge der Brustkrebserkrankung in der Alpelisib-Fulvestrant- bzw. der Placebo-Fulvestrant-Gruppe (F. André et al., 2019). Aufgrund der Überlegenheit von Alpelisib-Fulvestrant gegenüber Placebo-Fulvestrant bzgl. des PFS bei Patient:innen mit Krankheitsprogression unter vorheriger endokriner Therapie, befürworteten F. André et al. (2019) eine routinemäßige Testung auf den Mutationsstatus von *PIK3CA*, analog Fritsch et al. (2014). Das Management der Nebenwirkungen im Verlauf der SOLAR-1-Studie wurde in einer Folgepublikation von Rugo et al. (2020) diskutiert. Im Median traten die Grad 3/4 AE nach 15 Tagen für die Hyperglykämie, nach 13 Tagen für den Hautausschlag und nach 139 Tagen für den Durchfall auf (Rugo et al., 2020). Von den insgesamt 187 Patient:innen mit Hyperglykämie erhielt ein Großteil (163 Personen) eine antidiabetische Behandlung, meist Metformin (87,1 %). Zudem wurden andere Antidiabetika eingesetzt (Rugo et al., 2020). Bei immerhin 19 der 52 Patient:innen mit Insulintherapie war dies im Rahmen einer Notfallbehandlung erforderlich (Rugo et al., 2020). Zum Management der Hauttoxizität kamen bei 134 Personen (topische) Steroide und orale Antihistaminika zur Anwendung, idealerweise erfolgte die Therapie bereits vor Einsetzen der Hautausschläge (Rugo et al., 2020). Bei den 164 Patient:innen mit Durchfall war Loperamid das Mittel der Wahl (Rugo et al., 2020). Für das bessere Management von Nebenwirkungen wurde im Studienverlauf das Einschlusskriterium für den HbA1c-Wert von < 8 % auf $< 6,5$ % gesenkt. Außerdem wurden Antihistaminika bereits vor Einsetzen von Hautveränderungen und häufigere klinische Kontrollen zur Früherkennung von Nebenwirkungen empfohlen, wobei sich bei weiteren Analysen keine neuen Erkenntnisse bzgl. sicherheitsrelevanter Ereignisse ergaben (F. André et al., 2021; Rugo et al., 2020). Schlussendlich war das OS als sekundärer Endpunkt der SOLAR-1-Studie in der *PIK3CA*-mutierten Kohorte im Median 7,9 Monate höher bei der Alpelisib-Fulvestrant-Gruppe (39,3 Monate) im Vergleich zur Placebo-Fulvestrant-Gruppe (31,4 Monate). Wenngleich die Ergebnisse statistisch nicht signifikant waren ($p=0,15$), schlussfolgerten F. André et al. (2021) eine hinreichende klinische Relevanz. Von den Patient:innen, welche aus der Studie ausschieden, erhielten die meisten eine Chemotherapie-basierte Weiterbehandlung (F. André et al., 2021).

Die Einordnung der in der realen Welt beobachteten Effektivität und Toxizität von Alpelisib bedingt jedoch eine multimodale Betrachtung. So scheinen die Anzahl und Art der Vorbehandlungen Einfluss zu nehmen. Ebenfalls von Relevanz sind der Krankheitsfortschritt und Begleiterkrankungen (Alaklabi et al., 2022; J. Miller et al., 2022; Sarfraz et al., 2023). Neben einem Tumorprogress als Ursache für einen Therapieabbruch ist der Anteil derer, die

aufgrund von AE (Hyperglykämie, Hautausschlag, Durchfall) eine Alpelisib-Behandlung beenden mussten, mit ca. 25-35 % als relevant zu bewerten. Bei den Patient:innen sollte daher eine individuelle Risiko-Nutzen-Abwägung erfolgen. Eine engmaschige multidisziplinäre Begleitung sollte zudem erfolgen, um Nebenwirkungen sofort erkennen und behandeln zu können. Die Prophylaxe und Behandlung von Hyperglykämien sollten großzügig und nicht zurückhaltend geschehen. Ebenfalls sollten präventive Maßnahmen auch für die Hauttoxizität Anwendung finden (Alaklabi et al., 2022; Burnette et al., 2023; Cheung et al., 2022; J. Miller et al., 2022; Rugo et al., 2022; Sarfraz et al., 2023; Weintraub et al., 2024; Ziegenggeist et al., 2024). Sowohl Hyperglykämie als auch Hautaffektionen sind prinzipiell reversibel und bereits präventiv behandelbar, sodass die Alpelisib-Behandlung dadurch prolongiert werden kann (Cheung et al., 2022; Rugo et al., 2022).

2.4. PI3K und (Chemo)-Therapieresistenz

Der PI3K-Signalweg ist im Zusammenhang mit Resistenzen gegen (Chemo)-Therapeutika relevant (Brandão et al., 2019; Burris, 2013; W.-C. Huang & Hung, 2009; Khezri et al., 2022; West et al., 2002). Eine erhöhte Aktivität des PI3K-Signalweges kann die Wirkung von Chemotherapeutika limitieren, zu Resistenzen gegen die Behandlung führen und sich Prognose-verslechternd auswirken (Burris, 2013; W.-C. Huang & Hung, 2009; Sobhani et al., 2018; West et al., 2002). In einer Literaturrecherche zu verfügbaren Studien zum Zusammenhang von *PIK3CA*-Mutationen und klinischem Outcome wurde über alle adjuvanten Vortherapien eine Hazard-Ratio von 1,67 (95 %-Konfidenzintervall 1,15-2,43) ermittelt (Sobhani et al., 2018). Auch für neoadjuvante Chemotherapien gibt es Hinweise, dass die Rate kompletter Remissionen bei *PIK3CA*-Mutation reduziert ist (Dong et al., 2022; Yang et al., 2019). Bereits 2003 beschrieben Knuefermann et al., dass die provozierte Erhöhung von phosphoryliertem Akt (p-Akt) über Stimulation der HER2-Expression zu einer PI3K-assoziierten Resistenz gegen verschiedene Chemotherapeutika führt und diese Therapieresistenz durch PI3K-Inhibition wieder aufgehoben werden kann (Knuefermann et al., 2003).

Auf der anderen Seite gibt es für eine Chemotherapie in einem metronomischen Design Hinweise darauf, dass sie im Vergleich zu konventionellen Chemotherapien die Entstehung von Therapieresistenzen reduzieren bzw. diese überwinden kann (N. André et al., 2017; Biziota et al., 2017; Munoz et al., 2005; Romiti et al., 2017). Dies wird auf den multimodalen Mechanismus der MCT zurückgeführt, wohingegen das Ziel einer konventionellen Chemotherapie in der direkten, möglichst starken zytotoxischen Wirkung besteht (Cazzaniga et al., 2021a; Munoz et al., 2005; Romiti et al., 2017). Niedrige Konzentrationen von Chemotherapeutika sind bspw. in der Lage, die Migration (von Endothelzellen) über Beeinflussung von Cdc42 und Rac1 zu hemmen (Schwartz, 2009). Auf diese zytoskelettalen Aspekte wirkt auch der PI3K-Signalweg ein (Bilanges et al., 2019; Vivanco & Sawyers, 2002).

In der Zusammenschau ist festzuhalten, dass *PIK3CA*-Mutationen bei Brustkrebs häufig auftreten und eine konsekutiv erhöhte PI3K-Aktivität tumortreibendes Potential besitzt. Zudem fördern *PIK3CA*-Mutationen die Entstehung von Therapieresistenzen und wirken sich ungünstig auf die Prognose aus. Der in diese Signalkaskade eingreifende p110 α -selektive PI3K-Inhibitor Alpelisib zeigte in Studien einen klinisch relevanten Effekt, wenngleich durch die Therapie charakteristische Nebenwirkungen zu erwarten sind.

3. Zielsetzung der Arbeit

Obwohl in der Behandlung von Brustkrebs in den vergangenen Jahren Verbesserungen erzielt wurden, ist MBC nach wie vor mit einer schlechten Prognose assoziiert und das therapeutische Portfolio ist in diesen Fällen häufig auf Chemotherapie-basierte Behandlungsregime beschränkt (Foulkes et al., 2010; Gennari et al., 2021; Harbeck & Gnant, 2017; Mosele et al., 2020; Munzone & Colleoni, 2015). Im Vordergrund stehen in palliativer Situation die Lebenszeitverlängerung, die Symptomkontrolle und die Aufrechterhaltung einer angemessenen Lebensqualität (Cardoso et al., 2020; Gennari et al., 2021; Harbeck & Gnant, 2017; Perroud et al., 2016). Das Konzept der MCT bei MBC scheint bei gegebener klinischer Effektivität mit einem angemessenen Toxizitätsprofil einherzugehen und stellt eine Alternative zu konventionellen Chemotherapiedesigns dar (Cazzaniga et al., 2019a; Cazzaniga et al., 2021a). Ferner ist im Unterschied zu einer konventionellen Chemotherapie ein MCT-Design aufgrund des multimodalen Wirkmechanismus möglicherweise imstande, ein prolongiertes Therapieansprechen zu bewirken (N. André et al., 2017; Biziota et al., 2017; Romiti et al., 2017). Zum Teil wird Brustkrebs nach Metastasierung infolge therapeutischer Verbesserungen der vergangenen Jahre auch als chronische Erkrankung verstanden (Schmidt, 2016).

Dennoch machen Therapieresistenzen die Entwicklung und Kombination von Wirkstoffen und neue Therapieregime in der Behandlung von MBC notwendig (Brandão et al., 2019; Fuso et al., 2022; Li et al., 2021). *PIK3CA*-Mutationen und eine erhöhte PI3K-Aktivität stehen im Zusammenhang mit Therapieresistenzen sowie Outcomeverschlechterung und sind daher als möglicher Angriffspunkt für eine zielgerichtete Therapie von Interesse (Badinloo & Esmaeili-Mahani, 2014; Dong et al., 2022; Khezri et al., 2022; Sobhani et al., 2018; Yang et al., 2019). Brustkrebs wird durch Janku et al. (2014) als geeignete Tumorentität für die zielgerichtete Therapie im PI3K-Signalweg beschrieben.

Die Kombination einer Chemotherapie mit PI3K-Inhibition stellt bei MBC daher eine mögliche Option dar (Fuso et al., 2022; Harbeck & Gnant, 2017; Li et al., 2021; Rodón et al., 2018). Bei Rodón et al. (2018) war die Kombination von Alpelisib plus Paclitaxel mit relevanten Toxizitäten der Therapie verbunden, allerdings erfolgte die Dosierung des Chemotherapeutikums konventionell. Aufgrund dessen wurde in der vorliegenden Arbeit die Kombination von Alpelisib mit dem metronomisch dosierten Mitosehemmstoff VRL auf das Verhalten von Brustkrebszellen untersucht, um potenzielle synergistische Effekte zu explorieren. Nach Sichtung der zugänglichen Literatur fand diese Evaluation bisher nicht statt. VRL ist in der Brustkrebsbehandlung weit verbreitet und seit langem etabliert, es gilt als geeignet für metronomische Behandlungsregime (Bocci & Kerbel, 2016; Cazzaniga et al., 2019a). Auch für Alpelisib wurde neben einer Konzentration, welche mit Serumkonzentrationen von Personen unter Behandlung vergleichbar ist (Juric et al., 2018; Rodón et al., 2018), eine Serie geringerer Konzentrationen ausgewählt.

Metronomisches VRL und Alpelisib könnten in Kombination perspektivisch einen Kompromiss zwischen Tumorkontrolle einerseits (Lebenszeitverlängerung) und vertretbaren Nebenwirkungen durch die Behandlung andererseits (Lebensqualität) darstellen. Außerdem ergäbe sich evtl. ein neuer Therapieansatz, der auch nach Ausbildung von Resistenzen gegen vorgeschaltete Therapielinien bei MBC noch ein Ansprechen zeigt.

3.1. Forschungsfrage

Welchen Einfluss hat die Kombination von metronomisch dosiertem VRL mit dem selektiven PI3K-Inhibitor Alpelisib auf das funktionale Verhalten von Brustkrebszellen?

3.2. Leitfragen

- Inwiefern sind bei der kombinierten Behandlung mit niedrig dosiertem VRL und Alpelisib Unterschiede zwischen verschiedenen Brustkrebszelllinien aufgrund ihrer Charakteristik feststellbar (Tumorsubtyp)?
- Welche Bedeutung hat *PIK3CA* (Mutation vs. WT) für die kombinierte Behandlung mit niedrig dosiertem VRL und Alpelisib bei den Brustkrebszelllinien (Mutationsstatus)?
- Bei welchen Dosiskombinationen von niedrig dosiertem VRL und Alpelisib können bei den Brustkrebszelllinien möglicherweise etwaige synergistische Effekte festgestellt werden (Therapieregime)?

4. Material und Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern sich ausgewählte Brustkrebszelllinien bei einer Kombinationsbehandlung von metronomisch dosiertem VRL und Alpelisib funktional verhalten. Bei den interessierenden Assays handelte es sich um die Viabilität (alamarBlue®), die Proliferation (BrdU-Inkorporation) und die Migration (Boydenkammer). Zur Testung kamen die Zelllinien T-47D und MCF-7, welche jeweils unterschiedliche Missense-Mutationen von *PIK3CA* aufweisen (H1047R; E545K), sowie MDA-MB-231 und BT-549 als Kontrollzelllinien mit WT-Konfiguration des *PIK3CA*-Gens (Dai et al., 2017). Ferner wurden im Projektverlauf die Zelllinien BT-20 mit *PIK3CA*-Missense-Mutation (P539R; H1047R) und ZR-75-1 mit *PIK3CA*-WT hinzugenommen. Die Dosierungen der Wirkstoffe sollten den Serumkonzentrationen von Patient:innen entsprechen. Für VRL wurde ein metronomisches Behandlungsregime zugrunde gelegt und Dosierungen von 0,63-5,0 ng/ml gewählt (Briasoulis et al., 2013; Briasoulis et al., 2009; Mavroeidis et al., 2015). Für Alpelisib erfolgte die Dosierung in einer Spanne von 10-1.000 ng/ml (Juric et al., 2018).

4.1. Materialien

4.1.1. Therapeutische Wirkstoffe

Tabelle 3: Therapeutische Wirkstoffe (Wirkstoffe, Therapeutika)⁷

Produkt	Bestell-/Material-/Referenz-/Seriennummer	Hersteller/Lieferant
VRL (Navelbine®) 10 mg/ml		Pierre Fabre Pharma, Freiburg, Deutschland/Apotheke Universitätsmedizin Mainz
Alpelisib (Piqray®) 10 mg		Novartis, Basel, Schweiz

4.1.2. Kits

Tabelle 4: Kits

Produkt	Bestell-/Material-/Referenz-/Seriennummer	Hersteller/Lieferant
alamarBlue® Cell Viability Reagent	DAL1100	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
BrdU Cell Proliferation ELISA Kit	11647229001	Roche, Schweiz/Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MycoAlert® Plus Mycoplasma Detection Kit	LT07-710	Lonza, Basel, Schweiz
Venor®GeM Classic	11-1025	Minerva Biolabs, Berlin, Deutschland

⁷ Sofern nicht anders angegeben, bezieht sich der Terminus „Wirkstoff“ in der vorliegenden Arbeit immer auf die therapeutischen Wirkstoffe VRL und/oder Alpelisib.

4.1.3. Chemotaxine

Tabelle 5: Chemotaxine

Produkt	Bestell-/Material-/Referenz-/Seriennummer	Hersteller/Lieferant
Fibronectin, Bovine Plasma Fibronectin, 1 mg	33010-018	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kollagen I, Bornstein and Traub Type I, 1 mg	C5483	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kollagen I, human, 10 mg	sc-136154	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Kollagen IV, Bornstein and Traub Type IV, 5 mg	C5533	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Laminin, human, 1 mg	L2020	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

4.1.4. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 6: Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Bestell-/Material-/Referenz-/Seriennummer	Hersteller/Lieferant
Dimethylsulfoxid (DMSO), BioScience-Grade ($\geq 99,5\%$)	A994.2	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aqua destilliert (AD) Ampuwa® 1000 ml	1088813	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Schwefelsäure, H ₂ SO ₄ 1 Normal	1.00731.2500	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypsin-EDTA 0,25 %	T4049	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
alamarBlue® Cell Viability Reagent	DAL1100	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dulbecco's Phosphate-Buffered Solution (DPBS)	D8537	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
	14190-094	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Terralin® liquid	102001	Schülke & Mayr, Norderstedt, Deutschland
Ethanol 99,8 %, vergällt mit IPA, MEK, Bitrex	147194.1214	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethanol $\geq 99,8\%$, reinst	32205	Honeywell, Seelze, Deutschland
Händedesinfektionsmittel Sterillium® classic pure	975513	Hartmann, Heidenheim, Deutschland
Hämatologie Puffertabletten nach Weise pH 6,8	1.11374.0100	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hemacolor® Schnellfärbung von Blutastrichen Lösung 2	1.11956.2500	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hemacolor® Schnellfärbung von Blutastrichen Lösung 3	1.11956.2500	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nagellack, farblos		P2 Kosmetik, Wien, Österreich
Immersionöl Immersol 518N	060901	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Immersionöl HX90176999	1.04699.0500	Merck, Darmstadt, Deutschland
Terg-a-zyme®	Z273287	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

4.1.5. Zellen, Zellkulturmedien und Medienzusätze

Tabelle 7: Zellen, Zellkulturmedien und Medienzusätze

Produkt	Bestell-/Material-/Referenz-/Seriennummer	Hersteller/Lieferant
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640	21875-034	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	1027106	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Penicillin-Streptomycin (P/S)	P0781	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MCF-7	HTB-22	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA
T-47D	HTB-133	ATCC, Manassas, USA
ZR-75-1	CRL-1500	ATCC, Manassas, USA
MDA-MB-231	HTB-26	ATCC, Manassas, USA
BT-549	HTB-122	ATCC, Manassas, USA
BT-20	HTB-19	ATCC, Manassas, USA

4.1.6. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Bestell-/Material-/Referenz-/Seriennummer	Hersteller/Lieferant
Polypropylen-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	188261, 227261	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar® Zellkulturflaschen Standard (25 cm ² , 75 cm ²)	690175, 658175	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar® Serologische Pipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	604181, 710180, 606180, 607180, 760180	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Kälte-Konservierungs-Röhrchen Cryogenic Tubes Nunc®	10577391	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Einmalhandschuhe sempercare® nitrile (mittel, groß)		Semperit, Wien, Österreich
LUNA® Cell Counting Slides	L12001	Logos Biosystems, Südkorea/ 59650 Villeneuve-d'Ascq, Frankreich
Pipettenspitzen FilterTips, TipOne® (20 µl, 200 µl, 1000 µl)	S1120-8810, S1126-7810, S1111-6701	StarLab, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen epT.I.P.S.® (200 µl)	0030000.870	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen (20 µl)	70.3020	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Cellstar® Zellkulturplatten (96-Well), Mikrotiterplatten	655180	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Reagiergefäße 0,5 ml	0030121.023	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reagiergefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	72.706.400, 72.691, 72.704	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Aluminiumfolie, beliebig		
Pasteur-Pipetten, Glas, 230 mm, einweg	612-1702	VWR, Radnor, USA
Polycarbonat Filter/Membranen für Boydenkammer, 8 µm Poren	PFB8	Neuro Probe, Gaithersburg, USA
Objekträger Menzel-Gläser, 76 x 26 mm, geschnitten, Mattrand	12164682	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Produkt	Bestell-/Material-/Referenz-/Seriennummer	Hersteller/Lieferant
Deckgläser Menzel-Gläser, 24 x 50 mm	11836933	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Einmal-Wischtücher KIMTECH® Präzisionstücher	7552	Kimberly-Clark, Dallas, USA
Einmal-Reagenzreservoir 25 ml	HT661	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
schülke wipes safe & easy Spendereimer	70003177	Schülke & Mayr, Norderstedt, Deutschland
Entsorgungsbeutel	E706.1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pasteur-Pipetten, Kunststoff, 3 ml, einweg		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

4.1.7. Gebrauchsmaterialien

Tabelle 9: Gebrauchsmaterialien

Produkt	Bestell-/Material-/Referenz-/Seriennummer	Hersteller/Lieferant
Pipettierhilfe accu-jet® pro	26300	Brand, Wertheim, Deutschland
CoolCell® LX	CS-504X	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fluid aspiration system BVC pro	20727500	Vacuubrand, Wertheim, Deutschland
Pipetten Eppendorf Research® plus (0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	3123000020, 3123000098, 3123000047, 3123000055, 3123000063	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mehrkanal-Mikroliterpipetten Transferpette® S-8 (10-100 µl, 20-200 µl)	705908, 705910	Brand, Wertheim, Deutschland
Boydenkammer, 48 Well Micro Chemotaxis Chamber	AC48	Neuro Probe, Gaithersburg, USA
Silikonmatte für Boydenkammer		Neuro Probe, Gaithersburg, USA
Reagenzglasgestell, 30 mm, 9 Plätze, blau	212-0396	VWR, Radnor, USA
Scheren, chirurgisch		
Pinzetten, anatomisch		
Teigschaber, handelsüblich		WMF, Geislingen an der Steige, Deutschland
Klammern, handelsüblich		
Trichter, versch.		
Messbecher, versch.		
Magnetrührstäbchen-Set ROTILABO®	C267.1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Permanentmarker (blau, schwarz, grün, rot)		Faber-Castell, Stein, Deutschland

4.1.8. Geräte

Tabelle 10: Geräte

Produkt	Bestell-/Material-/Referenz-/Seriennummer	Hersteller/Lieferant
Zentrifuge Megafuge® 1.0R	75003060	Heraeus, Hanau, Deutschland
Inkubator HeraCell® VIOS 160i Kohlenstoffdioxid (CO ₂)	51030285	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kühlschrank 4 °C		Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland

Material und Methoden

Produkt	Bestell-/Material-/Referenz-/Seriennummer	Hersteller/Lieferant
Kryo-Stickstofftank Locator® 6	CS-XX1905YC-TS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kryo-Stickstofftank GT40		Air Liquide, Paris, Frankreich
Wasserbad 16 L	1103	GFL, Burgwedel, Deutschland
Gefrierschrank -80 °C		Nalge Nunc/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gefrierschrank -20 °C		Bosch, Gerlingen, Deutschland
Laborwerkbank HERAsafe® HS 12	NF X 44-201: Typ II, Kat. 2	Heraeus, Hanau, Deutschland/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
LUNA® Automated Cell Counter	L10001	Logos Biosystems, Südkorea/59650 Villeneuve-d'Ascq, Frankreich
Notebook Lenovo ThinkPad L560		Lenovo, Quarry Bay, Hongkong
Mikroskop Leica DM IL LED Fluo	435769	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop Carl Zeiss Axioskop 2 mit Rasterokular	802365	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
GloMax® Multi Detection System		Promega, Walldorf, Deutschland
Taschenrechner	Fx-115MS	CASIO Europe, Norderstedt, Deutschland
Thermolyne® Schüttler Maxi-Mix III	65800	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vortex Schüttler VF2		IKA, Staufen, Deutschland
UV-Lampe UVC30	50048696	Heraeus, Hanau, Deutschland
Trocken-/Brutschrank B6	50042301	Heraeus, Hanau, Deutschland
Autoklaviergerät DX-65	D4417	Systec, Linden, Deutschland
Timer	38.2010	TFA Dostmann, Wertheim, Deutschland
Eismaschine AF 100	DA252884	Scotsman, Milano, Italien
Analysenwaage Sartorius MC1 Analytic AC 120S	11001761	Sartorius, Göttingen, Deutschland

4.1.9. Software und Datenbanken

Tabelle 11: Software und Datenbanken

Produkt	URL	Hersteller/Lieferant
Microsoft® Office 365	https://www.office.com/	Microsoft, USA
ACD ChemSketch®	https://www.acdlabs.com/	Advanced Chemistry Development, Canada
Cancer Cell Line Encyclopedia, DepMap Portal	https://sites.broadinstitute.org/ccle/ https://depmap.org/portal/	Broad Institute of MIT & Harvard, USA
PubMed®	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/	National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information, USA
COSMIC, the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic	Wellcome Sanger Institute, Hinxton, UK

4.2. Zelllinien

4.2.1. Übersicht der Zelllinien

Tabelle 12: Übersicht der Zelllinien

Zelllinie	Subtyp	ER/PR	HER2	PIK3CA	PTEN
MCF-7	Luminal A	pos	neg	E545K	
T-47D	Luminal A/B	pos	neg	H1047R	
ZR-75-1	Luminal A	pos	neg	WT	L108R
MDA-MB-231	Basal-Like	neg	neg	WT	
BT-549	Basal-Like	neg	neg	WT	V275fs*1
BT-20	Basal-Like	neg	neg	P539R; H1047R	

4.2.2. MCF-7

Bei MCF-7 handelt es sich um epitheliale Zellen, welche ursprünglich aus metastatischem Gewebe (Pleura) einer 69-jährigen Patientin mit Adenokarzinom/invasivem Duktalkarzinom der Brustdrüse isoliert wurden. Nach neuer Klassifikation entspricht dies dem Subtyp NST (Non Special Type). Morphologisch erscheint MCF-7 unter dem Mikroskop am ehesten polygonal und kopfsteinpflasterartig (Abb. 6). MCF-7 ist positiv für ER und PR sowie HER2_{neg} (Dai et al., 2017; Jiang et al., 2016; Kao et al., 2009; Lacroix & Leclercq, 2004). Das Gen *PIK3CA* weist eine Missense-Mutation auf (E545K) (Hollestelle et al., 2007; Torbett et al., 2008). Für *PTEN* und *RAS* werden keine Mutationen beschrieben (Hollestelle et al., 2010; Torbett et al., 2008). Der molekulare Subtyp ist Luminal A (Dai et al., 2017; Jiang et al., 2016; Kao et al., 2009; Lacroix & Leclercq, 2004).

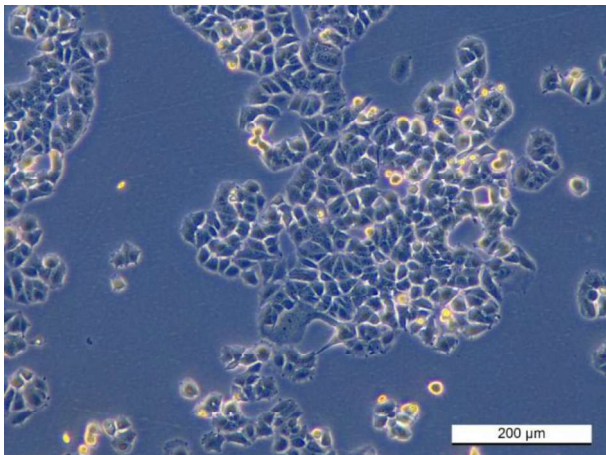


Abbildung 6: Mikroskopische Aufnahme von MCF-7. 10 x Vergrößerung. Eigene Aufnahme.

4.2.3. MDA-MB-231

Bei MDA-MB-231 handelt es sich um epitheliale Zellen, welche aus metastatischem Gewebe (Pleura) einer 51-jährigen Patientin mit Adenokarzinom der Brustdrüse isoliert wurden. Morphologisch erscheint MDA-MB-231 unter dem Mikroskop spindelförmig mit Zellausläufern. Die Zellverbände sind eher lose organisiert (Abb. 7). MDA-MB-231 ist negativ für ER, PR und

HER2 (TNBC) (Dai et al., 2017; Jiang et al., 2016; Kao et al., 2009; Lacroix & Leclercq, 2004). Das Gen *PIK3CA* liegt in der WT-Konfiguration vor (Hollestelle et al., 2007; Hollestelle et al., 2010; Torbett et al., 2008). Für *PTEN* wird keine Mutation beschrieben, für *RAS* ist eine Mutation bekannt (Hollestelle et al., 2007; Hollestelle et al., 2010; Torbett et al., 2008). Der molekulare Subtyp ist Basal-Like (Dai et al., 2017; Jiang et al., 2016; Kao et al., 2009; Lacroix & Leclercq, 2004).

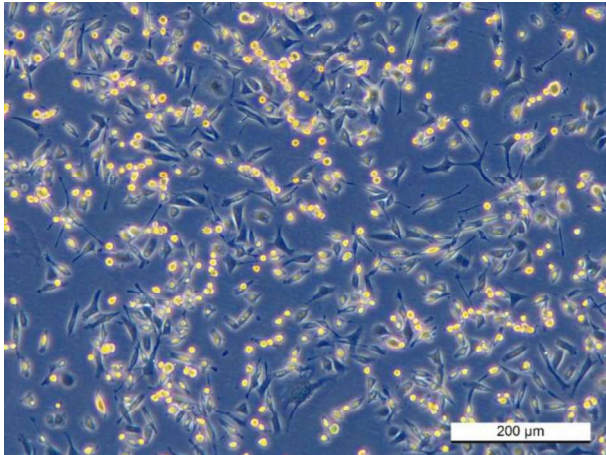


Abbildung 7: Mikroskopische Aufnahme von MDA-MB-231. 10 x Vergrößerung. Eigene Aufnahme.

4.2.4. T-47D

Bei T-47D handelt es sich um epitheliale Zellen, welche aus metastatischem Gewebe (Pleura) einer 54-jährigen Patientin mit invasivem Duktalkarzinom der Brustdrüse isoliert wurden. Nach neuer Klassifikation entspricht dies dem Subtyp NST. Morphologisch erscheint T-47D unter dem Mikroskop am ehesten polygonal und kopfsteinpflasterartig (Abb. 8). T-47D ist positiv für ER und PR sowie HER2_{neg} (Dai et al., 2017; Jiang et al., 2016; Kao et al., 2009; Lacroix & Leclercq, 2004). Das Gen *PIK3CA* weist eine Missense-Mutation auf (H1047R) (Bachman et al., 2004; Hollestelle et al., 2007; Torbett et al., 2008). Für *PTEN* und *RAS* werden keine Mutationen beschrieben (Hollestelle et al., 2010; Torbett et al., 2008). Der Subtyp ist je nach Literatur Luminal A/B (Dai et al., 2017; Jiang et al., 2016; Kao et al., 2009).

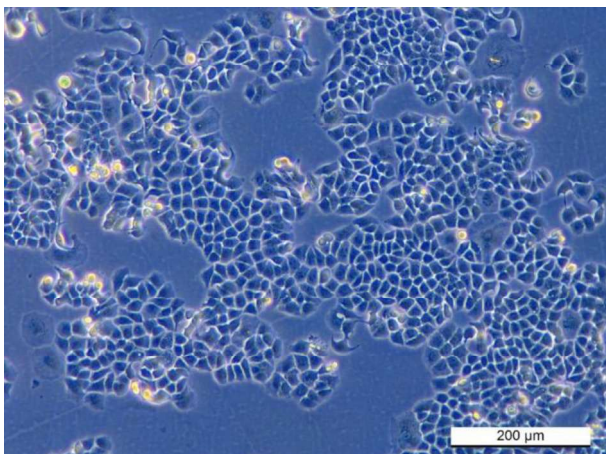


Abbildung 8: Mikroskopische Aufnahme von T-47D. 10 x Vergrößerung. Eigene Aufnahme.

4.2.5. BT-549

Bei BT-549 handelt es sich um epitheliale Zellen, welche aus dem Primärtumor einer 72-jährigen Patientin mit invasivem Duktalkarzinom der Brustdrüse isoliert wurden. Nach neuer Klassifikation entspricht dies dem Subtyp NST. Morphologisch erscheint BT-549 unter dem Mikroskop Fibrozyten-ähnlich mit Zellausläufern. Die Zellverbände sind eher lose organisiert (Abb. 9). BT-549 ist negativ für ER, PR und HER2 (TNBC) (Dai et al., 2017; Jiang et al., 2016; Kao et al., 2009; Lacroix & Leclercq, 2004). Das Gen *PIK3CA* liegt in der WT-Konfiguration vor (Hollestelle et al., 2007; Hollestelle et al., 2010; Torbett et al., 2008). Für *PTEN* ist eine Mutation mit Frameshift und Stopcodon bekannt (V275fs*1) (Hollestelle et al., 2010; Torbett et al., 2008; Weigelt et al., 2011). Das Protein wird laut Literatur nicht exprimiert (Weigelt et al., 2011). Für *RAS* wird keine Mutation beschrieben (Hollestelle et al., 2010; Torbett et al., 2008). Der molekulare Subtyp ist Basal-Like (Dai et al., 2017; Jiang et al., 2016; Kao et al., 2009; Lacroix & Leclercq, 2004).

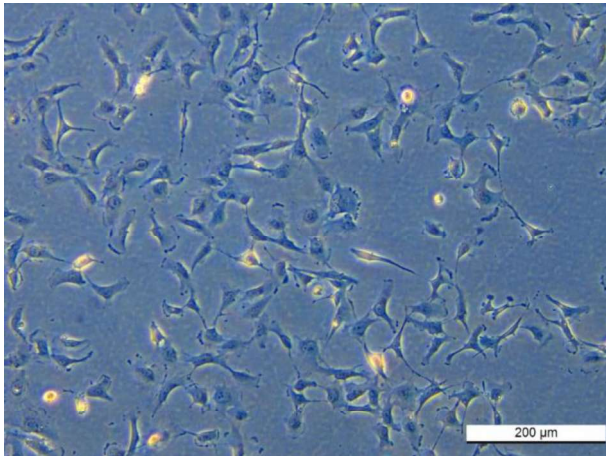


Abbildung 9: Mikroskopische Aufnahme von BT-549. 10 x Vergrößerung. Eigene Aufnahme.

4.2.6. BT-20

Bei BT-20 handelt es sich um epitheliale Zellen, welche aus dem Tumor einer 74-jährigen Patientin mit invasivem Duktalkarzinom der Brustdrüse isoliert wurden. Nach neuer Klassifikation entspricht dies dem Subtyp NST. Morphologisch erscheint BT-20 unter dem Mikroskop Fibrozyten-ähnlich mit Zellausläufern. Insgesamt ist das Zellbild lichtmikroskopisch sehr heterogen und diffus. Die Zellverbände sind eher lose organisiert (Abb. 10). BT-20 ist negativ für ER, PR und HER2 (TNBC) (Dai et al., 2017; Jiang et al., 2016; Kao et al., 2009; Lacroix & Leclercq, 2004). Das Gen *PIK3CA* wird mit dem Auftreten von zwei Missense-Mutationen beschrieben (P539R; H1047R) (Hollestelle et al., 2007; Saal et al., 2005; Torbett et al., 2008; Wu et al., 2005). Für *PTEN* und *RAS* werden keine Mutationen beschrieben (Hollestelle et al., 2010; Torbett et al., 2008). Das Gen/der Rezeptor *EGFR* ist amplifiziert (Hollestelle et al., 2010; Lacroix & Leclercq, 2004). Der molekulare Subtyp ist Basal-Like (Dai et al., 2017; Jiang et al., 2016; Kao et al., 2009; Lacroix & Leclercq, 2004).

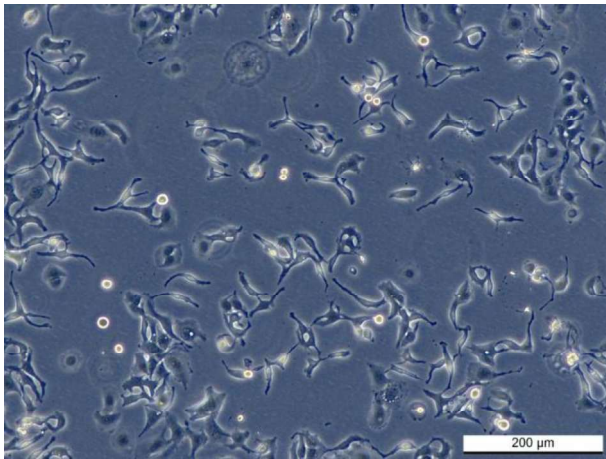


Abbildung 10: Mikroskopische Aufnahme von BT-20. 10 x Vergrößerung. Eigene Aufnahme.

4.2.7. ZR-75-1

Bei ZR-75-1 handelt es sich um epitheliale Zellen, welche aus dem Tumor einer 63-jährigen Patientin mit invasivem Duktalkarzinom der Brustdrüse isoliert wurden. Nach neuer Klassifikation entspricht dies dem Subtyp NST. Morphologisch erscheint ZR-75-1 unter dem Mikroskop am ehesten polygonal und kopfsteinpflasterartig (Abb. 11). Das Zellwachstum in der Kultur ist im Vergleich zu den anderen Zelllinien ausgesprochen langsam. ZR-75-1 ist positiv für ER, HER2_{neg} und für PR divergieren die Literaturangaben (Dai et al., 2017; Jiang et al., 2016; Kao et al., 2009; Lacroix & Leclercq, 2004). Das Gen *PIK3CA* liegt in der WT-Konfiguration vor (Bachman et al., 2004; Hollestelle et al., 2007; Hollestelle et al., 2010). Für *PTEN* besteht eine Mutation (L108R) (Hollestelle et al., 2010; Weigelt et al., 2011). Das Protein wird laut Literatur nur schwach exprimiert (Weigelt et al., 2011). Der molekulare Subtyp ist Luminal A (Dai et al., 2017; Jiang et al., 2016; Kao et al., 2009; Lacroix & Leclercq, 2004).

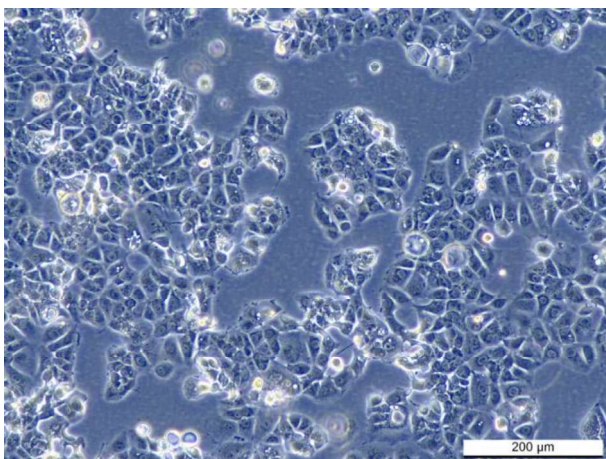


Abbildung 11: Mikroskopische Aufnahme von ZR-75-1. 10 x Vergrößerung. Eigene Aufnahme.

4.3. Methoden

4.3.1. Zellkultur

Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Inkubator (37 °C, 5 % CO₂), in welchem sich ausschließlich Tumorzellen befanden. Als Nährmedium wurde für alle Zelllinien RPMI 1640 gewählt, welches in der Literatur als geeignet beschrieben wird (Dai et al., 2017). Das Basismedium wurde zudem mit 10 % FCS und 1 % P/S versetzt. Bei einer ca. 75 %-igen Wachstumsdichte (Konfluenz) erfolgte das Splitten der Zellen. Trypsin diente zum Ablösen der wandadhärenten Zellen. Zur Weiterkultivierung wurden je nach beobachteter Wachstumsgeschwindigkeit der Zellpopulationen 5-20 % der Zellsuspension in neue Zellkulturflaschen passagiert.

Die Konservierung der Zellen geschah in vaporisiertem Stickstoff. Dafür wurden die Zellen nach Entfernen des Mediums mit DPBS gespült, durch 0,5 (1,0) ml Trypsin abgelöst und die Trypsinwirkung mit FCS-haltigem Medium nach ausreichender Einwirkzeit abgestoppt. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation (300 x G, 5 min, 24 °C). Der Mediumüberstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml Einfrierlösung (10 % DMSO in FCS-haltigem Medium) pro Kryo-Röhrchen suspendiert und in dieses überführt. In CoolCells® lagerten die Zellen bei -80 °C für 24 h, bevor sie in die Stickstofftanks eingelagert wurden.

Das Auftauen der Kryo-Röhrchen erfolgte für 1-2 min in einem 37 °C Wasserbad. Im Anschluss wurde die Zellsuspension in Polypropylen-Röhrchen mit 9 ml FCS-haltigem Medium überführt und dann abzentrifugiert (300 x G, 5 min, 24 °C). Nach Entfernen des Überstandes konnte das Zellpellet in FCS-haltigem Medium suspendiert und frei von Einfriermedium in Zellkulturflaschen überführt werden.

Die Zellzahl konnte mit dem Luna® Automated Cell Counter gezählt werden. Hierfür wurden die Luna® Cell Counting Slides mit 15 µl der Zellsuspension bestückt und eine Konzentration in Zellzahl/ml ermittelt.

4.3.2. Viabilität

Die Zellviabilität wurde mithilfe des alamarBlue® Cell Viability Reagent von Thermo Fisher Scientific gemessen. Der Assay basiert auf einer Redox-Reaktion des Farbstoffs Resazurin, welcher von vitalen Zellen aus der nicht-fluoreszierenden, blauen Form in fluoreszierendes, rotes Resorufin reduziert wird. Resorufin kann mit Wellenlängen von 530-560 nm angeregt und die Fluoreszenz bei 590 nm gemessen werden (Ahmed et al., 1994; Bonnier et al., 2015; Twigg, 1945; Vega-Avila & Pugsley, 2011).

Zur Bestimmung der Viabilität wurden pro Well einer 96-Well-Platte 3×10^3 Zellen in 100 µl FCS-haltigem Medium ausgesät (Tag 0). Nach mikroskopischer Kontrolle des Anwachsens am Folgetag schloss sich die Behandlung mit den Wirkstoffen/dem Kontrollmedium an (+24 h,

Tag 1). Nach drei Tagen (+72 h, Tag 4) wurde die Fluoreszenzmessung am Glomax® Multi Detection System durchgeführt. Im Anschluss erfolgte das Spülen der Wells mit 100 µl DPBS/Well und erneut die Behandlung. Nach drei weiteren Tagen (+72 h, Tag 7) wurden die Wirkstoffe/das Kontrollmedium entfernt, alle Wells mit 100 µl/Well DPBS gespült und ein letzter Mediumwechsel wurde vorgenommen. Am darauffolgenden Tag (+24 h, Tag 8) erfolgte eine zweite Messung am Glomax® Multi Detection System. Für die Fluoreszenzmessungen an den Messtagen vier und acht wurde alamarBlue® im Verhältnis 1:10 mit FCS-haltigem Medium verdünnt und 100 µl/Well dieser verdünnten Lösung hinzugegeben. Die Einwirkzeit betrug 4 h im Inkubator, wobei die Well-Platten aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Redox-Farbstoffs zusätzlich in Aluminiumfolie vor Licht geschützt waren. Dann folgte die Messung am Glomax® Multi Detection System. Es erfolgten jeweils drei unabhängige Versuche. Für die Auswertung der Daten diente Microsoft Excel®.

4.3.3. Proliferation

Die Zellproliferation wurde mithilfe des BrdU-Kits von Roche bestimmt. Der Assay basiert auf der Inkorporation des Basenanalogons BrdU und dessen Einbau in die Desoxyribonukleinsäure (DNA) proliferierender Zellen. Nach Inkubation werden die Zellen fixiert und die DNA denaturiert, um diese für einen anti-BrdU-AK mit gekoppelter Peroxidase (POD) zugänglich zu machen (anti-BrdU-POD). Im Anschluss kann durch Zugabe des Redoxindikators Tetramethylbenzidin (TMB) eine Oxidation von TMB durch die POD erfolgen. Mit H₂SO₄ wird die POD-Reaktion gestoppt. Die Farbintensität steht nach dem Farbumschlag in einem direkten proportionalen Verhältnis zur Menge der synthetisierten DNA und dadurch zur Zellproliferation. Die Farbintensität kann über die Absorption bei 450 nm (Referenzwellenlänge 690 nm) gemessen werden (Bally & Gribnau, 1989; Josephy et al., 1982; Roche Diagnostics GmbH, 2018).

Zur Bestimmung der Proliferation wurden pro Well einer 96-Well-Platte 3x10³ Zellen in 100 µl FCS-haltigem Medium ausgesät (Tag 0). Nach mikroskopischer Kontrolle des Anwachsens am Folgetag schloss sich die Behandlung mit den Wirkstoffen/dem Kontrollmedium an (+24 h, Tag 1). Nach drei Tagen (+72 h, Tag 4) wurden die Wirkstoffe/das Kontrollmedium entfernt, alle Wells mit 100 µl/Well DPBS gespült und die Behandlung erfolgte erneut. Nach drei weiteren Tagen (+72 h, Tag 7) wurden die Wirkstoffe/das Kontrollmedium entfernt, alle Wells mit 100 µl/Well DPBS gespült und ein letzter Mediumwechsel wurde vorgenommen. Am darauffolgenden Tag (+24 h, Tag 8) erfolgte die Messung am Glomax® Multi Detection System. Für die Absorptionsmessungen wurden 10 µl/Well BrdU-Arbeitslösung (Labeling-Solution® 1:100 verdünnt mit DPBS) dem bestehenden Medium in den Wells hinzugegeben und die Well-Platten im CO₂-Inkubator für 2 h inkubiert. Im Anschluss erfolgte das Entfernen der Lösung aus allen Wells und 200 µl/Well FixDenat® wurden pipettiert. Eine Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur schloss sich an. Nach Abziehen von FixDenat® konnten

100 µl/Well der anti-BrdU-POD Arbeitslösung (anti-BrdU-POD Stock-Solution® 1:100 verdünnt mit Antibody Dilution-Solution®) ergänzt werden und es folgte die Inkubation über 1 h bei Raumtemperatur. Die Wells wurden im Anschluss mit 200 µl/Well der Waschlösung dreifach gespült (Washing-Buffer® 1:10 verdünnt mit sterilem AD) und 100 µl/Well der Substratlösung (TMB) ergänzt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur (Well-Platten in Aluminiumfolie) wurde die Reaktion mit 25 µl/Well H₂SO₄ abgestoppt und die Well-Platten für 1 min bei 300 Umdrehungen pro min geschüttelt. Dann folgte die Messung am Glomax® Multi Detection System. Es erfolgten jeweils drei unabhängige Versuche. Für die Auswertung der Daten diente Microsoft Excel®.

4.3.4. Migration

Das Migrationsverhalten der Zellen wurde in der Boydenkammer bestimmt (Abb. 12). Getrennt durch eine Membran mit Poren der Größe 8 µm können die Zellen einerseits (oberer Kammerteil) und das Chemotaxin andererseits (unterer Kammerteil) aufgetragen werden. Eine Silikonmatte (mit Aussparungen in der Größe der Kammer-Wells) dichtet oberen und unteren Kammerteil ab.

Vor dem Experiment erhalten die Zellen je nach Zelllinie für eine bestimmte Dauer FCS-freies Medium und werden dadurch sensitiver, um in Richtung des jeweiligen Chemotaxins zu migrieren. Die Migrationsdauer im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) variiert in Abhängigkeit der Zelllinie. Migrierte Zellen adhären an der Unterseite der Membran und können nach der Migrationszeit an der Membran fixiert und gefärbt werden. Die Anzahl der gewanderten Zellen kann im Anschluss unter einem Lichtmikroskop mit Raster ausgezählt werden. Die unbehandelte Positivkontrolle (RPMI 1640 mit jeweiligem Chemotaxin) dient dabei als Referenz.

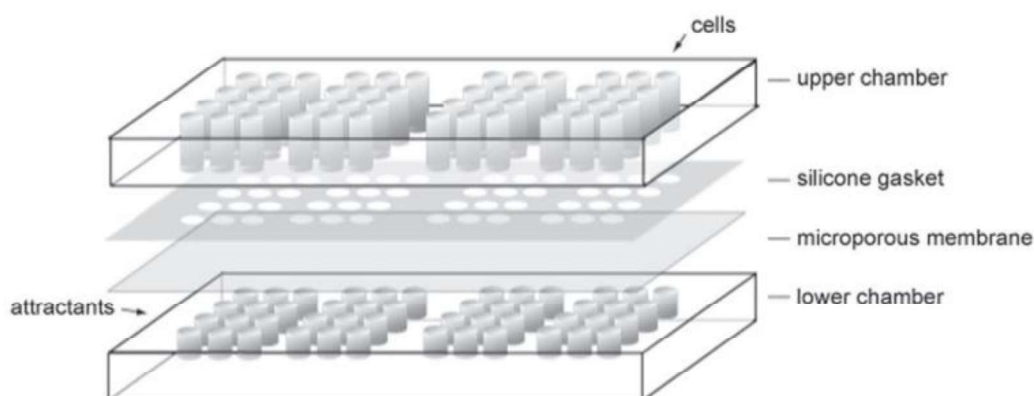


Abbildung 12: Schematischer Aufbau Boydenkammer. Quelle: Guan (2005).

Zur Bestimmung der Migration wurden für jede Versuchsbedingung Zellen in 25 cm² Zellkulturflaschen ausgesät (Tag 0, Tab. 13). Nach mikroskopischer Kontrolle des

Anwachsens am Folgetag schloss sich die Behandlung mit den Wirkstoffen/dem Kontrollmedium an (+24 h, Tag 1). Nach drei Tagen (+72 h, Tag 4) wurden die Wirkstoffe/das Kontrollmedium entfernt, alle Zellkulturflaschen mit DPBS gespült und die Behandlung erfolgte erneut. Im Gegensatz zur Bestimmung von Viabilität und Proliferation wurde bei MCF-7 und MDA-MB-231 nach drei weiteren Tagen (+72 h, Tag 7) kein Mediumwechsel vorgenommen. Stattdessen erfolgte am darauffolgenden Tag (+24 h, Tag 8), 2 h vor Start des eigentlichen Migrations-Assays, ein Umstellen auf FCS-freies Medium. Für BT-20 war das Vorgehen analog. Nach einer Einwirkzeit von 2 h startete der Migrations-Assay. Das FCS-freie Medium enthielt ebenfalls die jeweiligen Wirkstoffe/das Kontrollmedium.

ZR-75-1 hingegen erhielt FCS-freies Medium für 24 h (Tag 7) und damit im Gegensatz zu den übrigen Zelllinien bereits am Vortag des eigentlichen Starts des Assays. Das FCS-freie Medium enthielt ebenfalls die jeweiligen Wirkstoffe/das Kontrollmedium.

Tabelle 13: Ausgesäte Zellzahlen für Migrations-Assay. 25 cm² Zellkulturflaschen mit je 5 ml Volumen. VRL = Vinorelbin.

Zelllinie	Kontrolle	1,25 ng/ml VRL	100 ng/ml Alpelisib	1,25 ng/ml VRL + 100 ng/ml Alpelisib
MCF-7	100x10 ³	200x10 ³	300x10 ³	500x10 ³
MDA-MB-231	25x10 ³	100x10 ³	25x10 ³	100x10 ³
BT-20	200x10 ³	300x10 ³	300x10 ³	500x10 ³
ZR-75-1	100x10 ³	200x10 ³	150x10 ³	500x10 ³

Das FCS-freie Medium aus den Zellkulturflaschen wurde in 15 ml Polypropylen-Röhrchen überführt und später weiterverwendet. Die Zellen wurden mit 0,5 ml Trypsin je Zellkulturflasche abgelöst und die Trypsinwirkung nach einer Einwirkzeit von ca. 2 min mit FCS-haltigem Medium abgestoppt. Die Zellsuspensionen aus den Zellkulturflaschen wurden in 15 ml Polypropylen-Röhrchen pipettiert und das FCS-haltige Medium abzentrifugiert (300 x G, 5 min, 24 °C). Nach Absaugen der Überstände konnten die Zellpellets in dem aufgehobenen FCS-freien Medium suspendiert werden (100-500 µl/Zellpellet). Die jeweiligen Zellzahlen wurden im Anschluss mithilfe des Luna® Automated Cell Counters bestimmt.

Für die Boydenkammer waren pro Well 50 µl Zellsuspension erforderlich, sodass sich bei vier Wells pro Versuchsbedingung ein Bedarf von 200 µl ergab. Ein Reservevolumen von 50 µl wurde jeweils hinzugerechnet. Insgesamt ergab sich pro Versuchsbedingung ein Volumenbedarf von 250 µl Zellsuspension. Außerdem sollten 15.000 bzw. 30.000 Zellen/Well pipettiert werden. Auch hierfür wurde eine Reserve berücksichtigt, sodass 75.000 bzw. 150.000 Zellen pro 250 µl Zellsuspension (Versuchsbedingung) einzustellen waren. Auf Basis der Zellzählung im Luna® Automated Cell Counter wurden die Volumina der Zellsuspensionen durch Hinzugabe des jeweiligen FCS-freien Medium-Überstandes komplettiert (Tab. 14).

Die jeweiligen Chemotaxine wurden auf eine Zielkonzentration von 20 µg/ml mit FCS-freiem Medium eingestellt und auf Eis gelagert. Pro Well waren 29 µl Chemotaxinlösung erforderlich. Unter Berücksichtigung einer Reserve ergab sich pro Versuchsbedingung ein Chemotaxinbedarf von 150 µl, wobei die Negativkontrolle (RPMI 1640 ohne Chemotaxin) als einzige Versuchsbedingung kein Chemotaxin erhielt (Tab. 14).

Das Chemotaxin wurde mit 29 µl/Well in den unteren Kammerteil der Boydenkammer pipettiert. Die Membran wurde für 2-3 min in DPBS eingelegt und danach mit der glänzenden Seite nach unten auf den unteren Kammerteil aufgebracht. Es erfolgte das Auflegen der Silikonmatte und des oberen Kammerteils. Der Aufbau wurde mit Schrauben fixiert. In den oberen Kammerteil wurden nach intensiver Resuspension 50 µl Zellsuspension/Well pipettiert. Die Boydenkammer verblieb im Anschluss je nach Zelllinie für 16-20-48 h im Inkubator (Tab. 14).

Nach der Inkubation wurde der obere Kammerteil auf einem Papiertuch ausgeleert, Schrauben und Silikonmatte entfernt. Die Membran konnte im Anschluss an Klammern fixiert und ihre raue Seite durch den Puffer von Weise gezogen werden, um die nicht migrierten Zellen an einem Küchenschaber abzuziehen. Daraufhin musste die Membran mit der glänzenden Seite nach oben für 2-3 min trocknen. Danach konnten die Zellen an der glänzenden Membranseite für 1 min in 4 °C kaltem Ethanol fixiert werden. Die Färbung erfolgte mit den Hemacolor®-Lösungen von Merck, wobei die glänzende Seite der Membran dreifach durch die rote Lösung und sechsfach durch die blaue Lösung gezogen wurde. Überschüssige Farbe wurde durch den Puffer von Weise abgewaschen.

Die Membran wurde auf einen beschrifteten Objektträger aufgelegt und Immersionsöl darauf verteilt. Nach Aufsetzen des Deckglases konnten Luftblasen ausgestrichen und die Ränder mit Nagellack fixiert werden. Nach der Trocknung erfolgte die Zählung der Zellen unter dem Lichtmikroskop (400 x Vergrößerung). Es wurden zehn Raster pro Well, entsprechend 2,5 mm², ausgezählt und deren Summe gebildet. Aus den Summen der vier Wells pro Versuchsbedingung wurde ein Mittelwert gebildet. Die Zellzahl der unbehandelten Positivkontrolle diente als Referenz.

Neben einer Negativkontrolle (RPMI 1640 ohne Chemotaxin) und einer Positivkontrolle (RPMI 1640 mit Chemotaxin) wurden 1,25 ng/ml VRL, 100 ng/ml Alpelisib und die Kombination dieser beiden Agentien in den genannten Konzentrationen ausgewählt (Tab. 15). Es erfolgten Vorversuche zur Bestimmung geeigneter Migrationsbedingungen für jede verwendete Zelllinie, sofern nicht bereits bekannt (Tab. 14). Es wurden jeweils vier unabhängige Versuche durchgeführt. Für die Auswertung der Daten diente Microsoft Excel®.

Tabelle 14: Migrationsbedingungen der einzelnen Zelllinien. Inklusive Versuche bei ZR-75-1 zur Austestung eines geeigneten Chemotaxins.

Zelllinie	Chemotaxin	Konzentration Chemotaxin	Zeit in 0 % FCS	Zellen/Well	Migrationsdauer	Bewertung
MCF-7	Kollagen I ¹⁾	20 µg/ml	2 h vor Assay-Start	30.000	20 h	funktioniert
MDA-MB-231	Kollagen IV	20 µg/ml	2 h vor Assay-Start	15.000 ²⁾	16 h	funktioniert
BT-20	Kollagen IV ³⁾	20 µg/ml	2 h vor Assay-Start	30.000	16 h	funktioniert
ZR-75-1	Kollagen IV	20 µg/ml	24 h vor Assay-Start	30.000	48 h	funktioniert
ZR-75-1	Kollagen IV	20 µg/ml	24 h vor Assay-Start	30.000	30 h	funktioniert schlecht
ZR-75-1	Kollagen IV	20 µg/ml	16 h vor Assay-Start	30.000	24 h	funktioniert sehr schlecht
ZR-75-1	Kollagen I, Kollagen IV, Fibronectin, Laminin	50 µg/ml	2 h vor Assay-Start	30.000	24 h	funktioniert nicht
ZR-75-1	Kollagen I, Kollagen IV, Fibronectin, Laminin	20 µg/ml	2 h vor Assay-Start	30.000	24 h	funktioniert nicht
ZR-75-1	Kollagen I, Kollagen IV, Fibronectin, Laminin	20 µg/ml	2 h vor Assay-Start	30.000	16 h	funktioniert nicht

¹⁾ Nur das Kollagen I von der Firma Santa Cruz Biotechnology, Inc, human sc-136154, zeigte im Labor Wirkung.

²⁾ Aufgrund des hohen Migrationsbestrebens von MDA-MB-231 und hoher Zelldichte erfolgte eine Zellzahlreduktion.

³⁾ Neben Kollagen IV zeigte BT-20 auch für Kollagen I, bovines Fibronectin und Laminin ein Migrationsverhalten.

Tabelle 15: Schematische Versuchsanordnung in der Boydenkammer. Schraffiert = nicht verwendete Bereiche, O = Well, CT = Chemotaxin, VRL = Vinorelbin, Alpe = Alpelisib, Konzentrationen jeweils in ng/ml.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
				Kontrolle ohne CT	Kontrolle mit CT	1,25 ng/ml VRL	100 ng/ml Alpe	1,25 VRL + 100 Alpe				
A	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
B	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
C	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
D	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

4.3.5. Das Lösungsmittel DMSO

10 mg Apelisib wurden in 5 ml DMSO ($\geq 99,5\%$) gelöst und während des Projektverlaufs gefroren aufbewahrt. Die Konzentration der Stammlösung betrug 2 mg/ml. Zur Generierung von Aliquots wurden 10 μ l Stammlösung um 90 ml DMSO ergänzt, sodass sich eine Konzentration von 200 μ g/ml Apelisib ergab. Die 100 μ l-Aliquots lagerten ebenfalls gefroren in 0,5 ml Reagiergefäßen. Aus den Aliquots wurden die erforderlichen Endverdünnungen hergestellt. In der höchsten gewünschten Zielkonzentration von 1.000 ng/ml Apelisib in den Versuchen betrug die Konzentration von DMSO 0,5 %. Für die Viabilität von MCF-7, T-47D, MDA-MB-231 und BT-549 wurde der DMSO-Einfluss initial mit 0,5 % DMSO (\triangleq 1.000 ng/ml Apelisib) und einer gemittelten, geringeren Konzentration von 0,1 % DMSO nach sieben Behandlungstagen getestet. Für die Auswertung der Daten diente Microsoft Excel®. Für die im Projektverlauf ergänzten Zelllinien BT-20 und ZR-75-1 erfolgte die DMSO-Kontrolle an anderer Stelle im hiesigen Labor, sodass die dort verwendeten DMSO-Konzentrationen zur Lösung des Apelisibs übernommen wurden.

4.3.6. Statistische Auswertung

Für die Viabilität und die Proliferation wurden jeweils drei unabhängige Versuche mit Dreifachansätzen durchgeführt. Bei der Migration erfolgten vier unabhängige Versuche mit jeweils Vierfachansätzen. Die unbehandelten Kontrollen dienten dabei als 100 %-Referenz. Aus den Versuchsdurchgängen konnten arithmetische Mittelwerte gebildet und die Standardabweichungen (SD) berechnet werden. Ein zweiseitiger t-Test diente zur Überprüfung der statistischen Signifikanz (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$). Ausreißer wurden nach der 3s-Regel bewertet (Rechenberg, 1982). Alle Auswertungen erfolgten mithilfe von Microsoft Excel®.

4.3.7. Synergismus

Bereits 1926 beschrieben Loewe und Muischnek theoretische Grundlagen zu „paarweisen Kombinationen“ (Loewe & Muischnek, 1926) von Pharmaka und deren graphische Aufarbeitung in Form von Nomogrammen. Für die Konstellationen der Kombination von Wirkstoffen, welche sich gegenseitig ergänzen, resultiert eine Gerade zwischen zwei korrespondierenden Punkten von Abszisse und Ordinate (Loewe & Muischnek, 1926). Berenbaum (1977) griff das Konzept von Loewe und Muischnek (1926) auf. Grundlage für Berenbaum war die Annahme, dass Synergismus nicht lediglich durch den Vergleich der Einzeleffekte mit dem summierten stärkeren Effekt durch die Wirkstoffe in Kombination abgeleitet werden kann (Berenbaum, 1977). Vielmehr sind die Wirkstoffkonzentrationen in Kombination zu ermitteln, welche den gleichen Effekt erzielen, wie die Konzentrationen der Wirkstoffe bei jeweils alleiniger Anwendung (Berenbaum, 1977). Bei Additivität ergibt die Summe der Verhältnisse der Wirkstoffkonzentrationen zu den jeweiligen „äquivalenten Effektivdosen“ (Berenbaum, 1977) immer 1,0 (R.-Y. Huang et al., 2019). Bei Synergismus ist

die Summe der Verhältnisse der Wirkstoffkonzentrationen kleiner als 1,0. Dies ergibt sich daraus, dass bei der Kombination der Wirkstoffe zur Erreichung des gleichen Effekts geringere als die bei Additivität erwarteten Konzentrationen erforderlich sind (Berenbaum, 1977; R.-Y. Huang et al., 2019). Für den Begriff des Antagonismus ist die Erklärung entsprechend entgegengesetzt.

Graphisch können Additivität, Synergismus und Antagonismus in einem Koordinatensystem dargestellt werden. Die Additionsisobole ist eine Gerade, welche Ordinate und Abszisse miteinander verbindet. Alle Punkte auf der Geraden stellen additive Mischungen der Wirkstoffe dar, das rechnerische Korrelat hierzu ist die im Verhältnis resultierende 1,0 (Berenbaum, 1977, 1978; R.-Y. Huang et al., 2019). Die synergistische Isobole liegt „nullpunktwärts von der Additionsisobolen“ (Loewe & Muischnek, 1926) und hat eine konkave Erscheinung (Berenbaum, 1977; R.-Y. Huang et al., 2019). Die antagonistische Isobole befindet sich oberhalb der Additionsisobolen, ihre Form ist konvex (Berenbaum, 1977, 1978; R.-Y. Huang et al., 2019). Je mehr Kombinationen aufgetragen werden, desto sicherer sind die sich ergebenden Isobolen (Berenbaum, 1977). Ist der Synergismus/Antagonismus perfekt ausgeprägt, ergibt sich eine ideale Isobole mit entsprechender Beugung unterhalb (synergistisch) oder oberhalb (antagonistisch) der Additionsisobolen. Allerdings kann das Wesen der Reaktion auch bei nicht idealem Verlauf der Isobolen zumeist erkannt werden (Berenbaum, 1978). Das Konzept des CI geht auf Chou und Talalay (1983, 1984) zurück. Die Isobolenmethode hat den Nachteil, dass für die graphische Erstellung echter Isobolen sehr viele Messungen erforderlich sind und aufgrund der beschränkten Dimensionen im Raum nur wenige Wirkstoffkombinationen gleichzeitig dargestellt werden können (Chou & Talalay, 1983, 1984). Isobolenmethode und CI beleuchten prinzipiell jedoch denselben Sachverhalt aus verschiedenen Perspektiven (Chou, 2006). Die Methode des CI kann als allgemeingültiges Verfahren aufgefasst werden und funktioniert auch bei mehr als zwei Wirkstoffkombinationen (Chou & Talalay, 1984). Die Formel nach Chou und Talalay (1983) lautet:

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2}$$

Abbildung 13: Formel zur Berechnung des Combination Index (CI). $(D)_1$ und $(D)_2$ = erforderliche Konzentrationen der Wirkstoffe in Kombination, um definierten Effekt zu erzielen. $(D_x)_1$ und $(D_x)_2$ = erforderliche Konzentrationen der einzelnen Wirkstoffe für sich betrachtet, um definierten Effekt zu erzielen.

Auf Basis der in der Arbeit experimentell ermittelten Dosis-Wirkungs-Kurven wurden die IC_{50} bzw. IC_{80} durch Interpolation berechnet und als Grundlage für die weitere Betrachtung etwaiger synergistischer Effekte nach der CI-Methode herangezogen. Je nach experimentell beobachteter Stärke des Effekts (Abnahme Viabilität/Proliferation) wurde zu Rechenzwecken

entweder auf die IC_{50} und/oder IC_{80} zurückgegriffen. Konkret wurden zur Auflösung der Formel (Abb. 13) die Konzentrationen von VRL und Alpelisib benötigt, welche bei jeweils alleiniger Gabe erforderlich waren, um die IC_{50} bzw. IC_{80} zu erreichen $[(D_x)_1, (D_x)_2]$. Aus den Dosis-Wirkungs-Kurven von VRL ohne Alpelisib (0,63-5 ng/ml) und Alpelisib ohne VRL (10-1.000 ng/ml) konnten IC_{50}/IC_{80} durch Interpolation abgeleitet werden (Nenner der Gleichung). Außerdem waren die Konzentrationen von VRL und Alpelisib zu ermitteln, welche den gleichen Effekt (IC_{50}/IC_{80}) in Kombination erzielten $[(D)_1, (D)_2]$. Hierfür wurde zunächst eine plausibel erscheinende, definierte Alpelisib-Konzentration auf Basis der Versuchsergebnisse ausgewählt (z. B. Alpelisib 100 ng/ml). Folglich war die erforderliche VRL-Konzentration zur Erreichung der IC_{50} bzw. IC_{80} in Kombination mit Alpelisib (z. B. 100 ng/ml) die letzte unbekannt Variable der CI-Formel. Für die kombinierte Anwendung mit der definierten Alpelisib-Konzentration (z. B. 100 ng/ml) als Basis und den verschiedenen, korrespondierenden VRL-Konzentrationen (0,63-5 ng/ml) wurden ebenfalls Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt. Die erforderliche VRL-Konzentration zur Erreichung der IC_{50} bzw. IC_{80} bei gegebener Alpelisib-Konzentration (z. B. 100 ng/ml) konnte im Anschluss berechnet werden. Dadurch wurde der Zähler der Gleichung bedient und der sich ergebende CI berechnet. Es gibt keine pauschale Definition, ab wann ein (relevanter) synergistischer Effekt tatsächlich vorliegt (Chou, 2006). Vielmehr sind neben den Versuchsbedingungen auch klinisch-inhaltliche Überlegungen anzustellen (Chou, 2006). Nach Chou (2006) können folgende Werte der Orientierung dienen: Synergismus: $< 0,90$; Additivität: $0,90-1,10$; Antagonismus: $> 1,10$. Die graphische Darstellung in der vorliegenden Arbeit erfolgte durch Bildung der Additionsgeraden für die IC_{50} bzw. IC_{80} und im Anschluss die Auftragung der mit den CI-Werten korrespondierenden Datenpunkte (definierte Alpelisib-Konzentration, berechnete VRL-Konzentration) im Koordinatensystem. Abb. 14 zeigt dies schematisch. Alle Berechnungen und die Erstellung der Grafiken erfolgten in Microsoft Excel®.

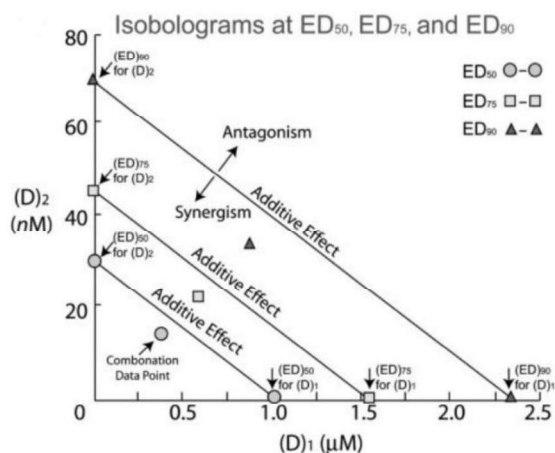


Abbildung 14: Schema der Additionsisobolen mit Combination Index (CI). Dargestellt sind drei Additionsisobolen für die Effektivdosen ED_{50} , ED_{75} und ED_{90} der Wirkstoffe $(D)_1$ und $(D)_2$. Konzentrationsangaben exemplarisch in μM und nM . Zugehörige Datenpunkte symbolisieren die CI oberhalb oder unterhalb der Geraden und beschreiben Synergismus bzw. Antagonismus. Quelle: Chou (2006).

5. Ergebnisse

5.1. Viabilität

Zu Beginn des Projektes wurden die Zelllinien MCF-7, T-47D, MDA-MB-231 und BT-549 ausgewählt, sodass die Viabilität dieser Zelllinien nach drei und sieben Tagen Behandlungsdauer bestimmt wurde. Zudem erfolgte eine Überprüfung des DMSO-Einflusses auf die Viabilität. Für die im Projektverlauf ergänzten Zelllinien BT-20 und ZR-75-1 erfolgte die DMSO-Kontrolle an anderer Stelle im Labor, sodass die dort getesteten DMSO-Konzentrationen zur Lösung des Alpelisibs übernommen wurden.

5.1.1. DMSO

Für MCF-7 betrug die Viabilität unter 0,1 % DMSO 106,5 % (SD 1,6 %, $p=0,0209$) und unter 0,5 % DMSO 101,6 % (SD 8,4 %, $p=0,7684$) (Abb. 15). 0,1 % DMSO reduzierte die Viabilität von T-47D auf 94,3 % (SD 15,6 %, $p=0,6570$) und für 0,5 % DMSO resultierte ein Mittelwert von 85,4 % (SD 16,8 %, $p=0,2943$). Unter 0,1 % DMSO zeigte sich bei MDA-MB-231 eine Viabilität von 112,8 % (SD 18,8 %, $p=0,3625$) und für 0,5 % DMSO resultierte eine Viabilität von 108,5 % (SD 14,5 %, $p=0,4197$). BT-549 zeigte das größte Viabilitäts-Delta zwischen den untersuchten DMSO-Behandlungen: Bei der geringeren DMSO-Konzentration von 0,1 % zeigte sich dort eine Viabilität von 94,1 % (SD 17,3 %, $p=0,6637$), unter 0,5 % DMSO lag diese bei 75,3 % (SD 30 %, $p=0,3189$) (Abb. 15).

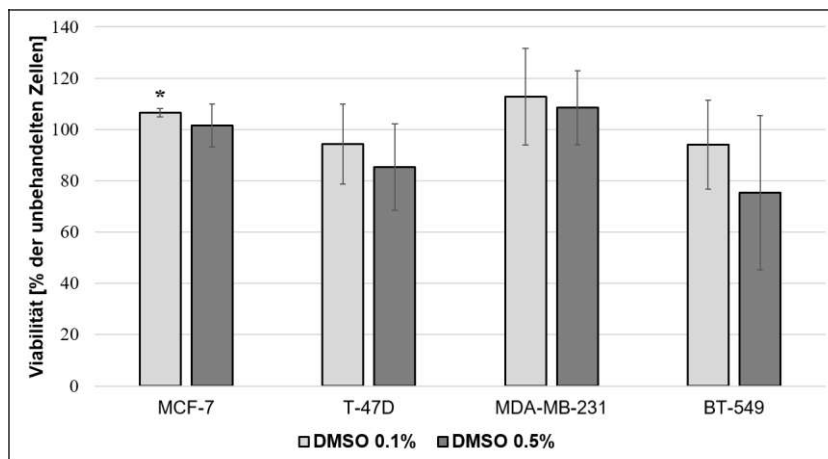


Abbildung 15: Einfluss von DMSO auf die Viabilität. MCF-7, T-47D, MDA-MB-231 und BT-549 nach sieben Behandlungstagen. In Relation zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle. 0,5 % DMSO $\hat{=}$ 1.000 ng/ml Alpelisib. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen. $n=3$. Statistische Signifikanz: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

5.1.2. Vinorelbin plus Alpelisib

Metronomisch dosiertes VRL in Kombination mit Alpelisib reduzierte die Viabilität von MCF-7. Zudem verstärkte sich dieser Effekt nach sieben Behandlungstagen im Vergleich zur Auswertung nach drei Tagen (Abb. 16a-b). Die stärkste Abnahme der Viabilität auf 13,5 % war bei den höchsten Konzentrationen (5 ng/ml VRL plus 1.000 ng/ml Alpelisib) nach sieben

Tagen zu beobachten (SD 4,5 %, $p=0,0009$) (Abb. 16a-b). Bei gleichen Konzentrationen von VRL und Alpelisib betrug die Viabilität nach drei Tagen 26,8 % (SD 5,2 %, $p=0,0017$) (Abb. 16a-b). VRL in Kombination mit Alpelisib zeigte auch in geringeren Konzentrationen einen Einfluss auf die Viabilität von MCF-7. 0,63 ng/ml VRL plus 10 ng/ml Alpelisib senkten die Viabilität nach drei Tagen auf 66,5 % (SD 3,9 %, $p=0,0046$) (Abb. 16a-b). Nach sieben Tagen vermochten VRL und Alpelisib in den gleichen Konzentrationen die Viabilität auf 86,6 % (SD 15,2 %, $p=0,2470$) zu reduzieren (Abb. 16a-b). Von 1,25 ng/ml VRL plus 10 ng/ml Alpelisib bis hin zu 2,5 ng/ml VRL plus 100 ng/ml Alpelisib nahm die Viabilität nach drei Tagen von maximal 53,1 % (SD 3,7 %, $p=0,0021$) bis minimal 33,0 % (SD 2,9 %, $p=0,0006$) relativ stetig ab (Abb. 16a-b). Nahmen die Konzentrationen von VRL und Alpelisib weiter zu, waren nach drei Tagen nur noch geringe weitere Effekte auf MCF-7 zu beobachten (Abb. 16a-b). Nach sieben Tagen betrug die Viabilität bei 1,25 ng/ml VRL plus 10 ng/ml Alpelisib 57,5 % (SD 16,3 %, $p=0,0474$) und war damit etwas höher als nach drei Tagen (Abb. 16a-b). 2,5 ng/ml VRL plus 10 ng/ml Alpelisib reduzierten die Viabilität nach sieben Tagen auf 19,1 % (SD 6,6 %, $p=0,0023$) (Abb. 16a-b). Von 1,25 ng/ml VRL plus 100 ng/ml Alpelisib bis hin zu 2,5 ng/ml VRL plus 100 ng/ml Alpelisib nahm die Viabilität von 33,5 % (SD 6,9 %, $p=0,0036$) bis auf 16,8 % (SD 3,0 %, $p=0,0004$) nach sieben Tagen ab (Abb. 16a-b). Nahmen die Konzentrationen von VRL und Alpelisib weiter zu, waren nach sieben Tagen nur noch geringe weitere Effekte auf MCF-7 zu beobachten (Abb. 16a-b).

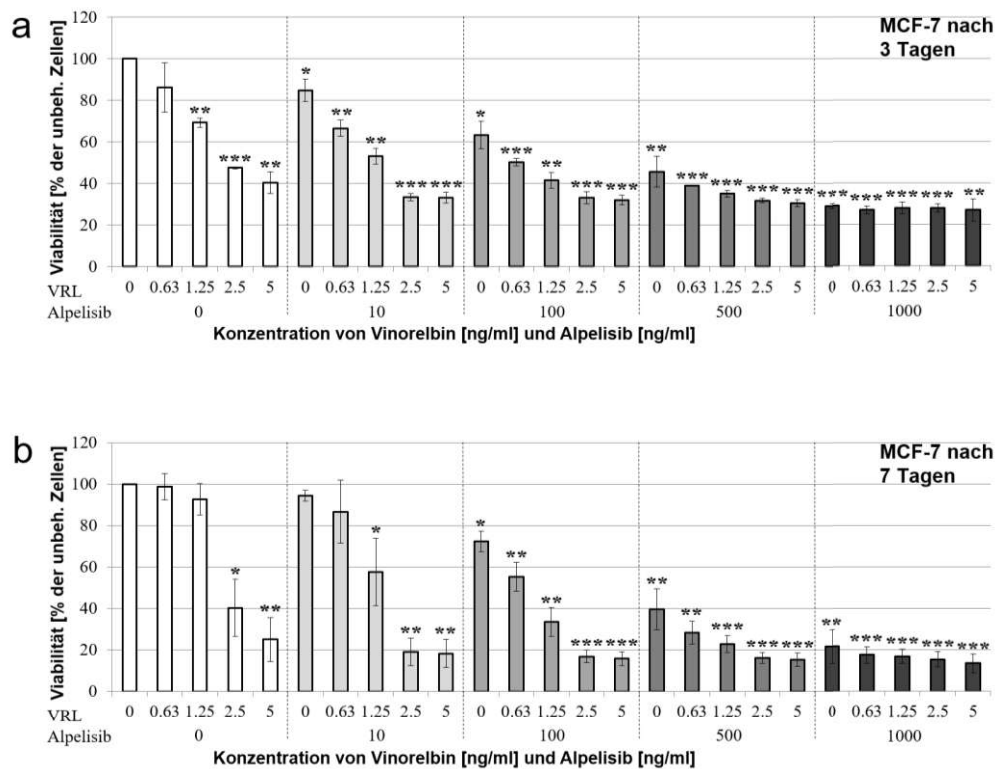


Abbildung 16: Einfluss von Vinorelbin (VRL) + Alpelisib auf die Viabilität von MCF-7. a) nach drei Tagen, b) nach sieben Tagen. In Relation zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen. $n=3$. Statistische Signifikanz: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

Metronomisch dosiertes VRL in Kombination mit Alpelisib reduzierte die Viabilität von T-47D. Zudem verstärkte sich dieser Effekt nach sieben Behandlungstagen im Vergleich zur Auswertung nach drei Tagen (Abb. 17a-b). Die stärkste Abnahme der Viabilität auf 10,6 % war bei den höchsten Konzentrationen (5 ng/ml VRL plus 1.000 ng/ml Alpelisib) nach sieben Tagen zu beobachten (SD 1,2 %, $p=0,0001$) (Abb. 17a-b). Bei gleichen Konzentrationen von VRL und Alpelisib betrug die Viabilität nach drei Tagen 36,8 % (SD 1,7 %, $p=0,0003$) (Abb. 17a-b). Auch geringere Konzentrationen von VRL in Kombination mit Alpelisib zeigten einen Einfluss auf die Viabilität von T-47D. 0,63 ng/ml VRL plus 10 ng/ml Alpelisib senkten die Viabilität nach drei Tagen auf 77,2 % (SD 5,1 %, $p=0,0156$) (Abb. 17a-b). Nach sieben Tagen vermochten VRL und Alpelisib in den gleichen Konzentrationen die Viabilität auf 63,3 % (SD 8,8 %, $p=0,0188$) zu reduzieren (Abb. 17a-b). Von 1,25 ng/ml VRL plus 10 ng/ml Alpelisib bis hin zu 2,5 ng/ml VRL plus 100 ng/ml Alpelisib nahm die Viabilität nach drei Tagen von maximal 70,8 % (SD 9,6 %, $p=0,0312$) bis minimal 48,0 % (SD 1,9 %, $p=0,0005$) relativ stetig ab (Abb. 17a-b). Nahmen die Konzentrationen von VRL und Alpelisib weiter zu, waren nach drei Tagen nur noch geringe weitere Effekte auf T-47D zu beobachten (Abb. 17a-b). Nach sieben Tagen betrug die Viabilität bei 1,25 ng/ml VRL plus 10 ng/ml Alpelisib 52,4 % (SD 10,2 %, $p=0,0148$) (Abb. 17a-b). 2,5 ng/ml VRL plus 10 ng/ml Alpelisib reduzierten die Viabilität nach sieben Tagen auf 32,0 % (SD 12,7 %, $p=0,0113$) (Abb. 17a-b). Von 1,25 ng/ml VRL plus 100 ng/ml Alpelisib bis hin zu 2,5 ng/ml VRL plus 100 ng/ml Alpelisib nahm die Viabilität von 23,4 % (SD 0,2 %, $p=0,0001$) bis auf 18,1 % (SD 2,3 %, $p=0,0003$) nach sieben Tagen ab (Abb. 17a-b). Nahmen die Konzentrationen von VRL und Alpelisib weiter zu, waren nach sieben Tagen nur noch geringe weitere Effekte auf T-47D zu beobachten (Abb. 17a-b).

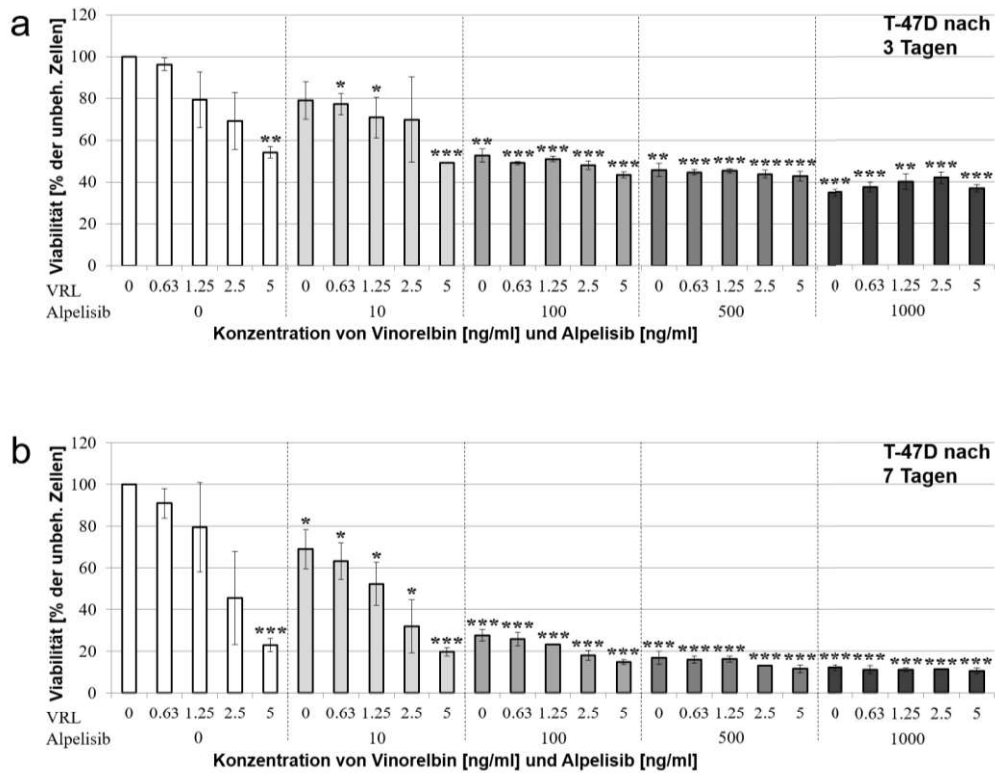


Abbildung 17: Einfluss von Vinorelbin (VRL) + Alpelisib auf die Viabilität von T-47D. a) nach drei Tagen, b) nach sieben Tagen. In Relation zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen. $n=3$. Statistische Signifikanz: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

Metronomisch dosiertes VRL in Kombination mit Alpelisib reduzierte die Viabilität von MDA-MB-231 bei steigenden Konzentrationen und nach sieben Tagen stärker als nach drei Tagen Behandlungsdauer (Abb. 18a-b). In Kombination beider Wirkstoffe wurden ähnliche Reduktionen der Viabilität beobachtet wie bei VRL-Monobehandlung. Die geringste Viabilität mit 19,7 % war unter 5 ng/ml VRL plus 1.000 ng/ml Alpelisib nach sieben Tagen festzustellen (SD 3,4 %, $p=0,0006$) (Abb. 18a-b). Bei 5 ng/ml VRL allein betrug die Viabilität nach sieben Tagen 25,0 % (SD 2,3 %, $p=0,0003$) und lag damit leicht oberhalb der kombinierten Gabe mit Alpelisib in der höchsten Konzentration von 1.000 ng/ml (Abb. 18a-b). Lediglich Alpelisib in der höchsten Konzentration von 1.000 ng/ml zeigte sowohl nach drei Tagen (67,8 %, SD 3,2 %, $p=0,0032$) als auch nach sieben Tagen (77,2 %, SD 3,5 %, $p=0,0079$) einen Effekt bzgl. der Abnahme der Viabilität von MDA-MB-231. Es ist zu erkennen, dass die Viabilität nach sieben Tagen im Vergleich zum Messzeitpunkt nach drei Tagen bei Alpelisib in Konzentrationen zwischen 10-100 ng/ml als Monogabe leicht zunahm (Abb. 18a-b). 0,63 ng/ml VRL allein senkte die Viabilität von MDA-MB-231 nach drei Tagen auf 74,7 % (SD 16,1 %, $p=0,0946$). Mit leicht zunehmender Tendenz reduzierten 1,25 ng/ml und 2,5 ng/ml VRL jeweils in Monogabe die Viabilität nach drei Tagen weiter (65,1 %, SD 12,1 %, $p=0,0338$; 56,2 %, SD 6,5 %, $p=0,0069$) (Abb. 18a-b). Nach sieben Tagen zeigte sich für VRL allein ein ähnliches Muster im Konzentrationsbereich von 0,63 ng/ml bis 2,5 ng/ml, jedoch konzentrationsabhängig stärker ausdifferenziert als dies nach drei Tagen der Fall war (Abb. 18a-b).

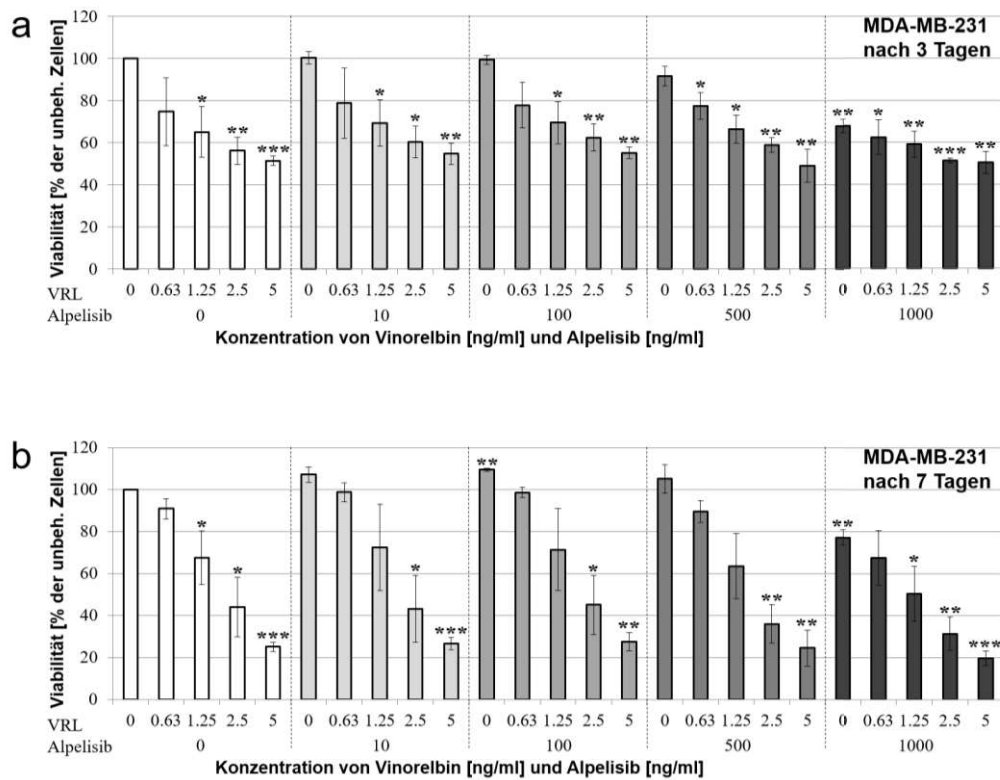


Abbildung 18: Einfluss von Vinorelbine (VRL) + Alpelisib auf die Viabilität von MDA-MB-231. a) nach drei Tagen, b) nach sieben Tagen. In Relation zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen. n=3. Statistische Signifikanz: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Metronomisch dosiertes VRL in Kombination mit Alpelisib reduzierte die Viabilität von BT-549 bei steigenden Konzentrationen und nach sieben Tagen stärker als nach drei Tagen Behandlungsdauer (Abb. 19a-b). In Kombination beider Wirkstoffe wurden ähnliche Reduktionen der Viabilität beobachtet wie bei VRL-Monobehandlung. Die geringste Viabilität mit 14,5 % war unter 5 ng/ml VRL plus 1.000 ng/ml Alpelisib nach sieben Tagen festzustellen (SD 6,2 %, p=0,0018) (Abb. 19a-b). Bei 5 ng/ml VRL allein betrug die Viabilität nach sieben Tagen 21,3 % (SD 11,1 %, p=0,0068) und lag damit leicht oberhalb der kombinierten Gabe mit Alpelisib in der höchsten Konzentration von 1.000 ng/ml (Abb. 19a-b). Lediglich Alpelisib in der höchsten Konzentration von 1.000 ng/ml zeigte sowohl nach drei Tagen (71,7 %, SD 8,7 %, p=0,0295) als auch nach sieben Tagen (72,6 %, SD 11,7 %, p=0,0511) einen Effekt bzgl. der Abnahme der Viabilität von BT-549. Nach sieben Tagen war eine Reduktion der Viabilität bei 500 ng/ml Alpelisib auf 83,2 % erkennbar (SD 26,2 %, p=0,3358) (Abb. 19a-b). 0,63 ng/ml VRL allein senkte die Viabilität von BT-549 nach drei Tagen auf 72,1 % ab (SD 16,7 %, p=0,0870). Mit leicht zunehmender Tendenz reduzierten 1,25 ng/ml und 2,5 ng/ml VRL in Monogabe die Viabilität nach drei Tagen weiter (59,2 %, SD 27,5 %, p=0,1054; 44,5 %, SD 21,2 %, p=0,0411) (Abb. 19a-b). Nach sieben Tagen zeigte sich für VRL allein ein ähnliches Bild im Konzentrationsbereich von 0,63 ng/ml bis 2,5 ng/ml, jedoch

konzentrationsabhängig stärker ausdifferenziert als dies nach drei Tagen der Fall war (Abb. 19a-b).

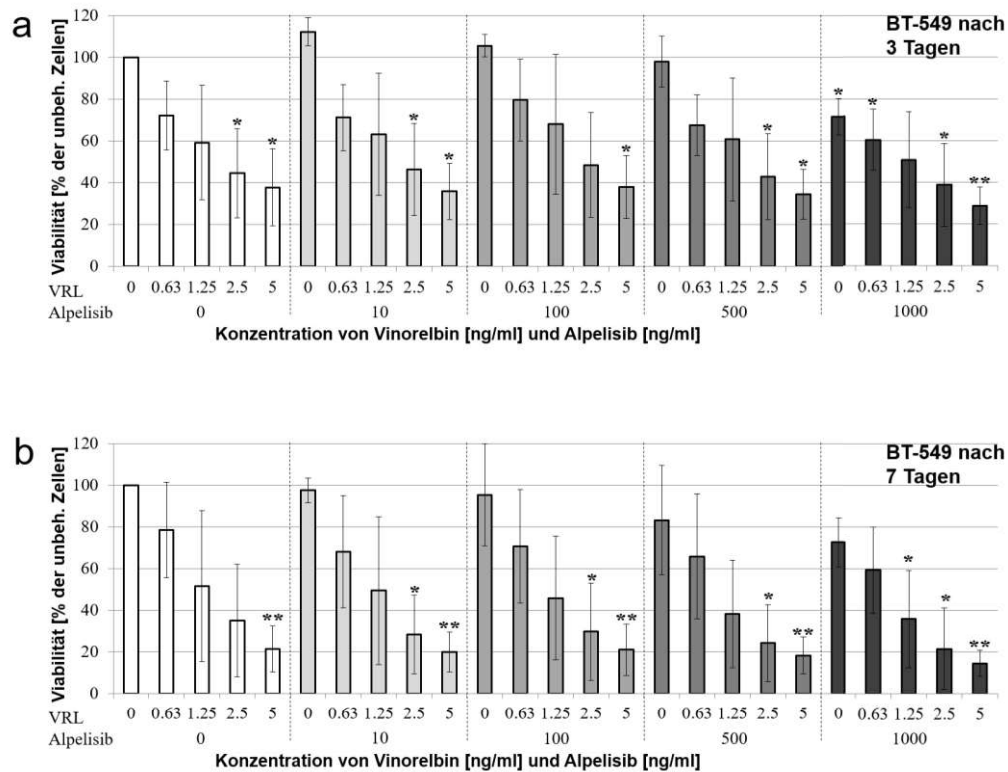


Abbildung 19: Einfluss von Vinorelbin (VRL) + Alpelisib auf die Viabilität von BT-549. a) nach drei Tagen, b) nach sieben Tagen. In Relation zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen. $n=3$. Statistische Signifikanz: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

5.1.3. Synergistische Effekte

Zur Betrachtung etwaiger synergistischer Effekte von MCF-7 und T-47D, welche jeweils eine *PIK3CA*-Mutation aufweisen, erfolgte zunächst die Auftragung der Messergebnisse für die Viabilität von VRL und Alpelisib jeweils in Monogabe nach drei und sieben Tagen (Abb. 20a-d). Die Dosis-Wirkungs-Kurven zeigen, dass die *PIK3CA*-mutierten Zelllinien MCF-7 und T-47D auf Alpelisib ansprechen, im Gegensatz zu den *PIK3CA*-WT Zelllinien MDA-MB-231 und BT-549 (Abb. 20a-d).

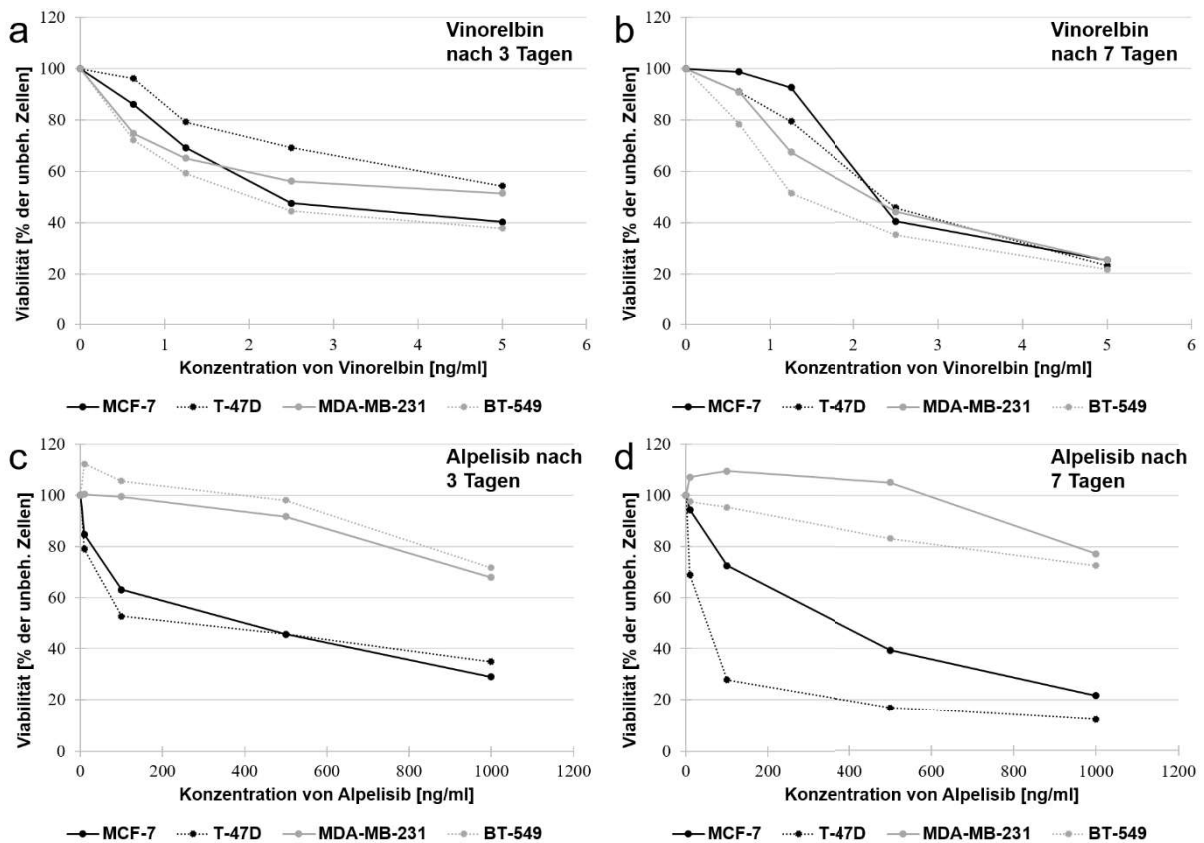


Abbildung 20: Dosis-Wirkungs-Kurven von Vinorelbin (VRL) und Alpelisib für die Viabilität der Zelllinien MCF-7, T-47D, MDA-MB-231 und BT-549. a) VRL nach drei Tagen, b) VRL nach sieben Tagen, c) Alpelisib nach drei Tagen, d) Alpelisib nach sieben Tagen. In Relation zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte ohne Standardabweichungen. $n=3$.

Zunächst wurden mithilfe der Dosis-Wirkungs-Kurven die IC_{50} und IC_{80} für VRL und Alpelisib (jeweils in Monogabe) von MCF-7 und T-47D berechnet. Für MCF-7 wurde bei Kombination beider Wirkstoffe eine Basis von 100 ng/ml Alpelisib zugrunde gelegt. Um unter 100 ng/ml Alpelisib eine Hemmung der Viabilität von MCF-7 um 50 % zu erreichen (IC_{50}), wurden nach drei Tagen rechnerisch 0,59 ng/ml VRL benötigt (Abb. 21a). Um die Viabilität auf 20 % zu reduzieren (IC_{80}), waren nach drei Tagen rechnerisch 7,8 ng/ml VRL erforderlich (Abb. 21a). Die Berechnung der CI-Werte ergab 0,372 (IC_{50}) und 1,018 (IC_{80}). Gemäß der CI-Methode ist damit theoretisch von einem synergistischen Wirken für die geringere Effektstärke (IC_{50}) auszugehen und ein additives Verhalten bei höherer Effektstärke (IC_{80}) abzuleiten. Nach sieben Tagen waren für MCF-7 bei gegebenen 100 ng/ml Alpelisib rechnerisch 0,48 ng/ml VRL zur Erreichung der IC_{50} notwendig (Abb. 21b). Um die Viabilität auf 20 % zu senken (IC_{80}), waren rechnerisch 3,43 ng/ml VRL erforderlich (Abb. 21b). Die Berechnung ergab für beide CI-Werte einen Synergismus mit 0,351 (IC_{50}) und 0,685 (IC_{80}).

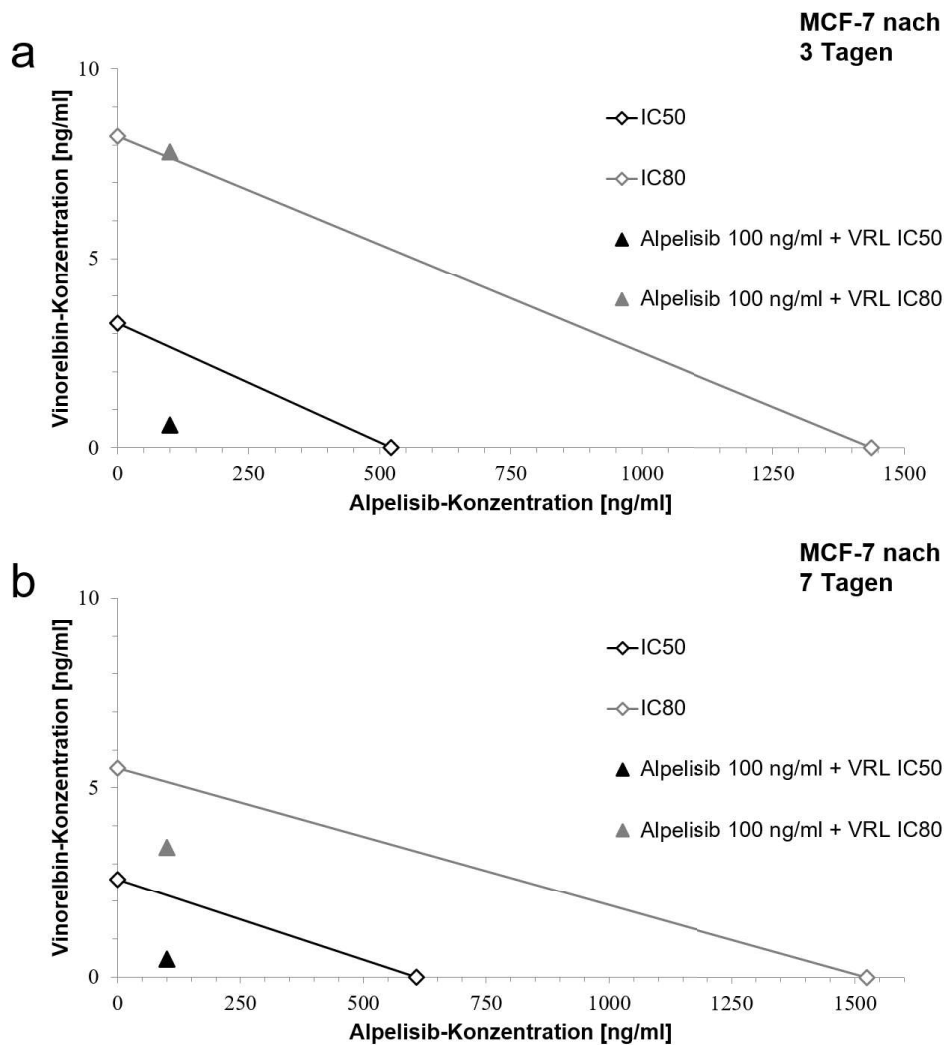


Abbildung 21: Isobologramm und Combination Index (CI) für die Viabilität von MCF-7. a) nach drei Tagen, b) nach sieben Tagen. Inhibitorische Konzentrationen IC_{50} und IC_{80} durch Interpolation aus den Dosis-Wirkungs-Kurven von Vinorelbin (VRL) und Alpelisib berechnet. IC_{50} und IC_{80} als Additionsgeraden dargestellt. CI-Werte gemäß Formel (Abb. 13) berechnet und korrespondierende Datenpunkte in Relation zu den Additionsgeraden dargestellt.

Für T-47D wurde bei Kombination beider Wirkstoffe eine Basis von 10 ng/ml Alpelisib zugrunde gelegt, um eine Interpretierbarkeit der Daten nach der CI-Methode zu gewährleisten. Um unter 10 ng/ml Alpelisib eine Hemmung der Viabilität von T-47D um 50 % zu erreichen (IC_{50}), wurden nach drei Tagen rechnerisch 5,23 ng/ml VRL benötigt (Abb. 22a). Um die Viabilität auf 20 % zu reduzieren (IC_{80}), waren nach drei Tagen rechnerisch 15,08 ng/ml VRL erforderlich (Abb. 22a). Die Berechnung der CI-Werte ergab 0,987 (IC_{50}) und 1,190 (IC_{80}). Damit ist theoretisch von einem additiv bis synergistischen Wirken für die geringere Effektstärke (IC_{50}) auszugehen und ein eher antagonistisches Verhalten bei höherer Effektstärke (IC_{80}) abzuleiten. Nach sieben Tagen waren für T-47D bei gegebenen 10 ng/ml Alpelisib rechnerisch 1,29 ng/ml VRL zur Erreichung der IC_{50} notwendig (Abb. 22b). Um die Viabilität auf 20 % zu senken (IC_{80}), waren rechnerisch 4,79 ng/ml VRL erforderlich (Abb. 22b). Die Berechnung ergab für beide CI-Werte einen Synergismus mit 0,648 (IC_{50}) und 0,906 (IC_{80}). Der Synergismus wurde somit im Zeitverlauf sichtbar.

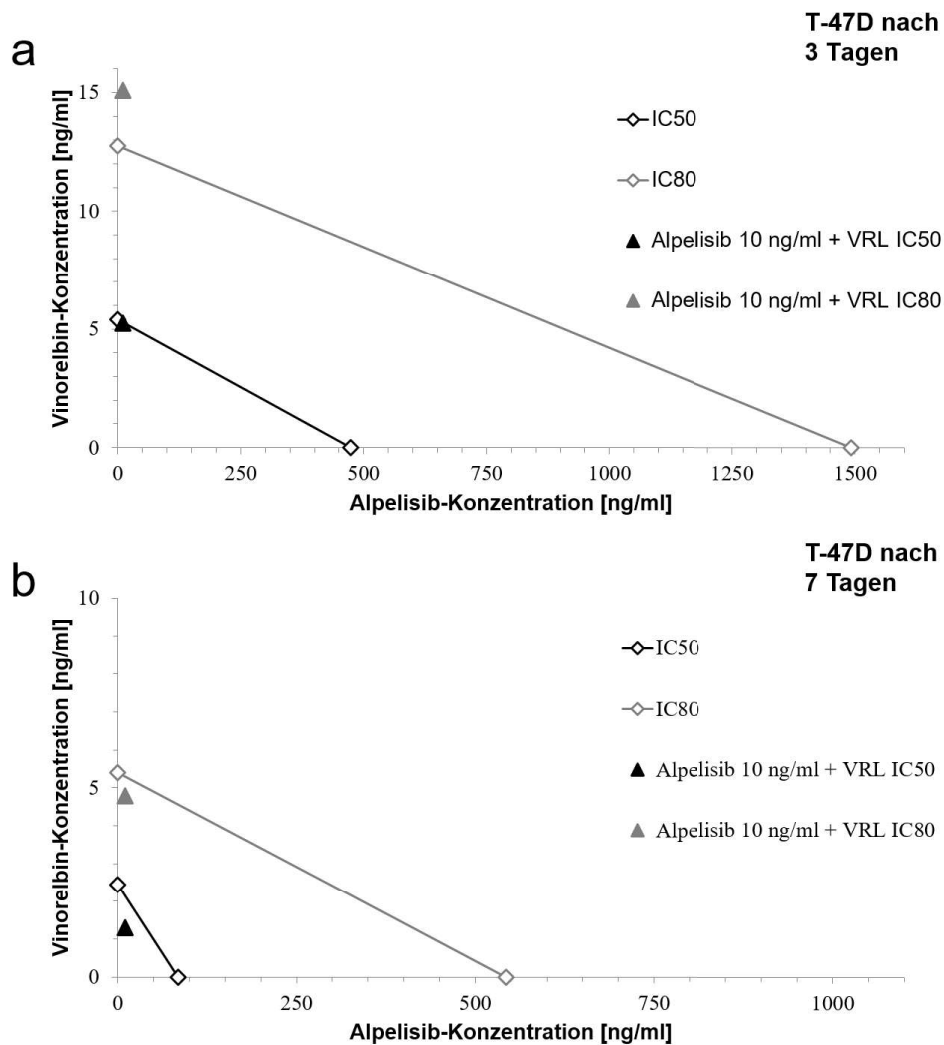


Abbildung 22: Isobologramm und Combination Index (CI) für die Viabilität von T-47D. a) nach drei Tagen, b) nach sieben Tagen. Inhibitorische Konzentrationen IC_{50} und IC_{80} durch Interpolation aus den Dosis-Wirkungs-Kurven von Vinorelbin (VRL) und Alpelisib berechnet. IC_{50} und IC_{80} als Additionsgeraden dargestellt. CI-Werte gemäß Formel (Abb. 13) berechnet und korrespondierende Datenpunkte in Relation zu den Additionsgeraden dargestellt.

5.2. Proliferation

Zu Beginn des Projektes wurden die Zelllinien MCF-7, T-47D, MDA-MB-231 und BT-549 ausgewählt. Auf Basis der Erkenntnisse aus der Viabilität wurde entschieden, das Proliferationsverhalten von BT-549 nicht zu ermitteln. Außerdem erfolgte eine Beschränkung auf den Messzeitpunkt nach sieben Behandlungstagen.

5.2.1. Vinorelbin plus Alpelisib

Metronomisch dosiertes VRL in Kombination mit Alpelisib reduzierte die Proliferation von MCF-7 (Abb. 23). Die stärkste Abnahme der Proliferation auf 27,3 % war bei 5 ng/ml VRL plus 100 ng/ml Alpelisib zu beobachten (SD 14,8 %, $p=0,0138$) (Abb. 23). Beide Wirkstoffe in den höchsten Konzentrationen (5 ng/ml VRL plus 1.000 ng/ml Alpelisib) erzielten ein nahezu gleiches Ergebnis von 28,0 % (SD 20,0 %, $p=0,0256$). VRL und Alpelisib zeigten auch in geringeren Konzentrationen einen Einfluss auf die Proliferation von MCF-7. 0,63 ng/ml VRL

plus 10 ng/ml Alpelisib senkten die Proliferation auf 58,8 % (SD 41,3 %, $p=0,2458$) (Abb. 23). Unter steigenden Konzentrationen von VRL und Alpelisib nahm die Proliferation relativ stetig ab. 2,5 ng/ml VRL plus 10 ng/ml Alpelisib senkten die Proliferation auf 50,3 % (SD 27,1 %, $p=0,0915$) und 2,5 ng/ml VRL plus 100 ng/ml Alpelisib reduzierten die Proliferation auf 43,3 % (SD 16,2 %, $p=0,0270$) (Abb. 23). Ab 500 ng/ml Alpelisib in Kombination mit VRL waren zusätzliche Effekte bei steigenden Konzentrationen nur noch gering ausgeprägt (Abb. 23). VRL allein zeigte ab 0,63 ng/ml einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation. Ebenso reagierte MCF-7 unter Alpelisib allein ab 10 ng/ml und bei Konzentrationssteigerung zunehmend mit einer Reduktion der Proliferation (Abb. 23).

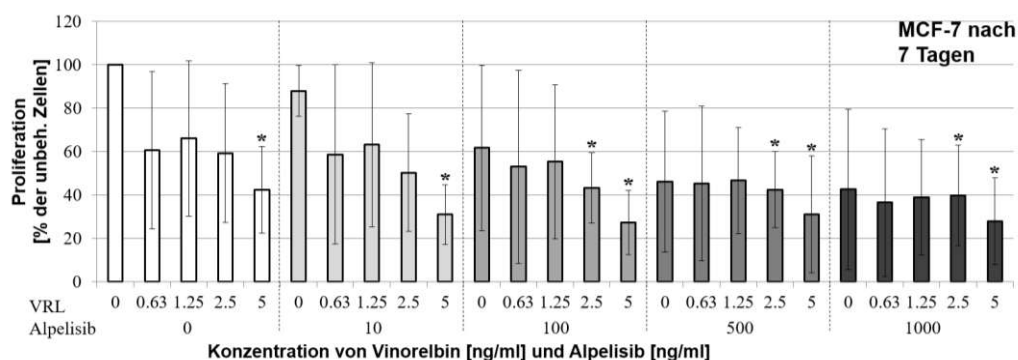


Abbildung 23: Einfluss von Vinorelbine (VRL) + Alpelisib auf die Proliferation von MCF-7. In Relation zur unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen. $n=3$. Statistische Signifikanz: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, * $p<0,001$.**

Metronomisch dosiertes VRL in Kombination mit Alpelisib reduzierte die Proliferation von T-47D (Abb. 24). Die stärkste Abnahme der Proliferation auf 10,3 % (SD 0,8 %) war bei 0,63 ng/ml VRL plus 1.000 ng/ml Alpelisib zu beobachten ($p=0,0001$) (Abb. 24). Dieser Messwert unterschied sich nur gering von den meisten anderen Konzentrationskombinationen der Wirkstoffe (Abb. 24). 0,63 ng/ml VRL plus 10 ng/ml Alpelisib senkten die Proliferation auf 31,9 % (SD 7,4 %, $p=0,0038$). Unter steigenden Konzentrationen von VRL und Alpelisib nahm die Proliferation ab. 2,5 ng/ml VRL plus 10 ng/ml Alpelisib senkten die Proliferation auf 13,5 % (SD 2,1 %, $p=0,0002$). Bei 2,5 ng/ml VRL plus 100 ng/ml Alpelisib reduzierte sich die Proliferation auf 15,8 % (SD 6,9 %, $p=0,0022$) und divergierte im Weiteren nur sehr gering (Abb. 24). VRL allein zeigte ab 0,63 ng/ml einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation. Ebenso reagierte T-47D bei Alpelisib allein ab 10 ng/ml und bei Konzentrationssteigerung zunehmend mit einer Reduktion der Proliferation (Abb. 24).

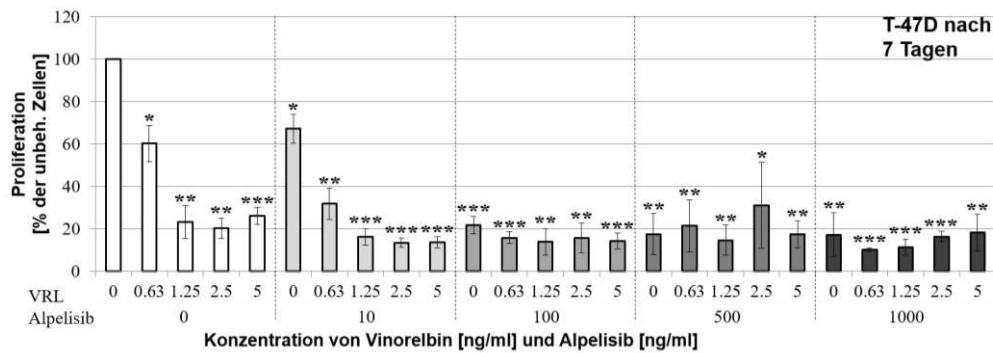


Abbildung 24: Einfluss von Vinorelbine (VRL) + Alpelisib auf die Proliferation von T-47D. In Relation zur unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen. $n=3$. Statistische Signifikanz: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

Metronomisch dosiertes VRL in Kombination mit Alpelisib reduzierte die Proliferation von MDA-MB-231 (Abb. 25). In Kombination beider Wirkstoffe wurden ähnliche Reduktionen der Proliferation beobachtet wie bei VRL-Monobehandlung. Die geringsten Proliferationswerte wurden unter 5 ng/ml VRL und weitgehend unabhängig von Alpelisib erreicht (Abb. 25). Bei 5 ng/ml VRL allein betrug die Proliferation 33,2 % (SD 10,1 %, $p=0,0078$). Unter 5 ng/ml VRL in Kombination mit 1.000 ng/ml Alpelisib war die Reduktion der Proliferation auf 30,5 % (SD 13,8 %, $p=0,0134$) nahezu gleich (Abb. 25). Alpelisib allein zeigte bei keiner Konzentration einen Einfluss auf die Proliferation von MDA-MB-231. Unter 1.000 ng/ml Alpelisib betrug die Proliferation 96,7 % (SD 6,2 %, $p=0,3963$) (Abb. 25). VRL allein zeigte ab 0,63 ng/ml bis 5 ng/ml zunehmend einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation (Abb. 25).

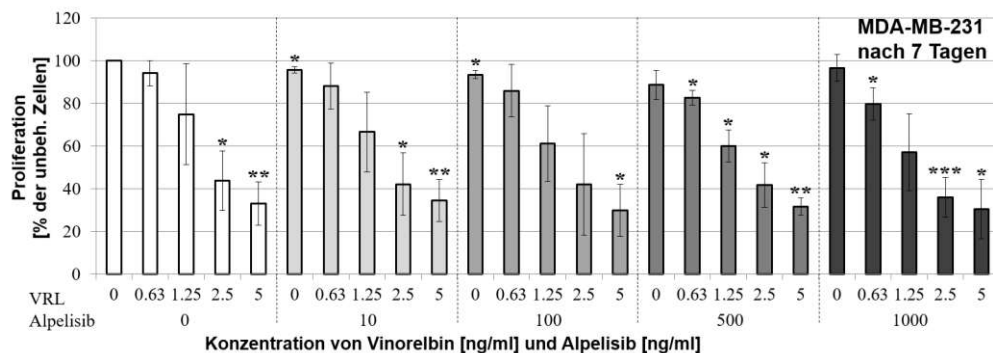


Abbildung 25: Einfluss von Vinorelbine (VRL) + Alpelisib auf die Proliferation von MDA-MB-231. In Relation zur unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen. $n=3$. Statistische Signifikanz: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

5.2.2. Synergistische Effekte

Zur Betrachtung etwaiger synergistischer Effekte von MCF-7 und T-47D, welche jeweils eine *PIK3CA*-Mutation aufweisen, erfolgte zunächst die Auftragung der Messergebnisse für die Proliferation von VRL und Alpelisib jeweils in Monogabe nach sieben Tagen (Abb. 26a-b). Die

Dosis-Wirkungs-Kurven zeigen, dass die *PIK3CA*-mutierten Zelllinien MCF-7 und T-47D auf Apfelsib ansprechen, im Gegensatz zu der *PIK3CA*-WT Zelllinie MDA-MB-231 (Abb. 26a-b).

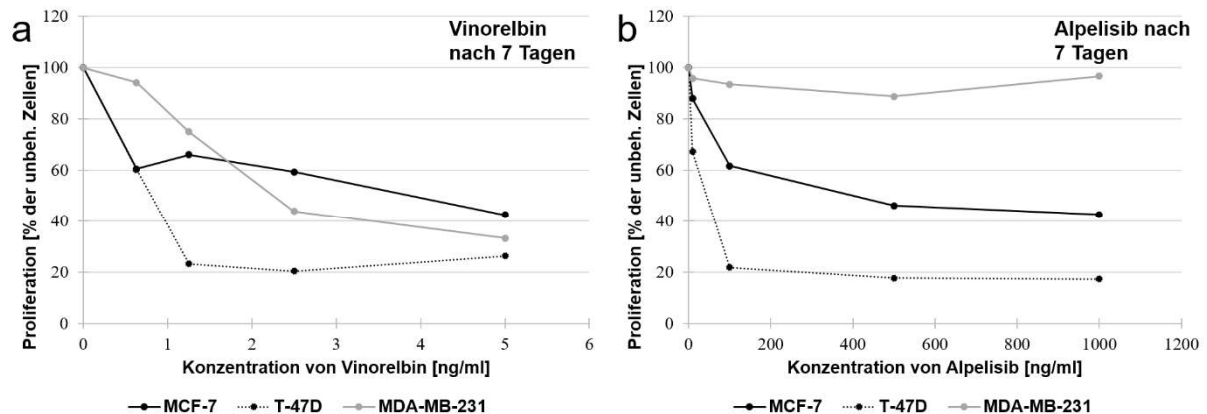


Abbildung 26: Dosis-Wirkungs-Kurven von Vinorelbin (VRL) und Apfelsib für die Proliferation der Zelllinien MCF-7, T-47D und MDA-MB-231. a) VRL nach sieben Tagen, b) Apfelsib nach sieben Tagen. In Relation zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte ohne Standardabweichungen. $n=3$.

Zunächst wurden mithilfe der Dosis-Wirkungs-Kurven die IC_{50} und IC_{80} für VRL und Apfelsib (jeweils in Monogabe) von MCF-7 und T-47D berechnet. Für MCF-7 wurde bei Kombination beider Wirkstoffe eine Basis von 100 ng/ml Apfelsib zugrunde gelegt. Um unter 100 ng/ml Apfelsib eine Hemmung der Proliferation von MCF-7 um 50 % zu erreichen (IC_{50}), wurden nach sieben Tagen rechnerisch 1,41 ng/ml VRL benötigt (Abb. 27). Um die Proliferation auf 20 % zu reduzieren (IC_{80}), waren nach sieben Tagen rechnerisch 7,10 ng/ml VRL erforderlich (Abb. 27). Die Berechnung der CI-Werte ergab 0,554 (IC_{50}) und 0,744 (IC_{80}). Gemäß der CI-Methode ist damit theoretisch von einem synergistischen Wirken für beide Effektstärken auszugehen.

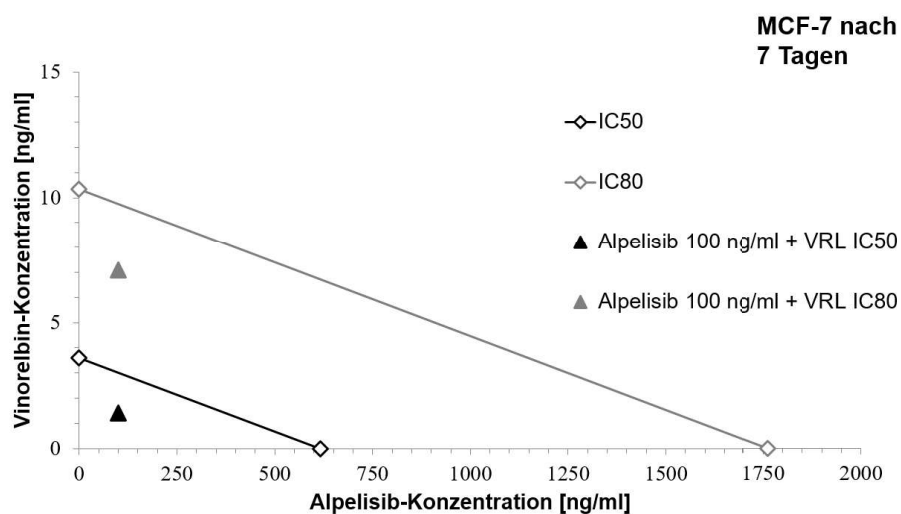


Abbildung 27: Isobologramm und Combination Index (CI) für die Proliferation von MCF-7. Inhibitorische Konzentrationen IC_{50} und IC_{80} durch Interpolation aus den Dosis-Wirkungs-Kurven von Vinorelbin (VRL) und Apfelsib berechnet. IC_{50} und IC_{80} als Additionsgeraden dargestellt. CI-Werte gemäß Formel (Abb. 13) berechnet und korrespondierende Datenpunkte in Relation zu den Additionsgeraden dargestellt.

Für T-47D wurde bei Kombination beider Wirkstoffe eine Basis von 10 ng/ml Alpelisib zugrunde gelegt, um eine Interpretierbarkeit der Daten nach der CI-Methode zu gewährleisten. Außerdem hätte sich für die IC_{50} unter Annahme von 10 ng/ml Alpelisib bei der Berechnung eine negative VRL-Konzentration ergeben, was nicht plausibel erschien. Daher erfolgt lediglich die Darstellung der Ergebnisse für die IC_{80} . Um unter 10 ng/ml Alpelisib eine Hemmung der Proliferation von T-47D um 80 % zu erreichen (IC_{80}), wurden nach sieben Tagen rechnerisch 2,39 ng/ml VRL benötigt (Abb. 28). Die Berechnung des CI-Werts ergab 0,533. Gemäß der CI-Methode ist damit theoretisch von einem synergistischen Effekt auszugehen.

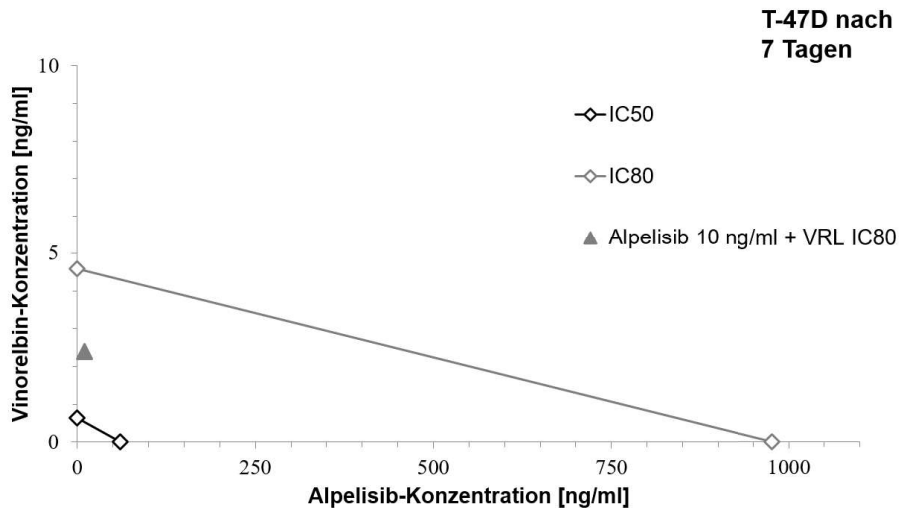


Abbildung 28: Isobologramm und Combination Index (CI) für die Proliferation von T-47D. Inhibitorische Konzentrationen IC_{50} und IC_{80} durch Interpolation aus den Dosis-Wirkungs-Kurven von Vinorelbin (VRL) und Alpelisib berechnet. IC_{50} und IC_{80} als Additionsgeraden dargestellt. CI-Wert für IC_{80} gemäß Formel (Abb. 13) berechnet und korrespondierenden Datenpunkt in Relation zur Additionsgeraden dargestellt.

5.3. Migration

Für die Migration erfolgte die Auswahl der Zelllinien MCF-7, MDA-MB-231, BT-20 und ZR-75-1. Neben einer Negativkontrolle und einer Positivkontrolle wurden 1,25 ng/ml VRL, 100 ng/ml Alpelisib und deren Kombination ausgewählt. Es erfolgte eine Beschränkung auf den Messzeitpunkt nach sieben Behandlungstagen. Die CI-Methode war auf den Migrations-Assay nicht anwendbar. Die Negativkontrollen sind in den Diagrammen daher nicht dargestellt.

5.3.1. Vinorelbin plus Alpelisib

MCF-7 reagierte auf 1,25 ng/ml metronomisch dosiertes VRL mit einer Hemmung der Migration innerhalb des Inkubationszeitraums von 20 h in der Boydenkammer (Abb. 29). Dem Chemotaxin Kollagen I (20 µg/ml) folgend wurde die Migration von MCF-7 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf 40,8 % (SD 15,5 %, $p=0,0046$) reduziert. Alpelisib vermochte die Migration von MCF-7 ebenfalls zu hemmen. Nach 20 h betrug der Anteil migrierter Zellen unter 100 ng/ml Alpelisib noch 71,7 % (SD 14,9 %, $p=0,0324$). In Kombination beider Wirkstoffe

(1,25 ng/ml VRL plus 100 ng/ml Alpelisib) ergab sich eine Reduktion der Migration auf 33,3 % (SD 5,9 %, $p=0,0002$) (Abb. 29). Abb. 30a-d zeigt exemplarische Ausschnitte der lichtmikroskopischen Ansicht bei 100 x Vergrößerung.

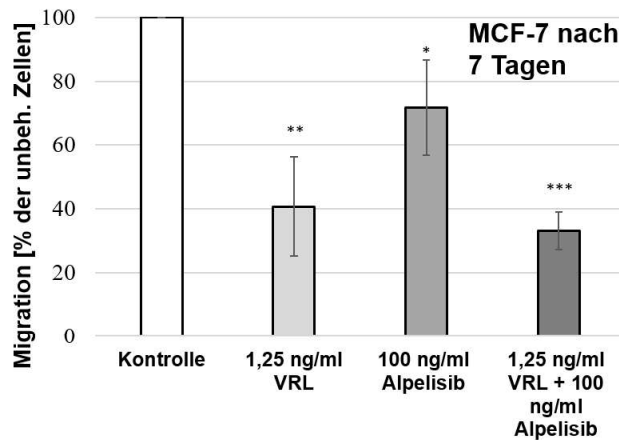


Abbildung 29: Migrationsverhalten von MCF-7 bei Vinorelbin (VRL) + Alpelisib. Behandlung über sieben Tage. In Relation zur unbehandelten Positivkontrolle (RPMI 1640 + 20 µg/ml Kollagen I). Negativkontrolle (RPMI 1640 ohne Chemotaxin) frei von migrierten Zellen (0 %) nicht dargestellt. 2 h vor Assay in 0 % FCS. 30.000 Zellen/Well. 20 h Inkubation in Boydenkammer. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen. $n=4$. Statistische Signifikanz: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

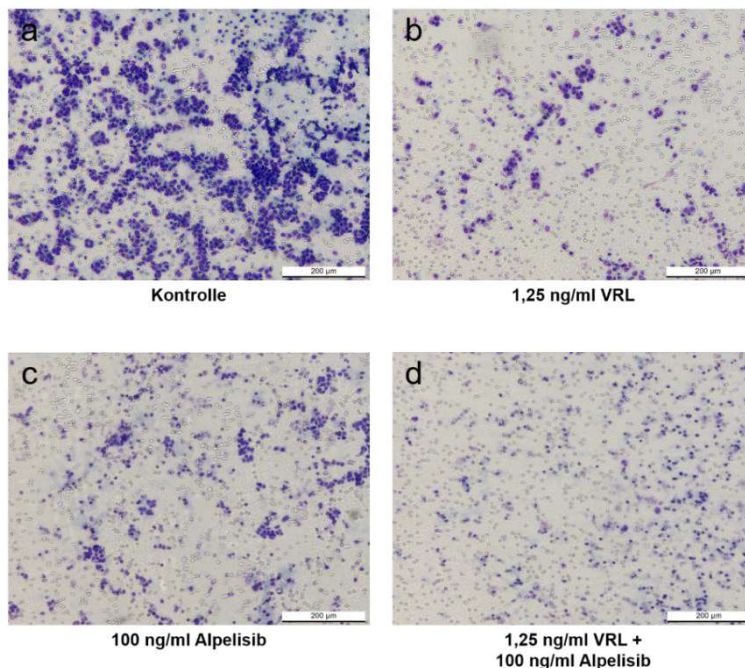


Abbildung 30: Migrierte Zellen MCF-7 nach Vinorelbin (VRL) + Alpelisib im Lichtmikroskop. Behandlung über sieben Tage. a) Positivkontrolle (RPMI 1640 + 20 µg/ml Kollagen I), b) 1,25 ng/ml VRL, c) 100 ng/ml Alpelisib, d) 1,25 ng/ml VRL + 100 ng/ml Alpelisib. Jeweils 100 x Vergrößerung. Exemplarische Bildausschnitte.

MDA-MB-231 sprach auf VRL in einer metronomischen Konzentration von 1,25 ng/ml bzgl. des Migrationsverhaltens an (Abb. 31). Die Migration wurde durch VRL in einer Konzentration von 1,25 ng/ml auf 69,9 % reduziert (SD 7,3 %, $p=0,0037$). Alpelisib führte bei MDA-MB-231

Ergebnisse

zu kaum einer Änderung der Migration. Nach 16 h Inkubation in der Boydenkammer waren bei Alpelisib 95,2 % der Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe gewandert (SD 21,0 %, $p=0,6766$). Die Kombination von 1,25 ng/ml VRL plus 100 ng/ml Alpelisib erzielte eine ähnliche Reduktion der Migration wie VRL in Monobehandlung und erreichte einen Wert von 72,7 % (SD 15,0 %, $p=0,0362$) (Abb. 31). Abb. 32a-d zeigt exemplarische Ausschnitte der lichtmikroskopischen Ansicht bei 100 x Vergrößerung.

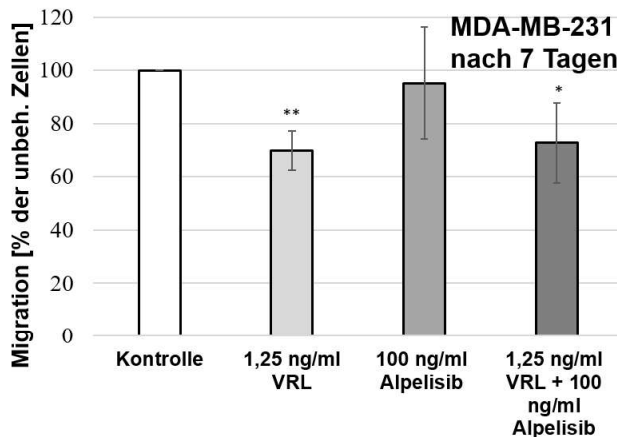


Abbildung 31: Migrationsverhalten von MDA-MB-231 bei Vinorelbin (VRL) + Alpelisib. Behandlung über sieben Tage. In Relation zur unbehandelten Positivkontrolle (RPMI 1640 + 20 µg/ml Kollagen IV). Negativkontrolle (RPMI 1640 ohne Chemotaxin) frei von migrierten Zellen (0 %) nicht dargestellt. 2 h vor Assay in 0 % FCS. 15.000 Zellen/Well. 16 h Inkubation in Boydenkammer. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen. $n=4$. Statistische Signifikanz: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

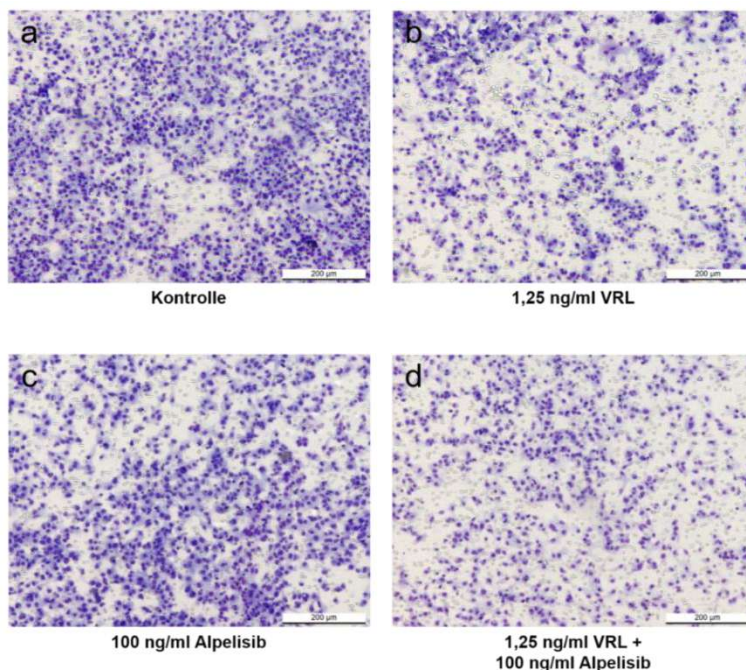


Abbildung 32: Migrierte Zellen MDA-MB-231 nach Vinorelbin (VRL) + Alpelisib im Lichtmikroskop. Behandlung über sieben Tage. a) Positivkontrolle (RPMI 1640 + 20 µg/ml Kollagen IV), b) 1,25 ng/ml VRL, c) 100 ng/ml Alpelisib, d) 1,25 ng/ml VRL + 100 ng/ml Alpelisib. Jeweils 100 x Vergrößerung. Exemplarische Bildausschnitte.

BT-20 zeigte sowohl bei 1,25 ng/ml VRL als auch unter 100 ng/ml Alpelisib ein geringes Ansprechen in der Migration (Abb. 33). Während unter 1,25 ng/ml VRL 93,5 % der Zellen migrierten (SD 3,5 %, $p=0,0340$), waren es bei 100 ng/ml Alpelisib 87,7 % (SD 5,7 %, $p=0,0229$). Die Kombination beider Wirkstoffe zeigte einen etwas stärker ausgeprägten Effekt und hemmte die Migration auf einen Wert von 82,7 % (SD 10,2 %, $p=0,0422$) (Abb. 33). Abb. 35a-d zeigt exemplarische Ausschnitte der lichtmikroskopischen Ansicht bei 100 x Vergrößerung. 2,5 ng/ml VRL reduzierte die Migration auf 83,4 %. 500 ng/ml Alpelisib führte zu einer Hemmung der Migration auf 32,7 % und in Kombination vermochten beide Wirkstoffe eine Hemmung der Migration auf 17,9 % zu erreichen (Abb. 34).

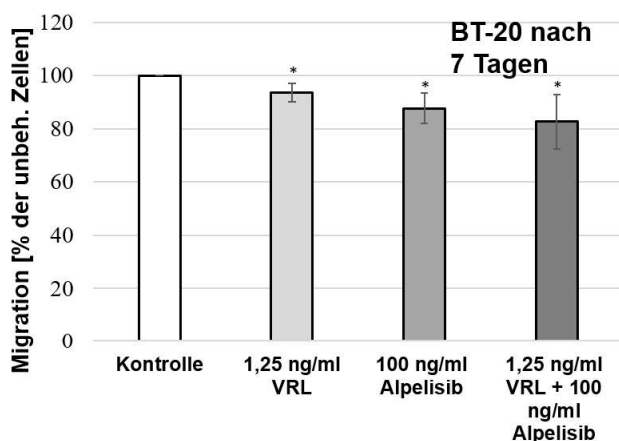


Abbildung 33: Migrationsverhalten von BT-20 bei Vinorelbin (VRL) + Alpelisib. Behandlung über sieben Tage. In Relation zur unbehandelten Positivkontrolle (RPMI 1640 + 20 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen IV). Negativkontrolle (RPMI 1640 ohne Chemotaxin) frei von migrierten Zellen (0 %) nicht dargestellt. 2 h vor Assay in 0 % FCS. 30.000 Zellen/Well. 16 h Inkubation in Boydenkammer. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen. $n=4$. Statistische Signifikanz: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

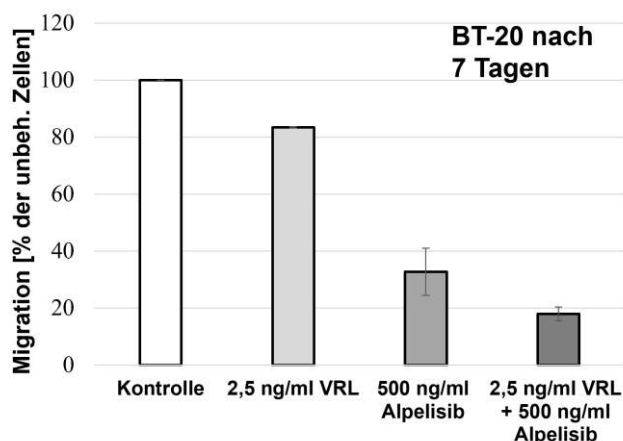


Abbildung 34: Migrationsverhalten von BT-20 bei Vinorelbin (VRL) + Alpelisib (höher dosiert). Behandlung über sieben Tage. In Relation zur unbehandelten Positivkontrolle (RPMI 1640 + 20 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen IV). Negativkontrolle (RPMI 1640 ohne Chemotaxin) frei von migrierten Zellen (0 %) nicht dargestellt. 2 h vor Assay in 0 % FCS. 30.000 Zellen/Well. 16 h Inkubation in Boydenkammer. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen. $n=2$. Statistische Signifikanz: nicht bestimmt aufgrund $n=2$.

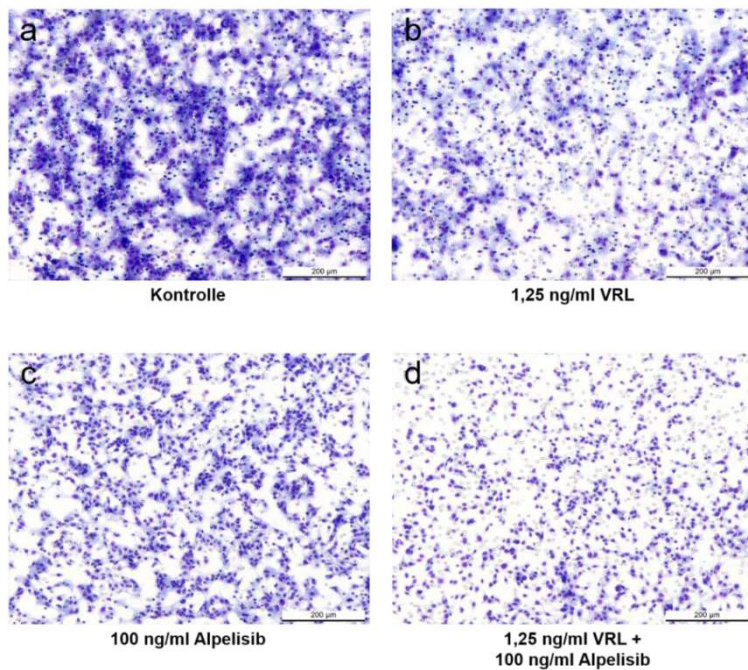


Abbildung 35: Migrierte Zellen BT-20 nach Vinorelbin (VRL) + Alpelisib im Lichtmikroskop. Behandlung über sieben Tage. a) Positivkontrolle (RPMI 1640 + 20 µg/ml Kollagen IV), b) 1,25 ng/ml VRL, c) 100 ng/ml Alpelisib, d) 1,25 ng/ml VRL + 100 ng/ml Alpelisib. Jeweils 100 x Vergrößerung. Exemplarische Bildausschnitte.

ZR-75-1 zeigte sowohl bei 1,25 ng/ml VRL als auch unter 100 ng/ml Alpelisib ein Ansprechen in der Migration (Abb. 36). Zu berücksichtigen ist, dass erst nach 48 h Migrationsdauer (Inkubationszeit) eine verwertbare Positivkontrolle zu detektieren war. Unter 1,25 ng/ml VRL wurde die Migration auf 76,0 % gesenkt (SD 9,7 %, $p=0,0156$) und bei 100 ng/ml Alpelisib erfolgte eine Hemmung der Migration auf 67,7 % (SD 13,4 %, $p=0,0169$). Die Kombination beider Wirkstoffe zeigte einen etwas stärker ausgeprägten Effekt und hemmte die Migration auf einen Wert von 59,1 % (SD 11,4 %, $p=0,0056$) (Abb. 36 und 37a-d).

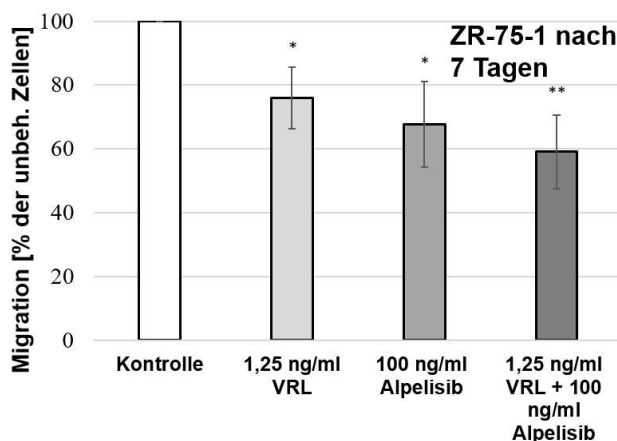


Abbildung 36: Migrationsverhalten von ZR-75-1 bei Vinorelbin (VRL) + Alpelisib. Behandlung über sieben Tage. In Relation zur unbehandelten Positivkontrolle (RPMI 1640 + 20 µg/ml Kollagen IV). Negativkontrolle (RPMI 1640 ohne Chemotaxin) frei von migrierten Zellen (0 %) nicht dargestellt. 24 h vor Assay in 0 % FCS. 30.000 Zellen/Well. 48 h Inkubation in Boydenkammer. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen. $n=4$. Statistische Signifikanz: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

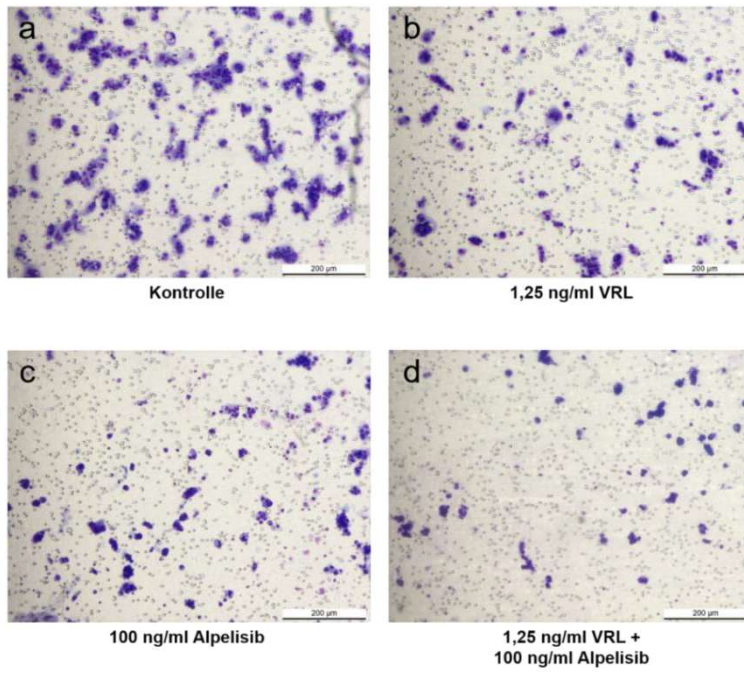


Abbildung 37: Migrierte Zellen ZR-75-1 nach Vinorelbin (VRL) + Alpelisib im Lichtmikroskop. Behandlung über sieben Tage. a) Positivkontrolle (RPMI 1640 + 20 µg/ml Kollagen IV), b) 1,25 ng/ml VRL, c) 100 ng/ml Alpelisib, d) 1,25 ng/ml VRL + 100 ng/ml Alpelisib. Jeweils 100 x Vergrößerung. Exemplarische Bildausschnitte.

6. Diskussion

6.1. Überlegungen zu DMSO

Der mögliche Einfluss von DMSO auf das Verhalten der Zelllinien ist kritisch zu diskutieren. Im experimentellen Umfeld ist DMSO etablierter Bestandteil (Galvao et al., 2014; Tanaka et al., 2009; Verheijen et al., 2019). So lösten Tanaka et al. (2009) alle 54 Chemotherapeutika für ihre Zellkulturversuche in 0,5 % DMSO. Auch Mirzoeva et al. (2009) setzten die in DMSO gelösten Wirkstoffe bei MCF-7, T-47D, MDA-MB-231, ZR-75-1 und BT-549 ein, ohne dass von Beeinträchtigungen hierdurch berichtet wurde. Der Einsatz von DMSO in geringen Konzentrationen gilt insbesondere für robuste Zelllinien aus zytotoxischer Sicht meist als unbedenklich (Galvao et al., 2014; Sumida et al., 2011). Gleichwohl zeigten neuere Untersuchungen auch für DMSO in geringeren Konzentrationen einen möglichen Einfluss auf die Epigenetik und Signalkaskaden (Verheijen et al., 2019). Oberhalb von 10 % DMSO wurden zytotoxische Aspekte beschrieben, u. a. durch Störungen der Zellmembran, während unterhalb von 10 % DMSO eher von zu vernachlässigbaren Effekten auszugehen ist (Ménorval et al., 2012; Notman et al., 2006; Verheijen et al., 2019). Bis zu einer Konzentration von 1-2 % (in vitro) wird DMSO im Allgemeinen als sicher betrachtet (Galvao et al., 2014; Sumida et al., 2011).

Aufgrund der relativ stark ausgeprägten und heterogenen Ergebnisse der DMSO-Kontrolle für BT-549 wurde diese Zelllinie für weitere Untersuchungen nicht eingesetzt. Als Kontrollzelllinie ohne *PIK3CA*-Mutation stand MDA-MB-231 zur Verfügung. Der dezente Anstieg der Viabilität unter 0,1 % bzw. 0,5 % DMSO bei MDA-MB-231 ist mit Beobachtungen in der Literatur vereinbar (Rodríguez-Burford et al., 2003; Wen et al., 2015). MCF-7 schien für 0,5 % DMSO und noch geringere DMSO-Konzentrationen weitgehend inert zu sein, sodass hier keine Beeinflussung anzunehmen ist. T-47D, welche über eine andere *PIK3CA*-Mutation verfügt als MCF-7, wurde für die Untersuchung der Proliferation beibehalten. Ein möglicher DMSO-Einfluss auf T-47D schien sich lediglich in der höchsten vorkommenden DMSO-Konzentration von 0,5 % abzuzeichnen. Für die Zelllinien ZR-75-1 und BT-20 erfolgte im hiesigen Labor die Lösung und Etablierung von Alpelisib in 0,025-0,005 % DMSO, sodass diese Konzentrationen übernommen wurden.

6.2. Überlegungen zur Metronomik

Um der Toxizitätsproblematik von Chemotherapeutika entgegenzuwirken, erscheint das Konzept der MCT bei MBC durchaus vielversprechend (Cazzaniga et al., 2022; Krajnak et al., 2022; J. Liu et al., 2022). Für eine Chemotherapie in einem metronomischen Design gibt es Hinweise darauf, dass sie im Vergleich zu konventionellen Chemotherapien die Entstehung von Therapieresistenzen evtl. reduzieren bzw. diese überwinden kann (N. André et al., 2017; Biziota et al., 2017; Romiti et al., 2017). Ursächlich für die Resistenzüberwindung wird der für

die MCT postulierte multimodale Wirkmechanismus angenommen, u. a. mit antiangiogenen und immunmodulatorischen Effekten und nicht ausschließlich die direkte Zytotoxizität der konventionellen Chemotherapie (Cazzaniga et al., 2022; Krajnak et al., 2022; J. Liu et al., 2022).

Eine kürzlich erschienene Publikation von H. Liu et al. (2024) bezeichnete das Konzept der MCT aufgrund der niedrigen Dosierungen als potenzielles Risiko bzgl. der Wirksamkeit. Dies steht in Widerspruch zu den nachgewiesenen Effekten durch diverse andere Autor:innen (Briasoulis et al., 2013; Briasoulis et al., 2009; Mavroeidis et al., 2015). In ihrer Studie untersuchten H. Liu et al. (2024) den Einfluss der Kombinationen von VRL plus Cisplatin und VRL plus Fluorouracil (5-FU) jeweils in verschiedenen niedrig gewählten Konzentrationen im Hinblick auf Tumorwachstum, Metastasierung, Angiogenese und Apoptose in einem Mausmodell⁸. Zudem evaluierten sie die Viabilität, Apoptose, Migration und Invasion in HUVEC und 4T1-Zellen in vitro (H. Liu et al., 2024). Die Ergebnisse variierten je nach gewählter Wirkstoff- und Dosiskombination. Für die Zellkulturversuche, welche am ehesten mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vergleichbar sind, wurde ein zweiseitiges Verhalten der analysierten Parameter festgestellt (H. Liu et al., 2024). Die IC_{50} für die Viabilität mit VRL betrug bei HUVEC 3,6 nM und bei 4T1 4 nM (H. Liu et al., 2024). Damit sind die IC_{50} bei H. Liu et al. (2024) sowohl vereinbar mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit als auch mit gemessenen Serumkonzentrationen aus Proben von Patient:innen unter MCT an anderer Stelle (Briasoulis et al., 2013; Briasoulis et al., 2009). Für triple-negative Zelllinien (MDA-MB-231, BT-549) wurde an anderer Stelle ebenfalls gezeigt, dass metronomisches VRL verschiedene Zellfunktionen zu hemmen vermag (Cerrito et al., 2018; Cerrito et al., 2020). So zeigte sich auch in der Proof-of-Concept-Studie VICTOR-0 ein Effekt auf die Viabilität von BT-549 und MDA-MB-231 durch metronomisches VRL und/oder 5-FU (Cerrito et al., 2018). Die dort erreichten bzw. interpolierten IC_{50} waren für das metronomische Design mit Messzeitpunkt nach 96 h niedriger im Vergleich zur Standarddosierung nach 4 h (Cerrito et al., 2018).

Die Viabilität von MCF-7, T-47D, MDA-MB-231 und BT-549 wurde in der vorliegenden Arbeit durch VRL in ebenfalls metronomischen Konzentrationen reduziert. Bei längerer Behandlungsdauer (sieben vs. drei Tage) waren für diese Zelllinien zwar tendenziell eher 2,5 ng/ml VRL anstatt 1,25 ng/ml VRL erforderlich, der viabilitätshemmende Effekt war dafür auch stärker ausgeprägt. Für die *PIK3CA*-mutierten Zelllinien MCF-7 und T-47D ergaben sich in der vorliegenden Arbeit zusammen mit Alpelisib synergistische Effekte bzgl. der Viabilitätshemmung. Je nach verwendeten Variablen für die CI-Berechnung resultierten zwar nicht immer metronomische Konzentrationen (MCF-7 IC_{80} nach 3 Tagen; T-47D IC_{50} und IC_{80} nach 3 Tagen). Auch hier war die längere Behandlungsdauer jedoch eher mit einem

⁸ 4T1-BALB/c, s. H. Liu et al. (2024)

synergistischen Effekt in bereits metronomischen Konzentrationen assoziiert. Für die Proliferation zeigten sich ebenfalls synergistische Effekte nach sieben Tagen Behandlungsdauer.

Die Migration und Invasion von HUVEC wurden bei H. Liu et al. (2024) durch 0,03-0,1 nM VRL gefördert. Gleiches galt für Konzentrationen von 0,03-0,25 nM VRL, welche die Migration und Invasion von 4T1 förderten (H. Liu et al., 2024). Rechnet man die bei H. Liu et al. (2024) angegebenen nM-Konzentrationen von VRL anhand des Molekulargewichts von VRL (778,9 g/mol) jedoch in ng/ml um, stellt man fest, dass sogar 0,25 nM VRL (gerundet 0,32 ng/ml) bei H. Liu et al. (2024) noch unter den niedrigsten gemessenen Serumkonzentrationen von Patient:innen unter effektiver MCT lagen (Briasoulis et al., 2013; Briasoulis et al., 2009). Auch Mavroeidis et al. (2015) zeigten eine effektive Hemmung u. a. von Proliferation und Migration bei HUVEC durch VRL im metronomischen Konzentrationsbereich. Die Ergebnisse bei H. Liu et al. (2024) deuten möglicherweise eher auf eine Unterdosierung der Wirkstoffe hin, unterhalb eines effektiven Wirkungsbereichs für die MCT. Daraus könnten Migration und Invasion aufgrund eines Selektionsdrucks tendenziell begünstigt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen einen hemmenden Effekt auf die Migration durch metronomisches VRL bei allen untersuchten Zelllinien. Zu bedenken ist jedoch auch, dass MDA-MB-231 (Basal-Like) und ZR-75-1 (Luminal) relativ gleich stark auf eine Hemmung der Migration bei 1,25 ng/ml VRL ansprachen. Allerdings war zur Detektion einer auswertbaren Migration von ZR-75-1 eine im Vergleich zu den anderen Zelllinien deutlich längere Inkubationsdauer erforderlich (48 h), wodurch die Vergleichbarkeit möglicherweise eingeschränkt sein könnte. Zudem waren für BT-20 höhere metronomische Konzentrationen erforderlich, um relevante migrationshemmende Effekte zu erzielen.

Eine Ineffektivität von MCT-Regimen kann aus den Ergebnissen von H. Liu et al. (2024) insgesamt eher nicht abgeleitet werden, wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und Resultate anderer Autor:innen bei höheren metronomischen Dosierungen zeigen (Briasoulis et al., 2013; Briasoulis et al., 2009; Mavroeidis et al., 2015). Vielmehr sind weitere Anstrengungen zur Etablierung geeigneter Wirkstoff-Dosis-Konstellationen der MCT erforderlich. Auch verschiedene Tumorsubtypen bedingen möglicherweise unterschiedliche Dosierungsregime trotz Verwendung derselben Wirkstoffe (Luminal vs. Basal-Like).

6.2.1. BT-20 – explorative Erhöhung der Wirkstoffkonzentration

Die initial gewählten Konzentrationen von 100 ng/ml Alpelisib und 1,25 ng/ml VRL in der vorliegenden Arbeit waren möglicherweise zu gering, um die Migration von BT-20 effektiv zu hemmen. Wie in vitro- und in vivo-Analysen zeigten, ist auch die Wahl der Dosis für den Erfolg der MCT von Relevanz (Briasoulis et al., 2013; Briasoulis et al., 2009; H. Liu et al., 2024;

Mavroeidis et al., 2015) und je länger die Einwirkung, desto größer möglicherweise der Effekt (Cazzaniga et al., 2022).

Allerdings sollten die gewählten Konzentrationen zwischen den untersuchten Zelllinien vergleichbar bleiben. Aufgrund des metronomischen Ansatzes lag ein insgesamt Dosis-reduziertes Design vor. 100 ng/ml Alpelisib entsprach einer Konzentration, welche deutlich unter den Serumkonzentrationen von Patient:innen liegt (Juric et al., 2018; Rodón et al., 2018), sodass in höherer Dosierung auch stärkere Effekte zu erwarten waren.

Die größere Hemmung des Migrationsverhaltens der Zelllinie BT-20 nach Behandlung mit 500 ng/ml Alpelisib, 2,5 ng/ml VRL oder 500 ng/ml Alpelisib plus 2,5 ng/ml VRL spricht dafür, dass die ursprünglich gewählte Konzentration von 100 ng/ml Alpelisib für BT-20 evtl. zu gering gewählt wurde. Dies könnte mit dem eher aggressiven molekularen Subtyp dieser Zelllinie zusammenhängen. Insofern wäre in diesem Fall eine metronomische Mindestkonzentration durchaus denkbar, um nicht eine Zunahme von Migration (und Invasion) im Sinne eines Selektionsdrucks zu begünstigen (H. Liu et al., 2024). Die Kombination von Alpelisib mit metronomisch dosiertem VRL ergab in der vorliegenden Arbeit demnach auch für die triple-negative Zelllinie BT-20 einen anti-tumorösen Effekt bei noch metronomischen Konzentrationen.

Vor dem Hintergrund des Nebenwirkungsspektrums von Alpelisib (Alaklabi et al., 2022; Chen et al., 2021; Ziegengeist et al., 2024) erscheint dieser Aspekt relevant. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu BT-20 unterstützen tendenziell den von Mosele et al. (2020) postulierten Nutzen der PI3K-Inhibition auch bei TNBC. Des Weiteren war in der vorliegenden Arbeit der migrationshemmende Effekt unter 2,5 ng/ml VRL ebenfalls ausgeprägter als bei 1,25 ng/ml VRL. Da es bei TNBC nach wie vor an befriedigenden Behandlungsmöglichkeiten mangelt (Foulkes et al., 2010; Gennari et al., 2021), könnte mit dieser Wirkstoffkombination an die gewonnenen Erkenntnisse zu BT-20 (TNBC) angeknüpft werden.

6.3. Überlegungen zur Behandlungsdauer mit Alpelisib

Ob die Dauer oder Dosis der Alpelisib-Behandlung relevanter für den therapeutischen Erfolg in der Klinik ist, konnte bisher nicht abschließend bewertet werden (Cheung et al., 2022). Bei Juric et al. (2018) zeigte sich ein Ansprechen des Tumors bereits ab 270 mg/d Alpelisib und eine Krankheitsstabilisierung ab 180 mg/d. Batalini et al. (2022) empfahlen in Kombination mit Olaparib eine Alpelisib-Dosis von 200 mg/d. Damit zeigte Alpelisib auch bei geringeren Dosen als den in Kombination mit Fulvestrant empfohlenen 300 mg/d einen Effekt. Cheung et al. (2022) stellten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der TTP fest zwischen der Kohorte, welche 300 mg/d Alpelisib erhielt im Vergleich zur Gruppe mit < 300 mg/d Alpelisib.

Allerdings war das PFS umso größer, je länger die Alpelisib-Behandlung erfolgte (Cheung et al., 2022).

6.3.1. MCF-7 und T-47D

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind bzgl. der Effektivität von Alpelisib bei Monobehandlung in Abhängigkeit der Behandlungsdauer ebenfalls eher etwas uneindeutig. So reagierte MCF-7 erst bei 500 ng/ml Alpelisib stärker mit einer Hemmung der Viabilität nach sieben Tagen im Vergleich zur Auswertung nach drei Tagen, der Unterschied war zudem nicht stark ausgeprägt. T-47D hingegen reagierte bereits bei 100 ng/ml Alpelisib nach sieben Tagen im Vergleich zur Auswertung nach drei Tagen mit einer stärkeren Abnahme der Viabilität. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen daher auch die im klinischen Umfeld nicht abschließend geklärte Frage, ob die Dauer oder Dosis von Alpelisib von größerer Relevanz ist (Cheung et al., 2022). Ergänzt man zu 100 ng/ml Alpelisib metronomisches VRL mit 1,25-2,5 ng/ml, war sowohl bei MCF-7 als auch bei T-47D nach sieben Tagen eine stärkere Hemmung der Viabilität zu beobachten. Für einen Vorteil der längeren Alpelisib-Behandlungsdauer könnten sich aufsummierende Effekte über die Zeit auf die vielfältigen Prozesse im PI3K-Signalweg sprechen. Bspw. über die Interaktion mit BAD, BAX, Caspasen, GSK3 β , NF- κ B u. a. (Bilanges et al., 2019; Khezri et al., 2022; Vivanco & Sawyers, 2002). Damit wäre eine prolongierte Alpelisib-Behandlung mit Zunahme des anti-tumorösen Effekts über verschiedene Mechanismen im Zeitverlauf evtl. vergleichbar mit dem Konzept der MCT.

Die synergistischen Effekte der Kombination aus metronomisch dosiertem VRL plus niedrig dosiertem Alpelisib in der vorliegenden Arbeit könnten perspektivisch daher auch klinisch einen Vorteil zeigen, wenn der Therapieerfolg maßgeblich auf die Dauer der Behandlung und die Interaktionsfähigkeit der Wirkstoffe anstatt ausschließlich deren Dosis abzielen würde.

6.4. Überlegungen zum Synergismus

6.4.1. MCF-7 und T-47D

In der vorliegenden Arbeit konnten mit dem hochselektiven PI3K-Inhibitor Alpelisib in Kombination mit einer VRL-basierten Chemotherapie synergistische Effekte auf die Hemmung von Viabilität und Proliferation gezeigt werden (MCF-7, T-47D).

Bereits vor Implementierung von Alpelisib konnte für *BRCA1*-mutierte Zelllinien bzw. nach *BRCA1*-Knockdown synergistische Effekte durch die Hemmung von PI3K/mTOR in Kombination mit verschiedenen Chemotherapeutika erzielt werden (Yi et al., 2013). Konkret sprach MCF-7 nach *BRCA1*-Knockdown mit konsekutiv erhöhten Leveln an p-Akt besser auf eine Hemmung im PI3K-Signalweg plus Chemotherapie an (Yi et al., 2013). Hieraus resultierte die Annahme, dass durch Interventionen im PI3K-Signalweg die Chemosensitivität erhalten oder wiederhergestellt werden kann (Badinloo & Esmaeili-Mahani, 2014; Brandão et al., 2019;

W.-C. Huang & Hung, 2009; Rodón et al., 2018). Die Kombination aus Chemotherapie und PI3K-Hemmung erschien daher vorteilhaft (Brandão et al., 2019; W.-C. Huang & Hung, 2009; Mosele et al., 2020). Mit Taselisib, einem semi-selektiven PI3K-Inhibitor, welcher die p110 β -Untereinheit etwa 30x weniger stark anspricht als die übrigen Isoformen (Fuso et al., 2022), konnte in vitro bei *PIK3CA*-mutierten Zelllinien (u. a. MCF-7) ebenfalls ein synergistisches Wirken bei Kombinationsbehandlung mit Chemotherapeutika erzielt werden (Morgillo et al., 2017). Mit dem allosterischen Akt-Inhibitor MK-2206 konnten für verschiedene Brustkrebszelllinien, u. a. ZR-75-1, BT-20, MCF-7 und MDA-MB-231, in vitro ebenfalls synergistische Effekte bzgl. der Proliferationshemmung in Kombination mit Docetaxel gezeigt werden. In diesem Fall wurde jedoch nicht PI3K inhibiert, sondern weiter Downstream in selbiger Signalkaskade angesetzt (Hirai et al., 2010).

Die synergistischen Effekte können evtl. auf die multimodalen Funktionen des PI3K-Signalweges zurückgeführt werden und die bereits beschriebenen vielfältigen Interaktionsstellen im PI3K-Signalweg (BAD, BAX, Caspasen, GSK3 β , NF- κ B u. a.) von Relevanz sein (Bilanges et al., 2019; Khezri et al., 2022; Vivanco & Sawyers, 2002). Bei Yi et al. (2013) lag ein synergistisches Wirken in der Kombination von BEZ235 mit Gemcitabin vor. Dies wurde auf eine Steigerung der Caspase-3/7-Aktivität zurückgeführt (Yi et al., 2013). Morgillo et al. (2017) und Rajput et al. (2019) verwendeten mit Eribulin eine Substanz, welche auf den Spindelapparat und damit die Mitose einwirkt. Bei Hirai et al. (2010) war es Docetaxel. Als halbsynthetisches Mikrotubulotoxin aus der Gruppe der Vinca-Alkaloide stört VRL ebenfalls die Bildung des Spindelapparats. Berücksichtigt man die Bedeutung von VRL für die Zellzyklushemmung und den ebenfalls multimodalen Mechanismus der MCT, könnte dies die synergistischen Effekte (z. B. über Steigerung der Caspase-3/7-Aktivität) mitbegründen. Synergistische Effekte durch die doppelte Inhibition zweier für die Proliferation relevanter Knotenpunkte erscheinen daher plausibel. Die Kombination zweier metronomischer Chemotherapien (5-FU, VRL) erzielte in einer anderen Arbeit zwar additive, jedoch keine synergistischen Effekte (CI 1,0) auf die Viabilitätshemmung in Zellkulturversuchen (Cerrito et al., 2018). Möglicherweise war für einen Synergismus die Beschränkung auf zwei "klassische" Chemotherapeutika trotz des metronomischen Designs nicht multimodal genug, im Vergleich zur Kombination einer (multimodalen) MCT mit einer (multimodalen) zielgerichteten Therapie.

In Zellversuchen bei Bosch et al. (2015) mit MCF-7 und T-47D (beide *PIK3CA*-mutiert) wurde die Genexpression HR-abhängiger Gene durch Alpelisib gesteigert und auch der ER selbst wurde verstärkt exprimiert. In ergänzenden Gewebeproben von Patient:innen zeigte sich, dass die PI3K-Hemmung das Genexpressionsprofil hin zu einer eher östrogenabhängigen Signalgebung verschob und dadurch Therapieresistenzen entstehen konnten (Bosch et al., 2015). Durch die Kombination mit einer anti-Hormonbehandlung (Fulvestrant) konnte diesem Mechanismus effektiv entgegengewirkt werden (Bosch et al., 2015). Zur Bedeutung von

Mutationen des ER-Gens *ESR1* auf die Wirksamkeit von Alpelisib gibt es jedoch unterschiedliche Erkenntnisse (Razavi et al., 2020; Savas et al., 2022; Sharma et al., 2021). Des Weiteren waren bei Mosele et al. (2020) diejenigen mit TNBC und erhöhter Rate an *PIK3CA*-Mutationen im Primärtumor HR_{pos}. Dies unterstützt evtl. die Überlegung einer induzierten Verschiebung des Genexpressionsprofils „zurück“ nach luminal durch Alpelisib (Bosch et al., 2015; Mosele et al., 2020; Pascual & Turner, 2019). Weiterhin führte in einer klinischen Studie die Hinzunahme von VRL zu Letrozol ebenfalls zu einer stärker immunbezogenen und östrogenzentrierten Genexpression beider Wirkstoffe in Kombination (Adamo et al., 2019). Endokrine Mechanismen einer MCT wurden bereits durch Cazzaniga et al. (2021b) diskutiert (Cazzaniga et al., 2019b).

Sollten sowohl Alpelisib als auch VRL daher eine eher ER-zentrierte Signalgebung begünstigen, könnte dies evtl. auch mit einer eher luminal zentrierten Genexpression einhergehen. VRL und Alpelisib könnten in Kombination durch den luminalen Charakter wiederum eine stärkere Wirkung entfalten im Vergleich zu triple-negativen Konstellationen. Der luminal Charakter mit evtl. größerer Bedeutung des PI3K-Signalweges im Vergleich zu Basal-Like/TNBC könnte so zum synergistischen Wirken beitragen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen einen synergistischen Effekt von Alpelisib auch in Kombination mit einem metronomischen Chemotherapiedesign, was vor dem Hintergrund der beschriebenen Nebenwirkungen von Pan-PI3K-Inhibitoren und konventionellen Chemotherapien relevant erscheint.

6.4.2. MDA-MB-231 und BT-549

Aufgrund der fehlenden Wirksamkeit von Alpelisib auf MDA-MB-231 und BT-549 (beide *PIK3CA*-WT) war in der vorliegenden Arbeit konzeptionell kein synergistisches Wirken in Kombination mit VRL zu erwarten. Für triple-negative Zelllinien, einschließlich BT-549 und MDA-MB-231 (beide *PIK3CA*-WT), wirkte bei Rajput et al. (2019) die Kombination von Buparlisib mit Eribulin hingegen synergistisch im Hinblick auf die Tumorkontrolle. Allerdings handelt es sich bei Buparlisib um einen Pan-PI3K-Inhibitor. Wenngleich in vitro-Resultate zu Buparlisib vielversprechend erschienen (Rajput et al., 2019), war die Behandlung mit dem Pan-PI3K-Inhibitor Buparlisib in der klinischen Anwendung als unverhältnismäßig toxisch einzustufen (Fuso et al., 2022; Li et al., 2021). In der Konsequenz haben Pan-PI3K-Inhibitoren wie Buparlisib an Bedeutung verloren (Fuso et al., 2022; Li et al., 2021; Rajput et al., 2019). Taselisib zeigte bei *PIK3CA*-WT Zelllinien (u. a. MDA-MB-231) hingegen nur sehr geringe oder gar keine Effekte (Morgillo et al., 2017). Auch Taselisib hat aufgrund unbefriedigender Ergebnisse im Hinblick auf die Toxizität und den klinischen Nutzen in der SANDPIPER-Studie (HR_{pos}/HER2_{neg}, *PIK3CA*-mutiert, metastasiert) in der weiteren Anwendung an Stellenwert eingebüßt (Dent et al., 2021; Fuso et al., 2022; Li et al., 2021).

Damit weisen die Resultate für Taselisib bei Morgillo et al. (2017) in die gleiche Richtung wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Die *PIK3CA*-WT-Konfiguration bei BT-549 und MDA-MB-231 stellt demnach eher keine veritable Zielstruktur für Alpelisib als selektiven α -Isoform-Inhibitor dar.

6.5. Überlegungen zur *PIK3CA*-Mutation

6.5.1. MCF-7 und T-47D

In der vorliegenden Arbeit sprachen MCF-7 (Viabilität, Proliferation, Migration) und T-47D (Viabilität, Proliferation) auf Alpelisib an und konnten bereits bei 10-100 ng/ml Alpelisib in den genannten Zellfunktionen gehemmt werden. Das Ansprechen auf eine Inhibition im PI3K-Signalweg bei bestehender H1047R-Mutation, wie sie auch bei T-47D vorliegt, wird als wahrscheinlich angesehen (Millis et al., 2016). Dies zeigte sich in klinischen Studien unter Einschluss verschiedener Tumorentitäten, allerdings kam hier nicht Alpelisib zum Einsatz (Janku et al., 2014; Janku et al., 2013). Für die Mutation H1047R wurde über alle Tumorproben hinweg sogar ein besseres Ansprechen auf die Therapie festgestellt, im Vergleich zu anderen *PIK3CA*-Mutationen oder *PIK3CA*-WT (Janku et al., 2014; Janku et al., 2013), wobei sich die Autor:innen explizit nicht nur auf Brustkrebs bezogen; nur 5 % aller getesteten Isolate waren Brustkrebs zuzuordnen. Außerdem waren in den Untersuchungen verschiedene Wirkstoffe mit verschiedenen Zielstrukturen im PI3K-Signalweg zusammengefasst (Janku et al., 2014; Janku et al., 2013). Bzgl. der Viabilität und der Proliferation sprach T-47D in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu MCF-7 auch besser auf Alpelisib bereits bei niedrigeren Dosierungen an. Dies wäre somit konsistent zu den Erkenntnissen von Janku et al. (2014). Möglicherweise liegt dies an der Veränderung des katalytischen Zentrums bei H1047R (Millis et al., 2019). Bei Juric et al. (2018) konnte zwar kein Ansprechen bei H1047R-Mutation auf Alpelisib gezeigt werden, allerdings betrachteten die Autor:innen die Aussagekraft dieser Erkenntnis aufgrund der Heterogenität ihrer Studienpopulation und der verschiedenen inkludierten Tumoren kritisch. In der SOALR-1-Studie sprachen hingegen alle Patient:innen mit den häufigen Mutationen von *PIK3CA* in den Exons neun (MCF 7) und 20 (T-47D) auf Alpelisib plus Fulvestrant an (F. André et al., 2019). Ebenso verhielt es sich bei Mayer et al. (2017) in der Kombination von Alpelisib plus Letrozol bei MBC. In einer kürzlich erschienenen retrospektiven Datenbankanalyse wurde bestätigt, dass auch Patient:innen mit nicht typischen *PIK3CA*-Mutationen ein dem Mutationsspektrum der SOLAR-1-Studie vergleichbares klinisches Outcome auf Alpelisib zeigten und von dem Medikament profitierten (Rugo et al., 2023). Der Gain-of-function durch *PIK3CA*-Mutationen besitzt einerseits hohes tumortreibendes Potential (Fritsch et al., 2014; Janku et al., 2014; Thirumal Kumar & George Priya Doss, 2017), andererseits könnte gerade dieser Aspekt auch die ausgeprägte Wirkung des Alpelisibs bedingen. Die Onkogenität könnte maßgeblich, wenn auch evtl. nicht ausschließlich, auf dem PI3K-Signalweg basieren.

Der *PIK3CA*-Status gilt als adäquater Prädiktor, um ein Ansprechen auf Alpelisib abzuschätzen (Bertho et al., 2021; Brandão et al., 2019; Fritsch et al., 2014; Rugo et al., 2023). Ein Ansprechen auf Alpelisib bei *PIK3CA*-Mutation war auch in der vorliegenden Arbeit bei allen untersuchten Zellfunktionsanalysen für MCF-7 und T-47D zu beobachten, der prädiktive Charakter des *PIK3CA*-Status konnte damit am ehesten bestätigt werden.

6.5.2. BT-20

BT-20 sprach in den Migrationsversuchen nur mäßig auf die initial niedrig gewählte Alpelisib-Konzentration an, was vor dem Hintergrund einer bestehenden *PIK3CA*-Mutation und im Vergleich zu den Ergebnissen bei MCF-7 (Migration) eher unerwartet erscheint. Für BT-20 wird neben der verbreiteten H1047-Missense-Mutation eine Mutation mit Aminosäureaustausch an der Position P539R auf Proteinebene beschrieben (Torbett et al. 2008; Saal et al. 2005). Möglicherweise ist die konkrete Ausgestaltung der Mutationstypen ebenfalls relevant für den therapeutischen Erfolg (Janku et al. 2013). Die Mutationstypen von BT-20 (H1047R) und MCF-7 (E545K) unterscheiden sich bspw. ebenfalls und zeigten in den Versuchen ein unterschiedlich starkes Ansprechen auf die Behandlung, zusätzlich zu ihrem unterschiedlichen Tumorsubtyp. So wurde die Migration von BT-20 im Vergleich zu MCF-7 in der vorliegenden Arbeit bei gleichen Wirkstoffkonzentrationen nicht relevant gehemmt, höhere Wirkstoffkonzentrationen waren erforderlich und in der Folge auch effektiv. Dies spricht daher weniger für ein Nicht-Ansprechen bei *PIK3CA*-Mutation, sondern eher für die Bedeutung des Tumorsubtyps und/oder weiteren Mutationen, welche Einfluss nehmen könnten.

6.6. Überlegungen zum *PTEN*-Status

6.6.1. ZR-75-1

Die Hemmung der Migration von ZR-75-1 in der vorliegenden Arbeit durch 100 ng/ml Alpelisib auf 67,7 % und in Kombination mit 1,25 ng/ml VRL sogar auf 59,1 % erscheint zunächst unerwartet, da die Zielstruktur p110 α bei dieser Zelllinie nicht alteriert ist.

Weigelt et al. (2011) zeigten für ZR-75-1 trotz *PIK3CA*-WT und *PTEN*-Mutation (L108R) ein Ansprechen auf die Hemmung von mTOR mit der Substanz PP242. Die Autor:innen bezeichneten die Ergebnisse zu ZR-75-1 selbst als „Ausreißer“ (Weigelt et al., 2011), da bis auf eine weitere Ausnahme⁹ bei allen getesteten Zelllinien mit dieser genetischen Konstellation kein ausreichender Zelltod durch die Targetierung erzielt werden konnte (Weigelt et al., 2011). Auch bei den Konzentrationen von ERK1/2 wurde bei ZR-75-1 kein Anstieg unter der Behandlung verzeichnet, wohingegen die übrigen *PTEN*-aberranten Zelllinien mit einem ERK1/2-Anstieg reagierten (Weigelt et al., 2011). Zu bedenken ist, dass bei Weigelt et al.

⁹ Zelllinie CAMA1 mit *PTEN*-Mutation D92H und schwacher Expression des Genprodukts, s. Weigelt et al. (2011).

(2011) nicht Alpelisib eingesetzt wurde, sondern die Zielstrukturen weiter Downstream in der Signalkaskade angesprochen wurden (mTOR).

Es gibt Hinweise darauf, dass bei *PTEN*-Mutation/-Verlust anstatt p110 α die Isoform p110 β verstärkt in den Fokus zellulärer Prozesse rückt (Ni et al., 2012; Torbett et al., 2008). *PTEN*-Mutation und *PTEN*-Verlust sind grundsätzlich jedoch nicht gleichzusetzen. *PTEN*-Mutationen führen eher zu einem *PTEN*-Verlust und ein *PTEN*-Verlust kann auch ohne assoziierte Mutation auftreten (Janku et al., 2014; Millis et al., 2016). Für einen *PTEN*-Verlust in einem Mausmodell mit Prostatakarzinom zeigte sich das Phänomen der Isoformverschiebung von p110 α zu p110 β ebenfalls (Jia et al., 2008). Im Rahmen früherer klinischer Studien zu Alpelisib wurden Gewebeproben einer Patientin untersucht, die kurz nach Entwicklung einer Therapieresistenz gegen Alpelisib verstarb. Die Lungenmetastasen wiesen neu aufgetretene *PTEN*-Veränderungen mit Proteinverlust auf (Juric et al., 2015). Weitere Analysen und klinische Studien bestätigten, dass Alpelisib nach *PTEN*-Verlust an Wirksamkeit verliert (Juric et al., 2015; Razavi et al., 2020; Savas et al., 2022). Ein stark selektiv wirkender p110 α -Inhibitor würde folglich die Signalgebung nicht (mehr) adäquat hemmen. In der Konsequenz wäre wieder ein unselektiver PI3K-Inhibitor erforderlich (Fritsch et al., 2014; Ni et al., 2012). Juric et al. (2018) beschrieben ein Therapieansprechen auf Alpelisib auch bei Patient:innen mit *PTEN*-Verlust, bewerteten die Aussagekraft dieser Erkenntnis in Anbetracht vielfältiger Einflussfaktoren der Studie jedoch kritisch. Interessant ist, dass die Herunterregulierung von p110 β (*PIK3CB*) im Unterschied zu p110 α scheinbar nur einen geringen Effekt auf die Phosphorylierung von PKB erzielt (Jia et al., 2008; P. Liu et al., 2009). Dies könnte mit einer erhöhten basalen Aktivität der Isoform p110 β (*PIK3CB*) zusammenhängen, welche auch ohne den Einfluss von Botenstoffen signalgebende Wirkung besäße. Im Gegensatz zur Isoform p110 α , welche stark abhängig von Upstream gelegenen Aktivatoren zu sein scheint (Wee et al., 2008). Eine Wiederherstellung des Hemmerfolgs konnte auch bei Juric et al. (2015) durch einen Pan-PI3K-Inhibitor erreicht werden. Das der *PTEN*-Status die Effektivität von Alpelisib mindert, wurde bereits zuvor von Fritsch et al. (2014) festgestellt und für die Selektion geeigneter Patient:innen für eine Behandlung mit diesem Wirkstoff als relevant beschrieben. Die Aktivität des PI3K-Signalweges und der Erfolg einer PI3K-Hemmung unterliegen demnach auch anderen Einflüssen und sind nicht nur vom *PIK3CA*-Status abhängig (Badinloo & Esmaeili-Mahani, 2014; Razavi et al., 2020).

Ob die beschriebene Isoformverschiebung von p110 α zu p110 β bei ZR-75-1 in der vorliegenden Arbeit tatsächlich erfolgte, bleibt unklar. Stünde trotz *PTEN*-Mutation/-Verlust die Isoform p110 α weiterhin im Zentrum der Signalgebung, wäre der inhibitorische Effekt von Alpelisib in der vorliegenden Arbeit aufgrund der antagonistischen Wirkweise von PI3K und *PTEN* evtl. erklärbar (mangelnde Konversion von PIP₃ zu PIP₂). Die luminalen Zelllinien ZR-75-1 könnten im Unterschied zu Basal-Like Zelllinien stärker abhängig von p110 α sein. Dafür spricht,

dass in der vorliegenden Arbeit inhibitorische Effekte auf das Migrationsverhalten von ZR-75-1 (*PIK3CA*-WT) zu beobachten waren, während BT-20 (*PIK3CA*-Mutation) bei den gleichen Wirkstoffkonzentrationen deutlich weniger ansprach. Zudem sprachen auch Patient:innen mit *PTEN*-Mutation bei Juric et al. (2018) auf die Behandlung mit Alpelisib an.

6.6.2. BT-549

Die Viabilität von BT-549 wurde in der vorliegenden Arbeit bei einer Alpelisib-Konzentration von 500 ng/ml nach sieben Tagen Behandlungsdauer etwas herabgesetzt, jedoch ist dieser Effekt auch vor dem Hintergrund eines etwaigen DMSO-Einflusses zu bewerten (s. oben).

Für BT-549 ist eine *PTEN*-Mutation mit Proteinverlust beschrieben (Hollestelle et al., 2010; Torbett et al., 2008; Weigelt et al., 2011). Bereits 2008 wurde für BT-549 gezeigt, dass die Herunterregulierung von *PIK3CA* die Phosphorylierung von PKB nicht mindert, wohingegen die Targetierung von *PIK3CB* zu einem wachstumshemmenden Effekt führte (Wee et al., 2008). Dies unterstützt die Annahme einer Isoformverschiebung von p110 α zu p110 β bei *PTEN*-Mutation (Jia et al., 2008; Juric et al., 2015; Ni et al., 2012; Torbett et al., 2008). Auch die Targetierung von mTOR mit der Substanz PP242 führte bei BT-549 in einer Untersuchung nicht zu einem relevanten Zelluntergang, wobei jedoch bereits weiter Downstream in der Signalkaskade eingegriffen wurde (Weigelt et al., 2011). Da Alpelisib stark selektiv auf die Isoform p110 α wirkt, wäre vor diesem Hintergrund jedoch kein Effekt erwartbar, was den Versuchsergebnissen der vorliegenden Arbeit widerspricht. Ohne eine Isoformverschiebung von p110 α zu p110 β bei *PTEN*-Mutation nähme die Konzentration von PIP₃ durch die verringerte Dephosphorylierung zu PIP₂ zu (Khezri et al., 2022; Vivanco & Sawyers, 2002). Auch ohne *PIK3CA*-Mutation ergäbe sich hieraus evtl. ein Effekt durch die Behandlung mit Alpelisib. So sprachen auch Patientinnen mit *PTEN*-Mutation bei Juric et al. (2018) auf Alpelisib an. Ob bei BT-549 in der vorliegenden Arbeit tatsächlich eine *PTEN*-bedingte PI3K-Signalverstärkung stattfand und welche p110-Isoform in diesem Fall entscheidend angesprochen würde, kann jedoch auf Basis der durchgeführten Zellfunktionsanalysen nicht geschlussfolgert werden. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass die *PTEN*-Mutation bei BT-549 zumindest einen interferierenden Einfluss ausübt.

6.6.3. BT-20

BT-20 sprach in der vorliegenden Arbeit nur mäßig auf (niedrige) Alpelisib-Konzentrationen an, was vor dem Hintergrund einer bestehenden *PIK3CA*-Mutation und im Vergleich zu den Ergebnissen bei den luminalen Zelllinien eher unerwartet erscheint.

Für die Zelllinie BT-20 ist keine *PTEN*-Mutation beschrieben (Torbett et al., 2008). Die spezielle Konstellation aus *PIK3CA*-Mutation mit einer gleichzeitig bestehenden *PTEN*-Mutation scheint zudem ein eher unübliches Ereignis zu sein (Janku et al., 2014; Millis et al., 2016; Rugo et al., 2023; Saal et al., 2005). Es besteht dennoch die Möglichkeit, dass BT-20 im Zeitverlauf eine

de novo-Mutation von *PTEN* erfahren haben könnte. Razavi et al. (2020) beschrieben bei Personen unter Alpelisib- und anti-Hormonbehandlung ebenfalls de novo Resistenzen im Zusammenhang mit *PTEN*-Alterationen. Zumal Veränderungen von *PTEN* am häufigsten im Subtyp Basal-Like auftreten und BT-20 diesem Subtyp zuzuordnen ist (Hoeflich et al., 2009). Unter der Annahme einer de novo *PTEN*-Mutation mit konsekutiver Isoformverschiebung von p110 α zu p110 β wäre ein reduziertes Ansprechen auf die Behandlung in der vorliegenden Arbeit erwartbar und vereinbar mit Erkenntnissen verschiedener Autor:innen (Juric et al., 2015; Ni et al., 2012; Razavi et al., 2020; Torbett et al., 2008).

Unabhängig des *PTEN*-Status gibt es Hinweise darauf, dass Zellen eine zeitabhängige Resistenz gegen Alpelisib entwickeln können, indem auch ohne *PTEN*-Mutation verstärkt die Isoform p110 β angesprochen wird (Costa et al., 2015). Hierzu bestimmten die Autor:innen neben p-Akt das Verhältnis von PIP $_3$ zu PIP $_2$, da aufgrund PI3K-unabhängiger Aktivierungswege für AKT auch andere Mechanismen in Frage kommen (Costa et al., 2015). In der Folge stieg bei *ERBB2* amplifizierten Zellen (z. B. BT-474) p-Akt an bzw. die PIP $_3$ /PIP $_2$ -Ratio nahm nach 24 h trotz Alpelisib-Behandlung zu. Durch Upstream-Signale schien es zu einer verstärkten Interaktion von p110 β mit HER2 und auch HER3 (*ERBB3*) zu kommen (Costa et al., 2015). Zudem zeigten die Autor:innen, dass *PIK3CA*-mutierte Zelllinien durch eine Dual-Inhibition von p110 α und p110 β wiederum in ihrer Viabilität zu hemmen sind. Der Effekt zeigte sich jedoch bei *ERBB2* amplifizierten Zelllinien und diesen Status besitzt BT-20 nicht. Betrachtet man in der Publikation jedoch die p-Akt-Banden in den Grafiken für BT-20, erkennt man möglicherweise ebenfalls eine geringe Zunahme der p-Akt-Banden nach 6 h und 24 h (Costa et al., 2015).

Die bereits beschriebene Effizienz von Pan-PI3K-Inhibitoren (Fuso et al., 2022; Juric et al., 2015; Li et al., 2021) ginge bei Patient:innen mit der Inkaufnahme vermehrter Nebenwirkungen einher, sodass sich Costa et al. (2015) eher für die Kombination zweier selektiver Inhibitoren aussprachen. Vor dem Hintergrund, dass die Behandlungsdauer in der vorliegenden Arbeit sieben Tage betrug, ist der Aspekt einer zeitabhängigen Verschiebung von p110 α zu p110 β denkbar. Der Einfluss der basalen Aktivität von p110 β (Wee et al., 2008) könnte zunehmen und den Effekt von Alpelisib limitieren. V. a. die Zeitkomponente der Behandlungsdauer böte BT-20 evtl. die Möglichkeit, die Signalgebung zu variieren und zelluläre Funktionen im Sinne eines Escape- oder Anpassungsmechanismus aufrechtzuerhalten.

6.7. Überlegungen zum MAP-Kinase-Signalweg

6.7.1. BT-20

In der vorliegenden Arbeit wurde die Migration von BT-20 durch 1,25 ng/ml VRL und 100 ng/ml Alpelisib nur gering gehemmt, insbesondere im Vergleich zu MCF-7. Erst höhere

Konzentrationen der Wirkstoffe (500 ng/ml Alpelisib, 2,5 ng/ml VRL, 500 ng/ml Alpelisib plus 2,5 ng/ml VRL) verursachten einen stärkeren migrationshemmenden Effekt.

PI3K- und MAP-Kinase-Signalweg sind miteinander verschaltet und Tumorzellen können bei PI3K-Hemmung den MAP-Kinase-Signalweg als Escapemechanismus nutzen (Brandão et al., 2019; Engelman et al., 2008; Khezri et al., 2022; Sos et al., 2009; Vitale et al., 2021). Die Kommunikation der Signalwege geschieht u. a. über mTOR (Mirzoeva et al., 2009; Pascual & Turner, 2019). Auf Basis zusätzlicher Mutationen (wie *K-RAS*, *MAP3K1*) reagieren Tumorzellen evtl. nicht auf die Hemmung von PI3K (Avivar-Valderas et al., 2018; Janku et al., 2013; Mosele et al., 2020). *PIK3CA*-Mutationen sind bei verschiedenen Tumoren im Vergleich zu *PIK3CA*-WT häufiger mit *RAS*-Mutationen (v. a. *K-RAS*) assoziiert (Janku et al., 2014). Gleichzeitig sind *PIK3CA*-Mutationen bei Brustkrebs häufig (Dong et al., 2022; Khezri et al., 2022; Sobhani et al., 2018; Yang et al., 2019). Speziell für Brustkrebs wurde im Zusammenhang mit *PIK3CA*-Mutationen von einer erhöhten Rate an *MAP3K1*-Mutationen berichtet, wodurch u. a. der MAP-Kinase-Signalweg als Escapemechanismus gefördert wird (Avivar-Valderas et al., 2018; Mosele et al., 2020; Rugo et al., 2023; Savas et al., 2022). Die Kommunikation der Signalwege geschieht u. a. über IRS1 (Avivar-Valderas et al., 2018). Das gemeinsame Auftreten von *PIK3CA*- und *MAP3K1*-Mutation wurde daher auch eher bei luminalen Subtypen beobachtet (Avivar-Valderas et al., 2018; TCGAN, 2012). Im Vergleich zu anderen Tumoren spielen *RAS*-Mutationen selbst bei Brustkrebs insgesamt jedoch eher eine untergeordnete Rolle (TCGAN, 2012; Pascual & Turner, 2019). Allerdings könnten Basal-Like Zelllinien auch ohne entsprechende Mutationen eine stärker *RAS*-zentrierte Signalgebung besitzen (Hoeflich et al., 2009; Mirzoeva et al., 2009). Bei Fritsch et al. (2014) war die PI3K-Inhibition durch Alpelisib bei verschiedenen Zelllinien (nicht BT-20) trotz gleichzeitig bestehender *K-RAS*-Mutation jedoch nicht beeinträchtigt, die Autor:innen hatten hierfür aber keine abschließende Erklärung. Etwaige Alterationen des MAP-Kinase-Signalweges oder diesen Signalweg stimulierende Mutationen (*MAP3K1*) könnten daher womöglich stärker ins Gewicht fallen, wenn zusätzlich eine *PIK3CA*-Mutation vorliegt.

In klinischen Studien sprachen Patient:innen bzw. deren Gewebeproben mit Koexistenz einer *PIK3CA*- und *K-RAS*-Mutation nicht auf eine Hemmung im PI3K-Signalweg an (Janku et al., 2013; Mayer et al., 2017), wohingegen *PIK3CA*-Mutationen ansonsten als am besten geeignete Prädiktoren für ein Therapieansprechen auf PI3K-Inhibition angesehen werden (Bertho et al., 2021; Brandão et al., 2019; Fritsch et al., 2014; Janku et al., 2013; Rugo et al., 2023). Mosele et al. (2020) zeigten einen Zusammenhang zwischen dem gemeinsamen Auftreten von *PIK3CA*- und *MAP3K1*-Mutation in der Population der SAFIR02-Studie auf, wodurch die selektive PI3K-Inhibition kompromittiert wurde. Die Assoziation von *PIK3CA*- und *MAP3K1*-Mutation kann für das Ansprechen auf eine Behandlung mit Alpelisib daher als relevant erachtet werden (Mosele et al., 2020).

Allerdings sind keine Mutationen im MAP-Kinase-Signalweg oder von *MAP3K1* für die Zelllinie BT-20 beschrieben (Torbett et al., 2008), was die Option einer primären Resistenz gegen Alpelisib auf Basis einer vorbestehenden Mutation eher unwahrscheinlich erscheinen lässt. De novo Mutationen können jedoch nicht ausgeschlossen werden. Der MAP-Kinase-Signalweg könnte auch ohne Mutation als Escapemechanismus ein therapeutisches Ansprechen auf PI3K-Hemmung kompromittieren (Brandão et al., 2019; Hoeflich et al., 2009; Mirzoeva et al., 2009; Sos et al., 2009). Bei Veränderungen des MAP-Kinase-Signalweges würde die alleinige Behandlung mit einer zielgerichteten Inhibition des PI3K-Signalweges daher als eher nicht erfolgversprechend angesehen werden (Janku et al., 2013; Millis et al., 2016). Die Kombination einer (nicht selektiven) PI3K-Hemmung mit MEK-Inhibition zeigte für Basal-Like Subtypen (*RAS*-zentrierte Signalgebung) in der Tat einen synergistischen Effekt *in vitro* und im Mausmodell (Hoeflich et al., 2009; Mirzoeva et al., 2009). Ferner unterstützten Mosele et al. (2020) die Kombination von PI3K-Inhibition mit MEK-Inhibition bei *MAP3K1*-Mutation.

Neben *PIK3CA* könnte auch der *MAP3K1*-Status mit konsekutiver Stimulierung des MAP-Kinase-Signalweges bei Mutation als Prädiktor für ein Ansprechen einer PI3K-Inhibition dienen (Avivar-Valderas et al., 2018; Mosele et al., 2020). Das etwaige Bestehen einer *RAS*-Mutation könnte ebenfalls berücksichtigt werden, wenngleich bei Brustkrebs von geringerer Bedeutung, aber aufgrund von Interferenzen der Signalwege evtl. dennoch interessant.

Möglicherweise wurde das Migrationsverhalten von BT-20 über einen alternativen Signalweg im Sinne eines Escapemechanismus bei den niedrig gewählten Wirkstoffkonzentrationen sowohl von Alpelisib als auch von metronomisch dosiertem VRL aufrechterhalten.

6.7.2. MDA-MB-231

Die Migration der MDA-MB-231 nach Behandlung mit 100 ng/ml Alpelisib war in zwei von vier Versuchsdurchgängen mit 112 % bzw. 114 % oberhalb der Kontrolle. Zum einen kann dies an statistischer Schwankung liegen. Zum anderen besteht die Option, dass eine bekannte *RAS*-Mutation (Torbett et al., 2008) für das Migrationsverhalten zumindest mitverantwortlich war, da die MAP-Kinase-Kaskade Zellfunktionen wie u. a. Migration, und damit auch Metastasierung, fördert (Avivar-Valderas et al., 2018; Mirzoeva et al., 2009; Molina & Adjei, 2006). In verschiedenen Brustkrebszelllinien waren die ERK1/2-Konzentrationen erhöht, wenn es sich um für PI3K-Signalweg-Inhibition resistente Zelllinien handelte (Avivar-Valderas et al., 2018; Brachmann et al., 2009; Weigelt et al., 2011). Konkret provozierten unterschiedliche in den PI3K-Signalweg eingreifende Substanzen bei Brachmann et al. (2009) keinen hemmenden Effekt auf MDA-MB-231. Dies würde jedoch bedeuten, dass sich die verwendeten MDA-MB-231 in ihrer molekularen Ausgestaltung möglicherweise unterscheiden (Zunahme der Migration in zwei von vier Versuchsdurchgängen). Dies ist eher nicht anzunehmen, da alle in Kultur genommenen MDA-MB-231 auf dieselbe kryokonservierte Zelllinie zurückgingen.

Inzidentelle Neumutationen im Verlauf können rückwirkend betrachtet jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden. Zudem könnte der postulierte Escapemechanismus nicht in allen Versuchsdurchgängen mit vollständiger Penetranz eine Rolle gespielt haben.

MDA-MB-231 ist *PIK3CA*-WT konfiguriert und ein Effekt des Alpelisibs war konzeptionell daher eher nicht zu erwarten. Unter 100 ng/ml Alpelisib könnte MDA-MB-231 dennoch einen Selektionsdruck erfahren und über die beschriebene *RAS*-Mutation einen Escapemechanismus genutzt haben, sodass die Migration im Vergleich zur Kontrolle sogar leicht zunahm.

6.8. Zusammenfassende Bewertung der verwendeten Zelllinien

Die Zunahme des VRL-Effekts im Zeitverlauf auf die Viabilität von **BT-549** und **MDA-MB-231** in der vorliegenden Arbeit lässt auf die Zeitkomponente der niedrig dosierten Behandlung schließen und entspricht dem mechanistischen Gedanken der MCT. Auch bei HUVEC konnten Biziota et al. (2016; 2017) zeigen, dass sich die IC_{50} bei längerer Behandlungsdauer reduziert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind ebenso vereinbar mit Untersuchungen anderer Autor:innen zu diesen Zelllinien (Cerrito et al., 2018; Cerrito et al., 2020). Obwohl MDA-MB-231 und BT-549 dem Subtyp Basal-Like zuzuordnen sind, sprachen diese in der vorliegenden Arbeit nach sieben Tagen Behandlung den luminalen Zelllinien (MCF-7, T-47D) vergleichbar auf metronomisches VRL an, was für Situationen mit TNBC günstig erscheint. Ferner wurde die Migration von MDA-MB-231 in der vorliegenden Arbeit konsistent zu den anderen Assays durch die MCT relevant gehemmt. Wenngleich klinische Studien zur MCT bei TNBC ein günstiges Toxizitätsprofil zeigten, sind die Outcomedaten im Vergleich zu anderen Tumorsubtypen jedoch nach wie vor nicht zufriedenstellend. Es mangelt an adäquaten Therapieregimen für dieses Kollektiv (Foulkes et al., 2010; Gennari et al., 2021).

Die *PIK3CA*-WT-Konfiguration bei **BT-549** und **MDA-MB-231** stellt eher keine veritable Zielstruktur für Alpelisib dar. Bei Morgillo et al. (2017) zeigte sich die Zelllinie MDA-MB-231 bei der Kombination des semi-selektiven PI3K-Inhibitors Taselisib mit VRL und anderen Chemotherapeutika ebenfalls unbeeinflusst. Die Targetierung von *PIK3CA*-WT konfigurierten Zelllinien (z. B. BT-549, MDA-MB-231) und konsekutiv der entsprechenden Tumoren im klinischen Umfeld scheint durch das Wegfallen von Pan-PI3K-Inhibitoren aufgrund ihrer Toxizität eher nicht möglich (Dent et al., 2021; Di Leo et al., 2018; Fuso et al., 2022). MDA-MB-231 und BT-549 reagierten in der vorliegenden Arbeit in ihrer Viabilität zwar auf Alpelisib, allerdings erst bei der höchsten gewählten Konzentration von 1.000 ng/ml. Außerdem zeigten sich die Proliferation und Migration von MDA-MB-231 durch Alpelisib unbeeinflusst. Eine bestehende *K-RAS*-Mutation bei MDA-MB-231 (Brachmann et al., 2009; Torbett et al., 2008) könnte aufgrund einer Verzahnung der Signalwege interferierende Eigenschaften besitzen. Die Viabilität von BT-549 wurde in der vorliegenden Arbeit zwar bereits bei 500 ng/ml Alpelisib

etwas gehemmt. Dies könnte jedoch im Zusammenhang mit einer etwaigen Zytotoxizität des Lösungsmittels DMSO stehen. Zudem existiert eine *PTEN*-Mutation (Hollestelle et al., 2010; Torbett et al., 2008; Weigelt et al., 2011), welche aufgrund des antagonistischen Wirkprinzips zu PI3K von Relevanz sein könnte. Allerdings wäre in diesem Fall eher mit einer Resistenz gegen Alpelisib zu rechnen gewesen (Juric et al., 2015; Ni et al., 2012; Torbett et al., 2008).

MCF-7 und **T-47D** sprachen in der vorliegenden Arbeit auf metronomisches VRL mit einer Zunahme des Effekts im Zeitverlauf (Viabilität) relevant an. Zudem lassen die in der vorliegenden Arbeit gezeigten synergistischen Effekte (Viabilität und Proliferation) von niedrig dosiertem VRL plus Alpelisib auf MCF-7 und T-47D möglicherweise auch auf eine etwaige Wirksamkeit beider Wirkstoffe in Kombination in der klinischen Anwendung schließen, wobei auch MCT in Kombinationsregimen mehr unerwünschte Wirkungen zeigen als Monotherapien (Lien et al., 2013; Y. Liu et al., 2017). Im Unterschied zu konventionellen Chemotherapien ist die MCT jedoch eher mit einem günstigen Toxizitätsprofil versehen (Cazzaniga et al., 2022; Krajnak et al., 2022; Lien et al., 2013; J. Liu et al., 2022; Y. Liu et al., 2017). Die größte Reduktion im Migrationsverhalten durch die MCT in der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls bei der luminalen Zelllinie MCF-7 beobachtet werden.

Als relevantester Prädiktor für ein Ansprechen von Alpelisib kann am ehesten eine bestehende *PIK3CA*-Mutation betrachtet werden (Bertho et al., 2021; Brandão et al., 2019; Fritsch et al., 2014; Rugo et al., 2023). **MCF-7** und **T-47D** besitzen jeweils eine Mutation für *PIK3CA* und sind den luminalen Subtypen zuzuordnen (Dai et al., 2017; Hollestelle et al., 2007; Jiang et al., 2016; Kao et al., 2009; Lacroix & Leclercq, 2004; Torbett et al., 2008). Für diese Subtypen ist ein besseres Ansprechen auf PI3K-Inhibition beschrieben als für Basal-Like (Hoeflich et al., 2009; Mirzoeva et al., 2009; Torbett et al., 2008). Des Weiteren ist auch die klinische Prognose für lumbale Subtypen günstiger als für Basal-Like (Foulkes et al., 2010; Harbeck & Gnant, 2017). Insofern könnten MCF-7 und T-47D eine eher günstige molekulare Ausstattung besitzen, um auf die Kombination von metronomisch dosiertem VRL und Alpelisib relevant anzusprechen. Allerdings sind die beschriebenen Nebenwirkungen von Alpelisib (u. a. Hyperglykämie bis Ketoazidose, Hautaffektionen) nach Einführung im klinischen Umfeld als relevant zu bewerten (Alaklabi et al., 2022; Chen et al., 2021; Ziegengeist et al., 2024). Da Alpelisib in Kombination mit der VRL-basierten MCT in der vorliegenden Arbeit jedoch auch schon bei geringeren als den gemessenen Alpelisib-Serumkonzentrationen von Personen unter Alpelisib-Behandlung (Juric et al., 2018; Rodón et al., 2018) synergistische Effekte zeigte, könnte diese Kombination als Therapieoption bei MBC evtl. in Betracht gezogen werden. Zudem führen sowohl eine VRL-basierte MCT (plus Letrozol) als auch eine PI3K-Inhibition möglicherweise zu einer Verschiebung des molekularen Subtyps hin zu einer Östrogen-orientierten Genexpression (Adamo et al., 2019; Bosch et al., 2015). Während eine Resistenz gegen PI3K-Inhibition u. a. durch eine Steigerung der HR-Signalgebung erklärt wird

(Bosch et al., 2015; Razavi et al., 2020), kann durch die Kombination von Alpelisib mit einer anti-Hormonbehandlung dem Tumorwachstum evtl. (wieder) effektiv entgegengewirkt werden (Bosch et al., 2015; Ciruelos Gil, 2014). Zusätzliche Mutationen des ER-Gens *ESR1* führten bei Razavi et al. (2020) jedoch zu einer Therapieresistenz unter Behandlung mit Alpelisib und Letrozol. Im Unterschied dazu wurden die CBR und das PFS unter Alpelisib-Monotherapie bei Savas et al. (2022) durch das gleichzeitige Bestehen einer *ESR1*-Mutation sogar signifikant verbessert. Unabhängig von diesen divergierenden Erkenntnissen sind jedoch keine basalen *ESR1*-Mutationen für MCF-7 und T-47D bekannt. Durch die Kombination einer MCT mit PI3K-Inhibition ergäbe sich jedoch auf Basis der etwaigen Genexpressionsverschiebungen möglicherweise ein prognostisch günstigerer Tumorsubtyp und ein verbessertes Ansprechen auf die (kombinierte) Behandlung mit Alpelisib und metronomisch dosiertem VRL.

Unerwarteterweise sprach **ZR-75-1** in der vorliegenden Arbeit bereits bei einer sehr niedrigen Alpelisib-Konzentration von 100 ng/ml mit einer Hemmung der Migration an, im Unterschied zu MDA-MB-231. Der Effekt verstärkte sich bei der Kombination mit metronomisch dosiertem VRL sichtbar. Die Zelllinie ist dem luminalen Subtyp zuzuordnen und besitzt keine *PIK3CA*-Mutation, dafür jedoch eine *PTEN*-Mutation (Bachman et al., 2004; Dai et al., 2017; Hoeflich et al., 2009; Hollestelle et al., 2007; Hollestelle et al., 2010; Jiang et al., 2016; Kao et al., 2009; Lacroix & Leclercq, 2004; Weigelt et al., 2011). MDA-MB-231 besitzt ebenfalls keine *PIK3CA*-Mutation, gehört allerdings dem Subtyp Basal-Like an (Dai et al., 2017; Jiang et al., 2016; Kao et al., 2009; Lacroix & Leclercq, 2004). Die Zuordnung der Zelllinie ZR-75-1 zu Luminal A mit der Konstellation *PIK3CA*-WT und *PTEN*-Mutation sowie die Überlegung, dass *PTEN*-Veränderungen an sich häufiger mit dem Subtyp Basal-Like assoziiert sind (Brachmann et al., 2009; TCGAN, 2012; Lokuhetty et al., 2019), lassen die molekulare Konstellation von ZR-75-1 möglicherweise als eher unüblich erscheinen. Tendenziell wurde bei einer *PTEN*-Mutation ansonsten eher ein Wirkverlust von Alpelisib beobachtet (Juric et al., 2015; Ni et al., 2012; Torbett et al., 2008). Des Weiteren wird die Annahme unterstützt, dass das Ansprechen auf Interventionen im PI3K-Signalweg zwischen den Tumorsubtypen variiert (Hoeflich et al., 2009; Mirzoeva et al., 2009; Torbett et al., 2008). Die Migration von ZR-75-1 wurde in der vorliegenden Arbeit durch die MCT etwas weniger stark gehemmt im Vergleich zu der luminalen Zelllinie MCF-7.

BT-20 sprach im Unterschied zu MCF-7 und T-47D hingegen kaum auf (niedrige) VRL- und Alpelisib-Konzentrationen im Migrations-Assay an, was vor dem Hintergrund einer bestehenden *PIK3CA*-Mutation (Hollestelle et al., 2007; Saal et al., 2005; Torbett et al., 2008; Wu et al., 2005) zunächst nicht erwartungsgemäß erscheint. Allerdings ist BT-20 dem prognostisch ungünstigeren Subtyp Basal-Like zuzuordnen (Dai et al., 2017; Jiang et al., 2016; Kao et al., 2009; Lacroix & Leclercq, 2004). Im Unterschied zu den luminalen Subtypen treten *PIK3CA*-Mutationen bei Basal-Like/TNBC etwas seltener auf, dennoch sind sie eine der

häufigsten Alterationen auch bei TNBC (Brachmann et al., 2009; TCGAN, 2012; Martínez-Sáez et al., 2020; Xiao et al., 2021). Der PI3K-Signalweg könnte möglicherweise insgesamt eine eher untergeordnete Rolle spielen, während andere Mechanismen (MAP-Kinase-Kaskade) für die Aufrechterhaltung der Zellfunktionen stärkere Gewichtung erlangen würden (Mirzoeva et al., 2009). Interferierende *PTEN*-Mutationen oder Veränderungen im MAP-Kinase-Signalweg sind nicht auszuschließen. Außerdem besteht auch ohne Mutation im MAP-Kinase-Signalweg evtl. eine eher *RAS*-zentrierte Signalgebung bei triple-negativen Zelllinien, welche sich einer den luminalen Zelllinien vergleichbaren, effektiven PI3K-Inhibition stärker entziehen könnten (Hoeflich et al., 2009; Mirzoeva et al., 2009). Ein Nichtansprechen auf PI3K-Inhibition bei gleichzeitiger Mutation von *MAP3K1* (jedoch nicht bekannt für BT-20) wurde zudem beschrieben (Avivar-Valderas et al., 2018; Mosele et al., 2020). Für BT-20 ist neben der verbreiteten H1047-Mutation eine P539R-Mutation bekannt (Saal et al., 2005; Torbett et al., 2008). Möglicherweise ist die konkrete *PIK3CA*-Mutation ebenfalls relevant für den therapeutischen Erfolg, wie bereits bei Janku et al. (2013) abzuleiten ist. Die Mutationstypen von BT-20 mit H1047R (P539R) und MCF-7 mit E545K unterscheiden sich bspw. ebenfalls, wobei zu berücksichtigen ist, dass sie auch verschiedenen Tumorsubtypen angehören (Hoeflich et al., 2009; Torbett et al., 2008). Ob Zellen mit *PIK3CA*-Doppelmutationen möglicherweise besser auf Alpelisib ansprechen, bleibt unklar (Rugo et al., 2023; Vitale et al., 2021). Zudem reagierte BT-20 im Unterschied zu MDA-MB-231 nicht relevant auf die MCT mit 1,25 ng/ml VRL. Die sehr niedrig gewählte Konzentration von VRL könnte damit zusammenhängen. VRL-Serumkonzentrationen von Patient:innen in Dosisfindungsstudien waren eher höher (Briasoulis et al., 2013; Briasoulis et al., 2009). Bei einer perspektivischen Austestung (n=2) jeweils höherer Alpelisib- und VRL-Konzentrationen in der vorliegenden Arbeit für die *PIK3CA*-mutierte Zelllinie BT-20 waren jedoch stärkere Effekte in der Migrationshemmung feststellbar, sodass die kombinierte Behandlung auch bei BT-20 Wirkung zeigte.

6.9. Fazit

Metronomisches VRL war in den durchgeführten Experimenten in der Lage, die Viabilität, Proliferation und Migration von MCF-7, T47-D, MDA-MB-231, BT-549, ZR-75-1 und BT-20 zu hemmen. Für die Viabilität konnte gezeigt werden, dass eine längere Behandlungsdauer auch einen stärker hemmenden Effekt erzielte, was eher dem mechanistischen Gedanken der MCT entspricht. Zwischen Luminal und Basal-Like waren bei der Viabilität eher keine ausgeprägten Unterschiede feststellbar. Für die Proliferation waren die Ergebnisse insgesamt heterogener, insbesondere aufgrund der größeren Standardabweichung bei MCF-7. Für die Migration kann tendenziell geschlussfolgert werden, dass ein luminaler Subtyp eher eine Hemmung durch die metronomische Chemotherapie erwarten lässt, wohingegen der Subtyp Basal-Like (v. a. BT-20) in den Versuchen höhere Konzentrationen erforderlich machte. Wichtigster Prädiktor

sowohl für das Ansprechen von Alpelisib (auch in niedrigen Konzentrationen) als auch für die gezeigten synergistischen Effekte war der *PIK3CA*-Mutationsstatus, wobei auch ZR-75-1 mit *PIK3CA*-WT in der Migration gehemmt werden konnte und die luminale Konfiguration hierfür evtl. mit eine Rolle spielte. Zwar waren je nach verwendeter Zelllinie unterschiedliche Wirkstoffkombinationen am geeignetsten, Kombinationseffekte zeigten sich meist bei Kombinationen von 10-100 ng/ml Alpelisib plus 1,25-2,5 ng/ml VRL.

Für das therapeutische Ansprechen bei einem metronomischen Design mit VRL und Alpelisib scheinen die Konzentrationen der Wirkstoffe, die Behandlungsdauer, der molekulare Subtyp, der *PIK3CA*-Status und vermutlich weitere Faktoren (z. B. weitere genetische Alterationen, Versuchsbedingungen) von Bedeutung zu sein.

Zu den Mechanismen der MCT besteht weiterer Forschungsbedarf (Cazzaniga et al., 2022; Cazzaniga et al., 2019b; Pepe et al., 2022). Auch geeignete Biomarker und die OBD, wengleich bereits kurz nach Aufkommen des MCT-Konzepts beforscht, stehen nach wie vor aus (Cazzaniga et al., 2022; Munoz et al., 2005; Shaked et al., 2005). Ferner gibt es für das evtl. günstigste Therapieregime bisher keinen Konsens (Freyer et al., 2024; Krajnak et al., 2022; Montagna et al., 2022). Trotz der kürzlich publizierten Ergebnisse zur Tempo Breast-Studie (EudraCT Nummer 2014-003860-19) besteht sogar innerhalb einzelner Wirkstoffe (VRL) noch Forschungsbedarf bzgl. des idealen Applikationsplans (Freyer et al., 2024). Zudem ist sowohl für die XeNa- (Brems-Eskildsen et al., 2021) als auch für die METEORA-II- (Munzone et al., 2023) und für die Tempo Breast-Studie (Freyer et al., 2024) trotz der gezeigten Effektivität der MCT-Designs (mit VRL) zu berücksichtigen, dass Patientinnen mit Vorbehandlung eines CDK4/6-Inhibitors (noch) unterrepräsentiert waren. Da diese Therapeutika bei (HR_{pos}) MBC mittlerweile zu den Optionen erster Wahl zählen, bleibt abzuwarten, welche Ergebnisse zukünftige MCT-Studien nach Versagen von CDK4/6-Inhibitoren erzielen werden.

Die PI3K-Inhibition mit Alpelisib ist für postmenopausale Patient:innen mit HR_{pos}/HER2_{neg} MBC und *PIK3CA*-Mutation in Kombination mit Fulvestrant nach Krankheitsprogression unter Erstlinientherapie mit einem Aromatase-Inhibitor zugelassen (Gennari et al., 2021). Aktuell erfolgt in der Phase III EPIK-B5-Studie (NCT05038735) eine weitere Erforschung dieses Therapieregimes (De Laurentiis et al., 2022). Dies ist von Interesse, da CDK4/6-Inhibitoren mittlerweile zu den therapeutischen Optionen erster Linie gehören und die Effektivität von Alpelisib nach Versagen von CDK4/6-Inhibitoren bisher nur bedingt evaluiert wurde (De Laurentiis et al., 2022; Rugo et al., 2021). Außerdem wird die Kombination von Alpelisib mit Paclitaxel bei TNBC evaluiert (NCT04216472, NCT04251533 EPIK-B3), jedoch nicht in einem metronomischen Design.

Therapeutische Anstrengungen können zu einer Verbesserung der Lebensqualität durch Reduktion von Nebenwirkungen der Therapie beitragen. Die MCT sowie die zielgerichtete Therapie im PI3K-Signalweg könnten in Kombination bei MBC möglicherweise einen zusätzlichen Baustein darstellen.

6.10. Ausblick

Die Zellkulturversuche erfolgten in Monokultur. Um Tumorgewebe im experimentellen Umfeld authentischer zu reproduzieren, könnten Versuche in Co-Kultur mit Fibroblasten und Endothelzellen als Sphäroid-Modell geeignet sein. Sphäroide bilden die an Bedeutung gewinnende Tumor-Mikroumgebung besser ab (Reynolds et al., 2017; Saraiva et al., 2020; Zanoni et al., 2016). Diese Tumor-Mikroumgebung erscheint speziell für die Effekte der MCT (Angiogenese, Immunmodulation) relevant und ist in einer Monokultur nicht gleichermaßen simulierbar.

Die Wirkstoffe wurden den Zellen in einem parallelen Behandlungsregime hinzugegeben. Möglicherweise würde sich das Verhalten der Brustkrebszellen ändern, wenn die Gabe in sequenzieller Abfolge stattfände. Dies ist insofern relevant, als dass es bisher keinen Konsens über das ideale Vorgehen im Bereich der MCT gibt (Krajnak et al., 2022; Montagna et al., 2022).

Da *PIK3CA*-Mutationen auch bei anderen gynäkologischen Tumoren häufig auftreten (Millis et al., 2019), könnte die Kombination von Alpelisib mit einer MCT auch für diese Tumorentitäten (z. B. Ovarial-/Endometriumkarzinom) von Relevanz sein.

Des Weiteren sollten bei zukünftigen Projekten Veränderungen in anderen Signalwegen bzw. weitere genetische Konstellationen stärkere Berücksichtigung finden, sodass die selektive Hemmung der p110 α -Isoform von PI3K nicht ausschließlich im Hinblick auf das Vorhandensein von *PIK3CA*-Mutationen beurteilt würde. Eine Vorabtestung auf andere mit dem PI3K-Signalweg assoziierte Mutationen könnte hilfreich sein. Insbesondere Querverbindungen zum MAP-Kinase-Signalweg, *MAP3K1*-Mutationen, *ESR1*-Mutationen und besonders der Einfluss von *PTEN*-Mutationen sollten für Escapemechanismen und die Isoform-bezogene PI3K-Aktivität evtl. stärker beachtet werden. Allerdings ist der *PIK3CA*-Status bisher der einzige gesicherte Prädiktor, um ein Ansprechen auf Alpelisib/PI3K-Inhibition abzuschätzen (Bertho et al., 2021; Brandão et al., 2019; Fritsch et al., 2014; Janku et al., 2013).

Die Verträglichkeit und grundlegende Wirksamkeit einer Kombination aus metronomisch dosiertem VRL plus Alpelisib könnte evtl. in einer klinischen Studie evaluiert werden. Es liegen Erkenntnisse vor, dass MCT-Regime auch bei TNBC wirksam sind (Cazzaniga et al., 2016b;

Dellapasqua et al., 2008; Montagna et al., 2012), sodass die Anwendung dieses Therapieregimes auch auf diesen Subtyp hin evaluiert werden könnte.

7. Zusammenfassung

Brustkrebs ist die häufigste Tumorerkrankung bei Frauen in Deutschland. Insbesondere nach Metastasierung stehen die Lebenszeitverlängerung sowie die Erhaltung einer angemessenen Lebensqualität im Vordergrund. Hierzu gehört auch das Limitieren von Nebenwirkungen der Therapie. Des Weiteren ist die Evaluierung neuer Therapieregime und Wirkstoffkombinationen aufgrund der Entwicklung von Resistenzen im Verlauf der Behandlung von Interesse.

Zur Reduktion von Toxizitäten kommt bei MBC neben einer konventionellen Chemotherapie auch eine MCT in Betracht. Diese zeigte in vielen Studien zu MBC bei gegebener klinischer Aktivität ein günstiges Toxizitätsprofil. Ferner ergänzen zielgerichtete Therapeutika bisherige Behandlungssäulen. In diesem Kontext finden sich *PIK3CA*-Mutationen im zugehörigen PI3K-Signalweg bei Brustkrebs häufig. Diese fördern die Entstehung von Therapieresistenzen und beeinträchtigen das Outcome. Eine zielgerichtete Therapie der relevanten PI3K-Isoform p110 α erscheint daher vielversprechend. Studien zu Apelisib zeigten durchaus eine Verbesserung der klinischen Outcomeparameter durch Apelisib.

Zur Reduktion von Nebenwirkungen der Therapie und zur Ausnutzung etwaiger synergistischer Effekte könnte daher die Kombination von metronomisch dosiertem VRL mit dem selektiven PI3K-Inhibitor Apelisib einen Ansatz bei MBC darstellen. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, einen Beitrag in diesem Forschungsbereich zu leisten. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Apelisib in Kombination mit niedrig dosiertem VRL auf das funktionale Verhalten von Brustkrebszellen untersucht.

Mit den Zelllinien MCF-7, T-47D, MDA-MB-231, BT-549, BT-20 und ZR-75-1 wurden nach metronomischer VRL-Behandlung die Viabilität (alamarBlue®), die Proliferation (BrdU-Inkorporation) und das Migrationsverhalten (Boydenkammer) bestimmt. Für VRL wurden Konzentrationen eingesetzt, welche den Serumkonzentrationen von Personen unter metronomischer VRL-Behandlung entsprechen (0,63-5 ng/ml). Für Apelisib wurde auf eine unter MTD-Therapie zu beobachtende Serumkonzentration zurückgegriffen (1.000 ng/ml) und zusätzlich noch weitere geringere Konzentrationen ausgewählt (10-500 ng/ml). Neben einer Betrachtung im Zeitverlauf für die Viabilität (drei vs. sieben Tage Behandlungsdauer), erfolgte die Berechnung der CI zur Exploration etwaiger synergistischer Effekte für den Viabilitäts- und den Proliferations-Assay. Auf Basis der Ergebnisse aus der Viabilität und der Proliferation wurde für den Migrations-Assay eine Auswahl an Dosierungen und Zelllinien getroffen und das Migrationsverhalten betrachtet.

Die Ergebnisse der Zellkulturversuche zeigen für die Kombination der beiden Wirkstoffe synergistische Effekte bei den *PIK3CA*-mutierten Zelllinien MCF-7 und T-47D (beide Luminal A) bzgl. der Hemmung von Viabilität und Proliferation. Es zeigte sich außerdem, dass

der Synergismus für die Viabilität im Zeitverlauf stärker ausgeprägt ist. Ferner traten synergistische Effekte auch in Kombination mit niedriger dosiertem Alpelisib (10-100 ng/ml) auf. Bei den Kontrollzelllinien MDA-MB-231 und BT-549 (beide Basal-Like) ohne *PIK3CA*-Mutation waren Hemmungen in der Viabilität und für MDA-MB-231 zusätzlich in der Proliferation weitgehend auf VRL zurückzuführen. Alpelisib zeigte keinen relevanten Einfluss. Die MCT entfaltete jedoch auch bei diesen triple-negativen Zelllinien eine hemmende Wirkung, welche die Viabilität im Zeitverlauf weiter senkte. Die Migration von MCF-7 wurde durch VRL (1,25 ng/ml) und die gewählte Alpelisib-Konzentration (100 ng/ml) gehemmt. Die kombinierte Gabe beider Wirkstoffe erzielte einen leicht größeren Effekt als VRL in Monobehandlung. Bei MDA-MB-231 war Alpelisib (100 ng/ml) nicht in der Lage, die Migration zu hemmen. Mit VRL (1,25 ng/ml) gelang dies. In Kombination beider Wirkstoffe wurden annähernd gleiche Resultate erzielt wie bei VRL in Monobehandlung. BT-20 (Basal-Like) weist eine *PIK3CA*-Mutation auf. Dennoch wurde die Migration durch Alpelisib (100 ng/ml) kaum gehemmt, ebenso durch VRL (1,25 ng/ml). In Kombination beider Wirkstoffe war der Effekt jedoch etwas stärker ausgeprägt, sodass eine leichte Tendenz zur gemeinsamen migrationshemmenden Wirkung besteht. Eine sich daran anschließende perspektivische Austestung jeweils höherer Konzentrationen der Wirkstoffe zeigte insbesondere für Alpelisib (500 ng/ml) und in Kombination beider Substanzen (2,5 ng/ml VRL) eine deutlich stärkere Migrationshemmung von BT-20, sodass auch bei TNBC mit *PIK3CA*-Mutation die kombinierte Behandlung perspektivisch eine Therapieoption darstellen könnte. Die Zelllinie ZR-75-1 (Luminal) ohne *PIK3CA*-Mutation wurde unerwarteterweise durch die niedrig gewählte Alpelisib-Konzentration (100 ng/ml) in der Migration etwas gehemmt. In Kombination beider Wirkstoffe verstärkte sich der Effekt etwas mehr.

Bei gegebener Zielstruktur für Alpelisib könnte die Kombination dieser zielgerichteten Therapie mit metronomisch dosiertem VRL evtl. eine klinische Wirksamkeit bei Patient:innen mit MBC zeigen. Zudem könnte der toxizitätsreduzierte Ansatz der MCT in Kombination mit einem evtl. dosisreduzierten Vorgehen auch für Alpelisib eine nebenwirkungsärmere therapeutische Option darstellen. Es ergäbe sich dadurch möglicherweise eine Ergänzung des bisherigen Therapieportfolios bei MBC, v. a. nach Ausbildung von Resistenzen gegen vorangeschaltete Therapien.

8. Literaturverzeichnis

- Adamo, B., Bellet, M., Paré, L., Pascual, T., Vidal, M., Pérez Fidalgo, J. A., Blanch, S., Martínez, N., Murillo, L., Gómez-Pardo, P., López-González, A., Amillano, K., Canes, J., Galván, P., González-Farré, B., González, X., Villagrasa, P., Ciruelos, E. M., & Prat, A. (2019). Oral metronomic vinorelbine combined with endocrine therapy in hormone receptor-positive HER2-negative breast cancer: Solti-1501 VENTANA window of opportunity trial. *Breast Cancer Research*, *21*(1), 108. <https://doi.org/10.1186/s13058-019-1195-z>
- Ahmed, S. A., Gogal, R. M., & Walsh, J. E. (1994). A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: An alternative to [³H]thymidine incorporation assay. *Journal of Immunological Methods*, *170*(2), 211–224. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90396-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90396-4)
- Alaklabi, S., Roy, A. M., Attwood, K., George, A., O'Connor, T., Early, A., Levine, E. G., & Gandhi, S. (2022). Real world outcomes with alpelisib in metastatic hormone receptor-positive breast cancer patients: A single institution experience. *Frontiers in Oncology*, *12*, 1012391. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1012391>
- Al-Mahmood, S., Sapiezynski, J., Garbuzenko, O. B., & Minko, T. (2018). Metastatic and triple-negative breast cancer: Challenges and treatment options. *Drug Delivery and Translational Research*, *8*(5), 1483–1507. <https://doi.org/10.1007/s13346-018-0551-3>
- Amadori, D., Koralewski, P., Tekiela, A., Ruiz Simon, A., Llombart, A., Sommer, H., Schindlbeck, C., Maheut, L., & Lafaye de Micheaux, S. (2001). Efficacy and safety of navelbine oral (NVBO) in first line metastatic breast cancer (MBC). *European Journal of Cancer*, *37*, Article S195. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(01\)81205-3](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(01)81205-3)
- André, F., Ciruelos, E. M., Juric, D., Loibl, S., Campone, M., Mayer, I. A., Rubovszky, G., Yamashita, T., Kaufman, B., Lu, Y.-S., Inoue, K., Pápai, Z., Takahashi, M., Ghaznawi, F., Mills, D., Kaper, M., Miller, M., Conte, P. F., Iwata, H., & Rugo, H. S. (2021). Alpelisib plus fulvestrant for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer: Final overall survival results from SOLAR-1. *Annals of Oncology*, *32*(2), 208–217. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.11.011>
- André, F., Ciruelos, E. M., Rubovszky, G., Campone, M., Loibl, S., Rugo, H. S., Iwata, H., Conte, P. F., Mayer, I. A., Kaufman, B., Yamashita, T., Lu, Y.-S., Inoue, K., Takahashi, M., Pápai, Z., Longin, A. S., Mills, D., Wilke, C., Hirawat, S., & Juric, D. (2019). Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, *380*(20), 1929–1940. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1813904>
- André, N., Tsai, K., Carré, M., & Pasquier, E. (2017). Metronomic Chemotherapy: Direct Targeting of Cancer Cells after all? *Trends Cancer*, *3*(5), 319–325. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.03.011>
- Avivar-Valderas, A., McEwen, R., Taheri-Ghahfarokhi, A., Carnevalli, L. S., Hardaker, E. L., Maresca, M., Hudson, K., Harrington, E. A., & Cruzalegui, F. (2018). Functional significance of co-occurring mutations in PIK3CA and MAP3K1 in breast cancer. *Oncotarget*, *9*(30), 21444–21458. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25118>
- Bachman, K. E., Argani, P., Samuels, Y., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Konishi, H., Karakas, B., Blair, B. G., Lin, C., Peters, B. A., Velculescu, V. E., & Park, B. H. (2004). The PIK3CA Gene is Mutated with High Frequency in Human Breast Cancers. *Cancer Biology & Therapy*, *3*(8), 772–775. <https://doi.org/10.4161/cbt.3.8.994>
- Badinloo, M., & Esmaeili-Mahani, S. (2014). Phosphatidylinositol 3-kinases inhibitor LY294002 potentiates the cytotoxic effects of doxorubicin, vincristine, and etoposide in a panel of cancer cell lines. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, *28*(4), 414–422. <https://doi.org/10.1111/fcp.12043>
- Bally, R. W., & Gribnau, T. C. (1989). Some Aspects of the Chromogen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine as Hydrogen Donor in a Horseradish Peroxidase Assay.

- Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 27(10), 791–796.
<https://doi.org/10.1515/ccim.1989.27.10.791>
- Batalini, F., Xiong, N., Tayob, N., Polak, M., Eismann, J., Cantley, L. C., Shapiro, G. I., Adalsteinsson, V., Winer, E. P., Konstantinopoulos, P. A., D'Andrea, A., Swisher, E. M., Matulonis, U. A., Wulf, G. M., & Mayer, E. L. (2022). Phase 1b Clinical Trial with Alpelisib plus Olaparib for Patients with Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 28(8), 1493–1499.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-3045>
- Berenbaum, M. C. (1977). Synergy, additivism and antagonism in immunosuppression. A CRITICAL REVIEW. *Clinical and Experimental Immunology*, 28(1), 1–18.
- Berenbaum, M. C. (1978). A Method for Testing for Synergy with Any Number of Agents. *Journal of Infectious Diseases*, 137(2), 122–130.
<https://doi.org/10.1093/infdis/137.2.122>
- Bertho, M., Patsouris, A., Augereau, P., Robert, M., Frenel, J.-S., Blonz, C., & Campone, M. (2021). A pharmacokinetic evaluation of alpelisib for the treatment of HR+, HER2-negative, PIK3CA-mutated advanced or metastatic breast cancer. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 17(2), 139–152.
<https://doi.org/10.1080/17425255.2021.1844662>
- Bilanges, B., Posor, Y., & Vanhaesebroeck, B. (2019). Pi3k isoforms in cell signalling and vesicle trafficking. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(9), 515–534.
<https://doi.org/10.1038/s41580-019-0129-z>
- Biziota, E., Briasoulis, E., Mavroeidis, L., Marselos, M., Harris, A. L., & Pappas, P. (2016). Cellular and molecular effects of metronomic vinorelbine and 4-O-deacetylvinorelbine on human umbilical vein endothelial cells. *Anticancer Drugs*, 27(3), 216–224.
<https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000319>
- Biziota, E., Mavroeidis, L., Hatzimichael, E., & Pappas, P. (2017). Metronomic chemotherapy: A potent macerator of cancer by inducing angiogenesis suppression and antitumor immune activation. *Cancer Letters*, 400, 243–251.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.12.018>
- Bocci, G., & Kerbel, R. S. (2016). Pharmacokinetics of metronomic chemotherapy: A neglected but crucial aspect. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 13(11), 659–673.
<https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.64>
- Bonnier, F., Keating, M. E., Wróbel, T. P., Majzner, K., Baranska, M., Garcia-Munoz, A., Blanco, A., & Byrne, H. J. (2015). Cell viability assessment using the Alamar blue assay: A comparison of 2D and 3D cell culture models. *Toxicology in Vitro*, 29(1), 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.09.014>
- Bosch, A., Li, Z., Bergamaschi, A., Ellis, H., Toska, E., Prat, A., Tao, J. J., Spratt, D. E., Viola-Villegas, N. T., Castel, P., Minuesa, G., Morse, N., Rodón, J., Ibrahim, Y., Cortés, J., Perez Garcia, J. M., Galván, P., Grueso, J., Guzman, M., . . . Baselga, J. (2015). Pi3k inhibition results in enhanced estrogen receptor function and dependence in hormone receptor-positive breast cancer. *Science Translational Medicine*, 7(283), Article 283ra51. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa4442>
- Brachmann, S. M., Hofmann, I., Schnell, C., Fritsch, C., Wee, S., Lane, H., Wang, S., García-Echeverría, C., & Maira, S. M. (2009). Specific apoptosis induction by the dual PI3K/mTor inhibitor NVP-BEZ235 in HER2 amplified and PIK3CA mutant breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(52), 22299–22304. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905152106>
- Brandão, M., Caparica, R., Eiger, D., & Azambuja, E. de (2019). Biomarkers of response and resistance to PI3K inhibitors in estrogen receptor-positive breast cancer patients and combination therapies involving PI3K inhibitors. *Annals of Oncology*, 30(Suppl_10), x27–x42. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz280>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global Cancer Statistics 2018: Globocan Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424.
<https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Brems-Eskildsen, A.-S., Linnet, S., Danø, H., Luczak, A., Vestlev, P. M., Jakobsen, E. H., Neimann, J., Jensen, C. B., Dongsgaard, T., & Langkjer, S. T. (2021). Metronomic

- treatment of vinorelbine with oral capecitabine is tolerable in the randomized Phase 2 study XeNa including patients with HER2 non-amplified metastatic breast cancer. *Acta Oncologica*, 60(2), 157–164. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2020.1851045>
- Briasoulis, E., Aravantinos, G., Kouvatsas, G., Pappas, P., Bizioti, E., Sainis, I., Makatsoris, T., Varthalitis, I., Xanthakis, I., Vassias, A., Klouvas, G., Boukovinas, I., Fountzilas, G., Syrigos, K. N., Kalofonos, H., & Samantas, E. (2013). Dose selection trial of metronomic oral vinorelbine monotherapy in patients with metastatic cancer: A hellenic cooperative oncology group clinical translational study. *BMC Cancer*, 13, 263. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-263>
- Briasoulis, E., Pappas, P., Puozzo, C., Tolis, C., Fountzilas, G., Dafni, U., Marselos, M., & Pavlidis, N. (2009). Dose-Ranging Study of Metronomic Oral Vinorelbine in Patients with Advanced Refractory Cancer. *Clinical Cancer Research*, 15(20), 6454–6461. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0970>
- Burnette, S. E., Poehlein, E., Lee, H.-J., Force, J., Westbrook, K., & Moore, H. N. (2023). Evaluation of alpelisib-induced hyperglycemia prophylaxis and associated risk factors in PIK3CA-mutated hormone-receptor positive, human epidermal growth factor-2 negative advanced breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 197(2), 369–376. <https://doi.org/10.1007/s10549-022-06798-8>
- Burris, H. A. (2013). Overcoming acquired resistance to anticancer therapy: Focus on the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 71(4), 829–842. <https://doi.org/10.1007/s00280-012-2043-3>
- The Cancer Genome Atlas Network (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490, 61–70. <https://doi.org/10.1038/nature11412>
- Cantley, L. C. (2002). The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science*, 296(5573), 1655–1657. <https://doi.org/10.1126/science.296.5573.1655>
- Cardoso, F., Paluch-Shimon, S., Senkus, E., Curigliano, G., Aapro, M. S., André, F., Barrios, C. H., Bergh, J., Bhattacharyya, G. S., Biganzoli, L., Boyle, F., Cardoso, M. J., Carey, L. A., Cortés, J., El Saghir, N. S., Elzayat, M., Eniu, A., Fallowfield, L. J., Francis, P. A., . . . Winer, E. P. (2020). 5th ESO-ESMO international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC 5). *Annals of Oncology*, 31(12), 1623–1649. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.09.010>
- Cazzaniga, M. E., Biganzoli, L., Cortesi, L., Placido, S. de, Donadio, M., Fabi, A., Ferro, A., Generali, D., Lorusso, V., Milani, A., Montagna, E., Munzone, E., Orlando, L., Pizzuti, L., Simoncini, E., Zamagni, C., & Pappagallo, G. L. (2019a). Treating advanced breast cancer with metronomic chemotherapy: What is known, what is new and what is the future? *Oncotargets and Therapy*, 12, 2989–2997. <https://doi.org/10.2147/OTT.S189163>
- Cazzaniga, M. E., Camerini, A., Addeo, R., Nolè, F., Munzone, E., Collovà, E., Del Conte, A., Mencoboni, M., Papaldo, P., Pasini, F., Saracchini, S., & Bocci, G. (2016a). Metronomic oral vinorelbine in advanced breast cancer and non-small-cell lung cancer: Current status and future development. *Future Oncology*, 12(3), 373–387. <https://doi.org/10.2217/fon.15.306>
- Cazzaniga, M. E., Capici, S., Cordani, N., Cogliati, V., Pepe, F. F., Riva, F., & Cerrito, M. G. (2022). Metronomic Chemotherapy for Metastatic Breast Cancer Treatment: Clinical and Preclinical Data between Lights and Shadows. *Journal of Clinical Medicine*, 11(16). <https://doi.org/10.3390/jcm11164710>
- Cazzaniga, M. E., Cordani, N., Capici, S., Cogliati, V., Riva, F., & Cerrito, M. G. (2021a). Metronomic Chemotherapy. *Cancers*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/cancers13092236>
- Cazzaniga, M. E., Cortesi, L., Ferzi, A., Scaltriti, L., Cicchiello, F., Ciccarese, M., Della Torre, S., Villa, F., Giordano, M., Verusio, C., Nicolini, M., Gambaro, A. R., Zanlorenzi, L., Biraghi, E., Legramandi, L., & Rulli, E. (2016b). Metronomic chemotherapy with oral vinorelbine (mVNR) and capecitabine (mCAPE) in advanced HER2-negative breast cancer patients: Is it a way to optimize disease control? Final results of the VICTOR-2 study. *Breast Cancer Research and Treatment*, 160(3), 501–509. <https://doi.org/10.1007/s10549-016-4009-3>

- Cazzaniga, M. E., Dionisio, M. R., & Riva, F. (2017a). Metronomic chemotherapy for advanced breast cancer patients. *Cancer Letters*, *400*, 252–258. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.12.019>
- Cazzaniga, M. E., Munzone, E., Bocci, G., Afonso, N., Gómez-Pardo, P., Langkjer, S. T., Petru, E., Pivot, X., Sánchez Rovira, P., Wysocki, P., & Torri, V. (2019b). Pan-European Expert Meeting on the Use of Metronomic Chemotherapy in Advanced Breast Cancer Patients: The PENELOPE Project. *Advances in Therapy*, *36*(2), 381–406. <https://doi.org/10.1007/s12325-018-0844-4>
- Cazzaniga, M. E., Pinotti, G., Montagna, E., Amoroso, D., Berardi, R., Butera, A., Cagossi, K., Cavanna, L., Ciccarese, M., Cinieri, S., Cretella, E., Conciliis, E. de, Febbraro, A., Ferrà, F., Ferzi, A., Fiorentini, G., Fontana, A., Gambaro, A. R., Garrone, O., . . . Torri, V. (2019c). Metronomic chemotherapy for advanced breast cancer patients in the real world practice: Final results of the VICTOR-6 study. *Breast*, *48*, 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2019.07.006>
- Cazzaniga, M. E., Torri, V., Riva, F., Porcu, L., Cicchiello, F., Capici, S., Cortinovis, D., Digiacomo, N., & Bidoli, P. (2017b). Efficacy and safety of vinorelbine-capecitabine oral metronomic combination in elderly metastatic breast cancer patients: Victor-1 study. *Tumori*, *103*(1), e4-e8. <https://doi.org/10.5301/tj.5000543>
- Cazzaniga, M. E., Torri, V., Villa, F., Giuntini, N., Riva, F., Zeppellini, A., Cortinovis, D., & Bidoli, P. (2014). Efficacy and Safety of the All-Oral Schedule of Metronomic Vinorelbine and Capecitabine in Locally Advanced or Metastatic Breast Cancer Patients: The Phase I-II VICTOR-1 Study. *International Journal of Breast Cancer*, *2014*, 769790. <https://doi.org/10.1155/2014/769790>
- Cazzaniga, M. E., Vallini, I., Montagna, E., Amoroso, D., Berardi, R., Butera, A., Cagossi, K., Cavanna, L., Ciccarese, M., Cinieri, S., Cretella, E., Conciliis, E. de, Febbraro, A., Ferrà, F., Ferzi, A., Baldelli, A., Fontana, A., Gambaro, A. R., Garrone, O., . . . Torri, V. (2021b). Metronomic chemotherapy (mCHT) in metastatic triple-negative breast cancer (TNBC) patients: Results of the VICTOR-6 study. *Breast Cancer Research and Treatment*, *190*(3), 415–424. <https://doi.org/10.1007/s10549-021-06375-5>
- Cerrito, M. G., Giorgi, M. de, Pelizzoni, D., Bonomo, S. M., Digiacomo, N., Scagliotti, A., Bugarin, C., Gaipa, G., Grassilli, E., Lavitrano, M., Giovannoni, R., Bidoli, P., & Cazzaniga, M. E. (2018). Metronomic combination of Vinorelbine and 5Fluorouracil is able to inhibit triple-negative breast cancer cells. Results from the proof-of-concept VICTOR-0 study. *Oncotarget*, *9*(44), 27448–27459. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25422>
- Cerrito, M. G., Scagliotti, A., Grassilli, E., Lavitrano, M., & Cazzaniga, M. E. (2020). 1983P Metronomic combination of 5-fluorouracil plus vinorelbine limits endothelial and triple-negative breast cancer cells proliferation and migration and abolishes clonogenic survival. *Annals of Oncology*, *31*, S1111-S1112. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.08.1289>
- Chen, X [Xiao], Wei, L., Chi, L., Guo, X., Chen, C., Guo, Z [Zhijian], Liang, J [Jizhou], Zheng, Y., He, J., & Ye, X. (2021). Adverse events of apelisib: A postmarketing study of the World Health Organization pharmacovigilance database. *British Journal of Clinical Pharmacology*, *88*(5), 2180–2189. <https://doi.org/10.1111/bcp.15143>
- Cheung, Y.-M. M., Cromwell, G. E., Tolaney, S. M., Le Min, & McDonnell, M. E. (2022). Factors leading to apelisib discontinuation in patients with hormone receptor positive, human epidermal growth factor receptor-2 negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, *192*(2), 303–311. <https://doi.org/10.1007/s10549-021-06476-1>
- Chou, T.-C. (2006). Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacological Reviews*, *58*(3), 621–681. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.10>
- Chou, T.-C., & Talalay, P. (1983). Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem. *Trends in Pharmacological Sciences*, *4*, 450–454. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(83\)90490-X](https://doi.org/10.1016/0165-6147(83)90490-X)

- Chou, T.-C., & Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*, 22, 27–55. [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(84\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0065-2571(84)90007-4)
- Ciruelos Gil, E. M. (2014). Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 40(7), 862–871. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2014.03.004>
- COSMIC. (2024). *COSMIC: the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* [Gene PIK3CA]. <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=PIK3CA>
- Costa, C., Ebi, H., Martini, M., Beausoleil, S. A., Faber, A. C., Jakubik, C. T., Huang, A., Wang, Y., Nishtala, M., Hall, B., Rikova, K., Zhao, J. J., Hirsch, E., Benes, C. H., & Engelman, J. A. (2015). Measurement of PIP3 Levels Reveals an Unexpected Role for p110 β in Early Adaptive Responses to p110 α -Specific Inhibitors in Luminal Breast Cancer. *Cancer Cell*, 27(1), 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.11.007>
- Cserni, G., Chmielik, E., Cserni, B., & Tot, T. (2018). The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Archiv*, 472(5), 697–703. <https://doi.org/10.1007/s00428-018-2301-9>
- Dai, X [Xiaofeng], Cheng, H [Hongye], Bai, Z., & Li, J. (2017). Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *Journal of Cancer*, 8(16), 3131–3141. <https://doi.org/10.7150/jca.18457>
- De Laurentiis, M., Costa, L., Gligorov, J., Knop, A., Senkus-Konefka, E., García-Sáenz, J. A., Schmid, P., Heniquez, A., Serra, P., Reising, A., & Kuemmel, S. (2022). EPIK-B5: A phase III, randomized study of alpelisib (ALP) plus fulvestrant (FUL) in patients with hormone receptor-positive (HR+), human epidermal growth factor receptor 2-negative (HER2-), PIK3CA -mutated advanced breast cancer (ABC) progressing on/after an aromatase inhibitor (AI) with a cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor (CDK4/6i). *Journal of Clinical Oncology*, 40(16_suppl), TPS1109-TPS1109. https://doi.org/10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.TPS1109
- Delgado, A., & Guddati, A. K. (2021). Clinical endpoints in oncology - a primer. *American Journal of Cancer Research*, 11(4), 1121–1131.
- Dellapasqua, S., Bertolini, F., Bagnardi, V., Campagnoli, E., Scarano, E., Torrì, R., Shaked, Y., Mancuso, P., Goldhirsch, A., Rocca, A., Pietri, E., & Colleoni, M. (2008). Metronomic Cyclophosphamide and Capecitabine Combined With Bevacizumab in Advanced Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26(30), 4899–4905. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.17.4789>
- Dent, S., Cortés, J., Im, Y.-H., Diéras, V., Harbeck, N., Krop, I. E., Wilson, T. R., Cui, N., Schimmoller, F., Hsu, J. Y., He, J., Laurentiis, M. de, Sousa, S., Drullinsky, P., & Jacot, W. (2021). Phase III randomized study of taselisib or placebo with fulvestrant in estrogen receptor-positive, PIK3CA-mutant, HER2-negative, advanced breast cancer: The SANDPIPER trial. *Annals of Oncology*, 32(2), 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.10.596>
- Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e. V., Deutsche Gesellschaft für Senologie e. V., Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, & Frauenselbsthilfe Krebs Bundesverband e. V. (2021). Markrücknahme von Alpelisib zulasten von Brustkrebspatienten/-innen. *Senologie - Zeitschrift Für Mammadiagnostik Und -Therapie*, 18(2), 107–108. <https://doi.org/10.1055/a-1489-7434>
- Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF. (2021). *S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms*. AWMF Registernummer: 032-045OL. <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/>
- Di Leo, A., Johnston, S. R. D., Lee, K. S., Ciruelos, E. M., Lønning, P. E., Janni, W., O'Regan, R., Mouret Reynier, M. A., Klev, D., Egle, D., Csósz, T., Bordonaro, R., Decker, T., Tjan-Heijnen, V. C. G., Blau, S., Schirone, A., Weber, D., El-Hashimy, M., Dharan, B., . . . Bachelot, T. (2018). Buparlisib plus fulvestrant in postmenopausal women with hormone-receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer progressing on or after mTOR inhibition (BELLE-3): A randomised, double-blind,

- placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 19(1), 87–100.
[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30688-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30688-5).
- Dong, M., Shan, B., Han, X., Zhao, X., Wang, F., Zhu, L., Ou, Q., Ma, X., & Pan, Y. (2022). Baseline Mutations and Up-Regulation of PI3K-AKT Pathway Serve as Potential Indicators of Lack of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Stage II/III Breast Cancer. *Frontiers in Oncology*, 11, 784985. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.784985>
- Dowsett, M., Nielsen, T. O., A'Hern, R., Bartlett, J., Coombes, R. C., Cuzick, J., Ellis, M., Henry, N. L., Hugh, J. C., Lively, T., McShane, L. M., Paik, S., Penault-Llorca, F., Prudkin, L., Regan, M. M., Salter, J., Sotiriou, C., Smith, I. E., Viale, G., . . . Hayes, D. F. (2011). Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(22), 1656–1664. <https://doi.org/10.1093/jnci/djr393>
- Engelman, J. A., Chen, L., Tan, X., Crosby, K., Guimaraes, A. R., Upadhyay, R., Maira, S. M., McNamara, K., Perera, S. A., Song, Y., Chirieac, L. R., Kaur, R., Lightbown, A., Simendinger, J., Li, T., Padera, R. F., García-Echeverría, C., Weissleder, R., Mahmood, U., . . . Wong, K.-K. (2008). Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nature Medicine*, 14(12), 1351–1356. <https://doi.org/10.1038/nm.1890>
- Foulkes, W. D., Smith, I. E., & Reis-Filho, J. S. (2010). Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 363(20), 1938–1948.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra1001389>
- Freyer, G., Martínez-Jañez, N., Kukielka-Budny, B., Ulanska, M., Bourgeois, H., Muñoz, M., Morales, S., Calero, J. B., Cortesi, L., Pintér, T., Palácová, M., Cherciu, N., Petru, E., Ettl, J., Almeida, C. de, Villanova, G., Raymond, R., Minh, C. T. T., Rodrigues, A., & Cazzaniga, M. E. (2024). Single-agent metronomic versus weekly oral vinorelbine as first-line chemotherapy in patients with HR-positive/HER2-negative advanced breast cancer: The randomized Tempo Breast study. *Breast*, 74, Article 103681.
<https://doi.org/10.1016/j.breast.2024.103681>
- Fritsch, C., Huang, A., Chatenay-Rivauday, C., Schnell, C., Reddy, A., Liu, M., Kauffmann, A., Guthy, D., Erdmann, D., Pover, A. de, Furet, P., Gao, H., Ferretti, S., Wang, Y., Trappe, J., Brachmann, S. M., Maira, S. M., Wilson, C., Boehm, M., . . . Sellers, W. R. (2014). Characterization of the Novel and Specific PI3K α Inhibitor NVP-BYL719 and Development of the Patient Stratification Strategy for Clinical Trials. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(5), 1117–1129.
<https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0865>
- Furet, P., Guagnano, V., Fairhurst, R. A., Imbach-Weese, P., Bruce, I., Knapp, M., Fritsch, C., Blasco, F., Blanz, J., Aichholz, R., Hamon, J., Fabbro, D., & Caravatti, G. (2013). Discovery of NVP-BYL719 a potent and selective phosphatidylinositol-3 kinase alpha inhibitor selected for clinical evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(13), 3741–3748. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.05.007>
- Fuso, P., Muratore, M., D'Angelo, T., Paris, I., Carbognin, L., Tiberi, G., Pavese, F., Duranti, S., Orlandi, A., Tortora, G., Scambia, G., & Fabi, A. (2022). PI3k Inhibitors in Advanced Breast Cancer: The Past, The Present, New Challenges and Future Perspectives. *Cancers*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/cancers14092161>
- Galvao, J., Davis, B., Tilley, M., Normando, E., Duchon, M. R., & Cordeiro, M. F. (2014). Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 28(3), 1317–1330.
<https://doi.org/10.1096/fj.13-235440>
- Gebbia, V., & Puozzo, C. (2005). Oral versus intravenous vinorelbine: Clinical safety profile. *Expert Opinion on Drug Safety*, 4(5), 915–928.
<https://doi.org/10.1517/14740338.4.5.915>
- Gennari, A., André, F., Barrios, C. H., Cortés, J., Azambuja, E. de, DeMichele, A., Dent, R., Fenlon, D., Gligorov, J., Hurvitz, S. A., Im, S.-A., Krug, D., Kunz, W. G., Loi, S., Penault-Llorca, F., Ricke, J., Robson, M. E., Rugo, H. S., Saura, C., . . . Harbeck, N. (2021). Esmo Clinical Practice Guideline for the diagnosis, staging and treatment of patients with metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*, 32(12), 1475–1495.
<https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.09.019>

- Guan, J.-L. (Ed.). (2005). *Methods in Molecular Biology: Vol. 294. Cell Migration: Developmental Methods and Protocols*. Humana Press.
- Hanahan, D., Bergers, G., & Bergsland, E. (2000). Less is more, regularly: Metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 105(8), 1045–1047. <https://doi.org/10.1172/JCI9872>
- Harbeck, N., & Gnant, M. (2017). Breast cancer. *Lancet*, 389(10074), 1134–1150. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31891-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31891-8)
- Hermann, P. C., Huber, S. L., & Heeschen, C. (2008). Metastatic cancer stem cells: A new target for anti-cancer therapy? *Cell Cycle*, 7(2), 188–193. <https://doi.org/10.4161/cc.7.2.5326>
- Hirai, H., Sootome, H., Nakatsuru, Y., Miyama, K., Taguchi, S., Tsujioka, K., Ueno, Y., Hatch, H., Majumder, P. K., Pan, B.-S., & Kotani, H. (2010). Mk-2206, an allosteric Akt inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs in vitro and in vivo. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(7), 1956–1967. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-1012>
- Hoeflich, K. P., O'Brien, C., Boyd, Z., Cavet, G., Guerrero, S., Jung, K., Januario, T., Savage, H., Punnoose, E., Truong, T., Zhou, W., Berry, L., Murray, L., Amler, L., Belvin, M., Friedman, L. S., & Lackner, M. R. (2009). In vivo Antitumor Activity of MEK and Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitors in Basal-Like Breast Cancer Models. *Clinical Cancer Research*, 15(14), 4649–4664. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0317>
- Hollestelle, A., Elstrodt, F., Nagel, J. H., Kallemeijn, W. W., & Schutte, M. (2007). Phosphatidylinositol-3-OH Kinase or RAS Pathway Mutations in Human Breast Cancer Cell Lines. *Molecular Cancer Research*, 5(2), 195–201. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-06-0263>
- Hollestelle, A., Nagel, J. H., Smid, M., Lam, S., Elstrodt, F., Wasielewski, M., Ng, S. S., French, P. J., Peeters, J. K., Rozendaal, M. J., Riaz, M., Koopman, D. G., Ten Hagen, T. L. M., Leeuw, B. H. C. G. M. de, Zwarthoff, E. C., Teunisse, A., van der Spek, P. J., Klijn, J. G. M., Dinjens, W. N. M., . . . Schutte, M. (2010). Distinct gene mutation profiles among luminal-type and basal-type breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research and Treatment*, 121(1), 53–64. <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0460-8>
- Huang, R.-Y., Pei, L., Liu, Q [QuanJin], Chen, S., Dou, H., Shu, G., Yuan, Z.-X., Lin, J., Peng, G., Zhang, W., & Fu, H. (2019). Isobologram Analysis: A Comprehensive Review of Methodology and Current Research. *Frontiers in Pharmacology*, 10, Article 1222. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01222>
- Huang, W.-C., & Hung, M.-C. (2009). Induction of Akt Activity by Chemotherapy Confers Acquired Resistance. *Journal of the Formosan Medical Association*, 108(3), 180–194. [https://doi.org/10.1016/S0929-6646\(09\)60051-6](https://doi.org/10.1016/S0929-6646(09)60051-6)
- Janku, F., Hong, D. S., Fu, S., Piha-Paul, S. A., Naing, A., Falchook, G. S., Tsimberidou, A. M., Stepanek, V. M., Moulder, S. L., Lee, J. J., Luthra, R., Zinner, R. G., Broaddus, R. R., Wheler, J. J., & Kurzrock, R. (2014). Assessing PIK3CA and PTEN in Early-Phase Trials with PI3K/AKT/mTOR Inhibitors. *Cell Reports*, 6(2), 377–387. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.035>
- Janku, F., Wheler, J. J., Naing, A., Falchook, G. S., Hong, D. S., Stepanek, V. M., Fu, S., Piha-Paul, S. A., Lee, J. J., Luthra, R., Tsimberidou, A. M., & Kurzrock, R. (2013). Pik3ca Mutation H1047R Is Associated with Response to PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway Inhibitors in Early-Phase Clinical Trials. *Cancer Research*, 73(1), 276–284. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1726>
- Jia, S., Liu, Z., Zhang, S [Sen], Liu, P., Zhang, L., Lee, S. H., Zhang, J., Signoretti, S., Loda, M., Roberts, T. M., & Zhao, J. J. (2008). Essential roles of PI(3)K-p110beta in cell growth, metabolism and tumorigenesis. *Nature*, 454(7205), 776–779. <https://doi.org/10.1038/nature07091>
- Jiang, G., Zhang, S [Shijun], Yazdanparast, A., Li, M [Meng], Pawar, A. V., Liu, Y [Yunlong], Inavolu, S. M., & Cheng, L. (2016). Comprehensive comparison of molecular portraits between cell lines and tumors in breast cancer. *BMC Genomics*, 17(Suppl 7), Article 525, 281–301. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2911-z>

- Josephy, P. D., Eling, T., & Mason, R. P. (1982). The Horseradish Peroxidase-catalyzed Oxidation of 3,5,3',5'-Tetramethylbenzidine: Free radical and charge-transfer complex intermediates. *Journal of Biological Chemistry*, 257(7), 3669–3675. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)34832-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)34832-4)
- Juric, D., Castel, P., Griffith, M., Griffith, O. L., Won, H. H., Ellis, H., Ebbesen, S. H., Ainscough, B. J., Ramu, A., Iyer, G., Shah, R. H., Huynh, T., Mino-Kenudson, M., Sgroi, D., Isakoff, S. J., Thabet, A., Elamine, L., Solit, D. B., Lowe, S. W., . . . Scaltriti, M. (2015). Convergent loss of PTEN leads to clinical resistance to a PI(3)K α inhibitor. *Nature*, 518(7538), 240–244. <https://doi.org/10.1038/nature13948>
- Juric, D., Janku, F., Rodón, J., Burris, H. A., Mayer, I. A., Schuler, M., Seggewiss-Bernhardt, R., Gil-Martin, M., Middleton, M. R., Baselga, J., Bootle, D., Demanse, D., Blumenstein, L., Schumacher, K., Huang, A., Quadt, C., & Rugo, H. S. (2019). Alpelisib Plus Fulvestrant in PIK3CA-Altered and PIK3CA-Wild-Type Estrogen Receptor-Positive Advanced Breast Cancer: A Phase 1b Clinical Trial. *JAMA Oncology*, 5(2), Article e184475. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.4475>
- Juric, D., Rodón, J., Tabernero, J., Janku, F., Burris, H. A., Schellens, J. H. M., Middleton, M. R., Berlin, J., Schuler, M., Gil-Martin, M., Rugo, H. S., Seggewiss-Bernhardt, R., Huang, A., Bootle, D., Demanse, D., Blumenstein, L., Coughlin, C., Quadt, C., & Baselga, J. (2018). Phosphatidylinositol 3-Kinase α -Selective Inhibition With Alpelisib (BYL719) in PIK3CA-Altered Solid Tumors: Results From the First-in-Human Study. *Journal of Clinical Oncology*, 36(13), 1291–1299. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.72.7107>
- Kao, J., Salari, K., Bocanegra, M., Choi, Y. L., Girard, L., Gandhi, J., Kwei, K. A., Hernandez-Boussard, T., Wang, P., Gazdar, A. F., Minna, J. D., & Pollack, J. R. (2009). Molecular Profiling of Breast Cancer Cell Lines Defines Relevant Tumor Models and Provides a Resource for Cancer Gene Discovery. *PLoS One*, 4(7), Article e6146. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006146>
- Keegan, N. M., Gleeson, J. P., Hennessy, B. T., & Morris, P. G. (2018). Pi3k inhibition to overcome endocrine resistance in breast cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 27(1), 1–15. <https://doi.org/10.1080/13543784.2018.1417384>
- Kerbel, R. S., & Kamen, B. A. (2004). The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 4(6), 423–436. <https://doi.org/10.1038/nrc1369>
- Kerbel, R. S., & Shaked, Y. (2017). The potential clinical promise of 'multimodality' metronomic chemotherapy revealed by preclinical studies of metastatic disease. *Cancer Letters*, 400, 293–304. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.02.005>
- Khezri, M. R., Jafari, R., Yousefi, K., & Zolbanin, N. M. (2022). The PI3K/AKT signaling pathway in cancer: Molecular mechanisms and possible therapeutic interventions. *Experimental and Molecular Pathology*, 127, Article 104787. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2022.104787>
- Kilickap, S., Demirci, U., Karadurmus, N., Dogan, M., Akinci, B., & Sendur, M. A. N. (2018). Endpoints in oncology clinical trials. *Journal of Balkan Union of Oncology*, 23(7), 1–6.
- Knuefermann, C., Lu, Y., Liu, B., Jin, W., Liang, K., Wu, L., Schmidt, M [Mathias], Mills, G. B., Mendelsohn, J., & Fan, Z. (2003). Her2/pi-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncogene*, 22(21), 3205–3212. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206394>
- Krajnak, S., Battista, M. J., Hasenburg, A., & Schmidt, M [Marcus] (2022). Metronomic Chemotherapy for Metastatic Breast Cancer. *Oncology Research and Treatment*, 45(1-2), 12–17. <https://doi.org/10.1159/000520236>
- Lacroix, M., & Leclercq, G. (2004). Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: An update. *Breast Cancer Research and Treatment*, 83(3), 249–289. <https://doi.org/10.1023/B:BREA.0000014042.54925.cc>
- Leenhardt, F., Alexandre, M., & Jacot, W. (2021). Alpelisib for the treatment of PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 22(6), 667–675. <https://doi.org/10.1080/14656566.2021.1873952>

- Lefebvre, C., Bachelot, T., Filleron, T., Pedrero, M., Campone, M., Soria, J. C., Massard, C., Lévy, C., Arnedos, M., Lacroix-Triki, M., Garrabey, J., Boursin, Y., Deloger, M., Fu, Y., Commo, F., Scott, V., Lacroix, L., Dieci, M. V., Kamal, M., . . . André, F. (2016). Mutational Profile of Metastatic Breast Cancers: A Retrospective Analysis. *PLoS Med*, *13*(12), Article e1002201. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002201>
- Li, H., Prever, L., Hirsch, E., & Gulluni, F. (2021). Targeting PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer. *Cancers*, *13*(14). <https://doi.org/10.3390/cancers13143517>
- Lien, K., Georgsdottir, S., Sivanathan, L., Chan, K., & Emmenegger, U. (2013). Low-dose metronomic chemotherapy: A systematic literature analysis. *European Journal of Cancer*, *49*(16), 3387–3395. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.06.038>
- Liu, C.-T., Hsieh, M.-C., Su, Y.-L., Hung, C.-M., Pei, S.-N., Liao, C.-K., Tsai, Y.-F., Liao, H.-Y., Liu, W.-C., Chiu, C.-C., Wu, S.-C., Wang, S.-H., Wei, C.-T., & Rau, K.-M. (2021). Metronomic vinorelbine is an excellent and safe treatment for advanced breast cancer: A retrospective, observational study. *Journal of Cancer*, *12*(17), 5355–5364. <https://doi.org/10.7150/jca.60682>
- Liu, H [Hua], Li, M [Min], Lin, Y., You, H., Kou, J., & Feng, W. (2024). Dual-directional effect of vinorelbine combined with cisplatin or fluorouracil on tumor growth and metastasis in metronomic chemotherapy in breast cancer. *International Journal of Oncology*, *64*(2), Article 13. <https://doi.org/10.3892/ijo.2023.5601>
- Liu, J [Jiaxuan], He, M., Wang, Z [Zijing], Li, Q., & Xu, B. (2022). Current Research Status of Metronomic Chemotherapy in Combination Treatment of Breast Cancer. *Oncology Research and Treatment*, *45*(11), 681–691. <https://doi.org/10.1159/000526481>
- Liu, P., Cheng, H [Hailing], Roberts, T. M., & Zhao, J. J. (2009). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, *8*(8), 627–644. <https://doi.org/10.1038/nrd2926>
- Liu, S., Knapp, S., & Ahmed, A. A. (2014). The structural basis of PI3K cancer mutations: From mechanism to therapy. *Cancer Res*, *74*(3), 641–646. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2319>
- Liu, Y [Yangyang], Gu, F., Liang, J [Jinyan], Dai, X [Xiaomeng], Wan, C., Hong, X., Zhang, K., & Liu, L. (2017). The efficacy and toxicity profile of metronomic chemotherapy for metastatic breast cancer: A meta-analysis. *PLoS One*, *12*(3), Article e0173693. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173693>
- Loewe, S., & Muischnek, H. (1926). Über Kombinationswirkungen. *Archiv Für Experimentelle Pathologie Und Pharmakologie*, *114*(5-6), 313–326. <https://doi.org/10.1007/BF01952257>
- Lokuhetty, D., White, V. A., Watanabe, R., & Cree, I. A. (Eds.). (2019). *World Health Organization Classification of Tumours: Vol. 2. Breast Tumours* (5th ed.). International Agency for Research on Cancer.
- Martínez-Sáez, O., Chic, N., Pascual, T., Adamo, B., Vidal, M., González-Farré, B., Sanfeliu, E., Schettini, F., Conte, B., Brasó-Maristany, F., Rodríguez, A., Martínez, D., Galván, P., Martínez, A., Muñoz, M., & Prat, A. (2020). Frequency and spectrum of PIK3CA somatic mutations in breast cancer. *Breast Cancer Research*, *22*(1), Article 45. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01284-9>
- Mavroeidis, L., Sheldon, H., Briasoulis, E., Marselos, M., Pappas, P., & Harris, A. L. (2015). Metronomic vinorelbine: Anti-angiogenic activity in vitro in normoxic and severe hypoxic conditions, and severe hypoxia-induced resistance to its anti-proliferative effect with reversal by Akt inhibition. *International Journal of Oncology*, *47*(2), 455–464. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3059>
- Mayer, I. A., Abramson, V. G., Formisano, L., Balko, J. M., Estrada, M. V., Sanders, M. E., Juric, D., Solit, D. B., Berger, M. F., Won, H. H., Li, Y., Cantley, L. C., Winer, E. P., & Arteaga, C. L. (2017). A Phase Ib Study of Alpelisib (BYL719), a PI3K α -Specific Inhibitor, with Letrozole in ER+/HER2- Metastatic Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, *23*(1), 26–34. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0134>
- Mayer, I. A., Prat, A., Egle, D., Blau, S., Fidalgo, J. A. P., Gnant, M., Fasching, P. A., Colleoni, M., Wolff, A. C., Winer, E. P., Singer, C. F., Hurvitz, S. A., Estévez, L. G., van Dam, P. A., Kümmel, S., Mundhenke, C., Holmes, F., Babbar, N.,

- Charbonnier, L., . . . Arteaga, C. L. (2019). A Phase II Randomized Study of Neoadjuvant Letrozole Plus Alpelisib for Hormone Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Breast Cancer (NEO-ORB). *Clinical Cancer Research*, 25(10), 2975–2987. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-3160>
- Ménorval, M.-A. de, Mir, L. M., Fernández, M. L., & Reigada, R. (2012). Effects of Dimethyl Sulfoxide in Cholesterol-Containing Lipid Membranes: A Comparative Study of Experiments In Silico and with Cells. *PLoS One*, 7(7), Article e41733. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041733>
- Miled, N., Yan, Y., Hon, W. C., Perisic, O., Zvelebil, M., Inbar, Y., Schneidman-Duhovny, D., Wolfson, H. J., Backer, J. M., & Williams, R. L. (2007). Mechanism of Two Classes of Cancer Mutations in the Phosphoinositide 3-Kinase Catalytic Subunit. *Science*, 317(5835), 239–242. <https://doi.org/10.1126/science.1135394>
- Miller, J., Armgardt, E., & Svoboda, A. (2022). The efficacy and safety of alpelisib in breast cancer: A real-world analysis. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 28(5), 1152–1156. <https://doi.org/10.1177/10781552221096413>
- Miller, T. W., Balko, J. M., & Arteaga, C. L. (2011). Phosphatidylinositol 3-Kinase and Antiestrogen Resistance in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 29(33), 4452–4461. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.34.4879>
- Millis, S. Z., Ikeda, S., Reddy, S., Gatalica, Z., & Kurzrock, R. (2016). Landscape of Phosphatidylinositol-3-Kinase Pathway Alterations Across 19 784 Diverse Solid Tumors. *JAMA Oncology*, 2(12), 1565–1573. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.0891>
- Millis, S. Z., Jardim, D. L., Albacker, L., Ross, J. S., Miller, V. A., Ali, S. M., & Kurzrock, R. (2019). Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway Genomic Alterations in 60,991 Diverse Solid Tumors Informs Targeted Therapy Opportunities. *Cancer*, 125(7), 1185–1199. <https://doi.org/10.1002/cncr.31921>
- Mirzoeva, O. K., Das, D., Heiser, L. M., Bhattacharya, S., Siwak, D., Gendelman, R., Bayani, N., Wang, N. J., Neve, R. M., Guan, Y., Hu, Z., Knight, Z. A., Feiler, H. S., Gascard, P., Parvin, B., Spellman, P. T., Shokat, K. M., Wyrobek, A. J., Bissell, M. J., . . . Korn, W. M. (2009). Basal Subtype and MAPK/ERK Kinase (MEK)-Phosphoinositide 3-Kinase Feedback Signaling Determine Susceptibility of Breast Cancer Cells to MEK Inhibition. *Cancer Research*, 69(2), 565–572. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3389>
- Molina, J. R., & Adjei, A. A. (2006). The Ras/Raf/MAPK Pathway. *Journal of Thoracic Oncology*, 1(1), 7–9.
- Montagna, E., Canello, G., Bagnardi, V., Pastrello, D., Dellapasqua, S., Perri, G., Viale, G., Veronesi, P., Luini, A., Intra, M., Calleri, A., Rampinelli, C., Goldhirsch, A., Bertolini, F., & Colleoni, M. (2012). Metronomic Chemotherapy Combined With Bevacizumab and Erlotinib in Patients With Metastatic HER2-Negative Breast Cancer: Clinical and Biological Activity. *Clinical Breast Cancer*, 12(3), 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2012.03.008>
- Montagna, E., Canello, G., Dellapasqua, S., Munzone, E., & Colleoni, M. (2014). Metronomic therapy and breast cancer: A systematic review. *Cancer Treatment Reviews*, 40(8), 942–950. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2014.06.002>
- Montagna, E., Pagan, E., Canello, G., Sangalli, C., Bagnardi, V., Munzone, E., Salè, E. O., Malengo, D., Cazzaniga, M. E., Negri, M., Peruzzotti, G., Veronesi, P., Viale, G., & Colleoni, M. (2022). The prolonged clinical benefit with metronomic chemotherapy (VEX regimen) in metastatic breast cancer patients. *Anticancer Drugs*, 33(1), e628-e634. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000001209>
- Montagna, E., Palazzo, A., Maisonneuve, P., Canello, G., Iorfida, M., Sciandivasci, A., Esposito, A., Cardillo, A., Mazza, M., Munzone, E., Lai, A., Goldhirsch, A., & Colleoni, M. (2017). Safety and efficacy study of metronomic vinorelbine, cyclophosphamide plus capecitabine in metastatic breast cancer: A phase II trial. *Cancer Letters*, 400, 276–281. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.01.027>
- Morgillo, F., Della Corte, C. M., Diana, A., Di Mauro, C., Ciaramella, V., Barra, G., Belli, V., Franzese, E., Bianco, R., Maiello, E., Vita, F. de, Ciardiello, F., & Orditura, M. (2017).

- Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K α)/AKT axis blockade with taselisib or ipatasertib enhances the efficacy of anti-microtubule drugs in human breast cancer cells. *Oncotarget*, 8(44), 76479–76491. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20385>
- Mosele, F., Stefanovska, B., Lusque, A., Tran Dien, A., Garberis, I., Droin, N., Le Tourneau, C., Sablin, M.-P., Lacroix, L., Enrico, D., Miran, I., Jovelet, C., Bièche, I., Soria, J. C., Bertucci, F., Bonnefoi, H., Campone, M., Dalenc, F., Bachelot, T., . . . André, F. (2020). Outcome and molecular landscape of patients with PIK3CA-mutated metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*, 31(3), 377–386. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2019.11.006>
- Moudi, M., Go, R., Yien, C. Y. S., & Nazre, M. (2013). Vinca Alkaloids. *International Journal of Preventive Medicine*, 4(11), 1231–1235.
- Munoz, R., Shaked, Y., Bertolini, F., Emmenegger, U., Man, S., & Kerbel, R. S. (2005). Anti-angiogenic treatment of breast cancer using metronomic low-dose chemotherapy. *The Breast*, 14(6), 466–479. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2005.08.026>
- Munzone, E., & Colleoni, M. (2015). Clinical overview of metronomic chemotherapy in breast cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 12(11), 631–644. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.131>
- Munzone, E., Regan, M. M., Cinieri, S., Montagna, E., Orlando, L., Shi, R., Campadelli, E., Gianni, L., Palleschi, M., Petrelli, F., Bengala, C., Generali, D., Collovà, E., Puglisi, F., Cretella, E., Zamagni, C., Chini, C., Ruepp, B., Loi, S., & Colleoni, M. (2023). Efficacy of Metronomic Oral Vinorelbine, Cyclophosphamide, and Capecitabine vs Weekly Intravenous Paclitaxel in Patients With Estrogen Receptor-Positive, ERBB2-Negative Metastatic Breast Cancer: Final Results From the Phase 2 METEORA-II Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncology*, 9(9), 1267–1272. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2023.2150>
- National Center for Biotechnology Information. (2024a, March 9). *PubChem Compound Summary for CID 5311497, Vinorelbine*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vinorelbine>
- National Center for Biotechnology Information. (2024b, March 9). *PubChem Compound Summary for CID 56649450, Alpelisib*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Alpelisib>
- Ni, J., Liu, Q [Qingsong], Xie, S., Carlson, C., Von, T., Vogel, K., Riddle, S., Benes, C. H., Eck, M., Roberts, T. M., Gray, N., & Zhao, J. J. (2012). Functional Characterization of an Isoform-Selective Inhibitor of PI3K-p110 β as a Potential Anticancer Agent. *Cancer Discovery*, 2(5), 425–433. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0003>
- Notman, R., Noro, M., O'Malley, B., & Anwar, J. (2006). Molecular basis for dimethylsulfoxide (DMSO) action on lipid membranes. *Journal of the American Chemical Society*, 128(43), 13982–13983. <https://doi.org/10.1021/ja063363t>
- 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. *Scientific Reports*, 4, Article 6255. <https://doi.org/10.1038/srep06255>
- Pascual, J., & Turner, N. C. (2019). Targeting the PI3-kinase pathway in triple-negative breast cancer. *Annals Oncology*, 30(7), 1051–1060. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz133>
- Pepe, F. F., Cazzaniga, M. E., Baroni, S., Riva, F., Cicchiello, F., Capici, S., Cogliati, V., Maggioni, C., Cordani, N., Cerrito, M. G., & Malandrini, S. (2022). Immunomodulatory effects of metronomic vinorelbine (mVRL), with or without metronomic capecitabine (mCAPE), in hormone receptor positive (HR+)/HER2-negative metastatic breast cancer (MBC) patients: Final results of the exploratory phase 2 Victor-5 study. *BMC Cancer*, 22(1), Article 956. <https://doi.org/10.1186/s12885-022-10031-6>
- Perroud, H. A., Alasino, C. M., Rico, M. J., Queralt, F., Pezzotto, S. M., Rozados, V. R., & Scharovsky, O. G. (2016). Quality of life in patients with metastatic breast cancer treated with metronomic chemotherapy. *Future Oncology*, 12(10), 1233–1242. <https://doi.org/10.2217/fon-2016-0075>
- Prat, A., Adamo, B., Cheang, M. C., Anders, C. K., Carey, L. A., & Perou, C. M. (2013). Molecular Characterization of Basal-Like and Non-Basal-Like Triple-Negative Breast

- Cancer. *The Oncologist*, 18(2), 123–133. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2012-0397>
- Rajput, S., Guo, Z [Zhanfang], Li, S., & Ma, C. X. (2019). Pi3k inhibition enhances the anti-tumor effect of eribulin in triple negative breast cancer. *Oncotarget*, 10(38), 3667–3680.
- Razavi, P., Dickler, M. N., Shah, P. D., Toy, W., Brown, D. N., Won, H. H., Li, B. T., Shen, R., Vasan, N., Modi, S., Jhaveri, K., Caravella, B. A., Patil, S., Selenica, P., Zamora, S., Cowan, A. M., Comen, E., Singh, A., Covey, A., . . . Chandralapaty, S. (2020). Alterations in PTEN and ESR1 promote clinical resistance to alpelisib plus aromatase inhibitors. *Nature Cancer*, 1(4), 382–393. <https://doi.org/10.1038/s43018-020-0047-1>
- Rechenberg, W. (1982). Zur Ermittlung von Ausreißern. *Fresenius' Zeitschrift Für Analytische Chemie*, 311(6), 590–597. <https://doi.org/10.1007/BF00635536>
- Reynolds, D. S., Tevis, K. M., Blessing, W. A., Colson, Y. L., Zaman, M. H., & Grinstaff, M. W. (2017). Breast Cancer Spheroids Reveal a Differential Cancer Stem Cell Response to Chemotherapeutic Treatment. *Scientific Reports*, 7, Article 10382. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10863-4>
- Roche Diagnostics GmbH. (2018). *Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)*. <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/roche/11647229001>
- Rodón, J., Curigliano, G., Delord, J. P., Harb, W., Azaro, A., Han, Y., Wilke, C., Donnet, V., Sellami, D., & Beck, T. (2018). A Phase Ib, open-label, dose-finding study of alpelisib in combination with paclitaxel in patients with advanced solid tumors. *Oncotarget*, 9(60), 31709–31718. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25854>
- Rodríguez-Burford, C., Oelschlager, D. K., Talley, L. I., Barnes, M. N., Partridge, E. E., & Grizzle, W. E. (2003). The use of dimethylsulfoxide as a vehicle in cell culture experiments using ovarian carcinoma cell lines. *Biotechnic & Histochemistry*, 78(1), 17–21. <https://doi.org/10.1080/10520290312120004>
- Rojas, K., & Stuckey, A. (2016). Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Clinical Obstetrics Gynecology*, 59(4), 651–672. <https://doi.org/10.1097/grf.0000000000000239>
- Romiti, A., Falcone, R., Roberto, M., & Marchetti, P. (2017). Current achievements and future perspectives of metronomic chemotherapy. *Investigational New Drugs*, 35(3), 359–374. <https://doi.org/10.1007/s10637-016-0408-x>
- Rugo, H. S., André, F., Yamashita, T., Cerda, H., Toledano, I., Stemmer, S. M., Jurado, J. C., Juric, D., Mayer, I. A., Ciruelos, E. M., Iwata, H., Conte, P. F., Campone, M., Wilke, C., Mills, D., Lteif, A., Miller, M., Gaudenzi, F., & Loibl, S. (2020). Time course and management of key adverse events during the randomized phase III SOLAR-1 study of PI3K inhibitor alpelisib plus fulvestrant in patients with HR-positive advanced breast cancer. *Annals of Oncology*, 31(8), 1001–1010. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.05.001>
- Rugo, H. S., Lacouture, M. E., Goncalves, M. D., Masharani, U., Aapro, M. S., & O'Shaughnessy, J. A. (2022). A multidisciplinary approach to optimizing care of patients treated with alpelisib. *The Breast*, 61, 156–167. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2021.12.016>
- Rugo, H. S., Lerebours, F., Ciruelos, E. M., Drullinsky, P., Ruiz-Borrego, M., Neven, P., Park, Y. H., Prat, A., Bachelot, T., Juric, D., Turner, N. C., Sophos, N., Zarate, J. P., Arce, C., Shen, Y.-M., Turner, S., Kanakamedala, H., Hsu, W.-C., & Chia, S. (2021). Alpelisib plus fulvestrant in PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive advanced breast cancer after a CDK4/6 inhibitor (BYLieve): One cohort of a phase 2, multicentre, open-label, non-comparative study. *The Lancet Oncology*, 22(4), 489–498. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00034-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00034-6)
- Rugo, H. S., Raskina, K., Schrock, A. B., Madison, R. W., Graf, R. P., Sokol, E. S., Sivakumar, S., Lee, J. K., Fisher, V., Oxnard, G. R., & Tukachinsky, H. (2023). Biology and Targetability of the Extended Spectrum of PIK3CA Mutations Detected in Breast Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 29(6), 1056–1067. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-22-2115>
- Saal, L. H., Holm, K., Maurer, M., Memeo, L., Su, T., Wang, X., Yu, J. S., Malmström, P.-O., Mansukhani, M., Enoksson, J., Hibshoosh, H., Borg, A., & Parsons, R. (2005). Pik3ca

- mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Research*, 65(7), 2554–2559. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3913>
- Saraiva, D. P., Matias, A. T., Braga, S., Jacinto, A., & Cabral, M. G. (2020). Establishment of a 3D Co-culture With MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Line and Patient-Derived Immune Cells for Application in the Development of Immunotherapies. *Frontiers in Oncology*, 10, 1543. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01543>
- Sarfraz, H., Bari, S., Whiting, J., Sur, M., Mo, Q., Armitage, M., & Costa, R. L. B. (2023). A Cohort Study of the Antitumor Efficacy and Toxicity Profile of Alpelisib for Metastatic or Locally Advanced HR+, HER2- Breast Cancer: A Single-Institution Experience. *Oncology*, 1–11. <https://doi.org/10.1159/000534953>
- Saridaki, Z., Malamos, N., Kourakos, P., Polyzos, A., Ardavanis, A., Androulakis, N., Kalbakis, K., Vamvakas, L., Georgoulas, V., & Mavroudis, D. (2012). A phase I trial of oral metronomic vinorelbine plus capecitabine in patients with metastatic breast cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 69, 35–42. <https://doi.org/10.1007/s00280-011-1663-3>
- Savas, P., Lo, L. L., Luen, S. J., Blackley, E. F., Callahan, J., Moodie, K., van Geelen, C. T., Ko, Y.-A., Weng, C.-F., Wein, L., Silva, M. J., Bujak, A. Z., Yeung, M. M., Ftouni, S., Hicks, R. J., Francis, P. A., Lee, C. K., Dawson, S.-J., & Loi, S. (2022). Alpelisib Monotherapy for PI3K-Altered, Pretreated Advanced Breast Cancer: A Phase II Study. *Cancer Discovery*, 12(9), 2058–2073. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1696>
- Schmidt, M [Marcus] (2016). Dose-Dense Chemotherapy in Metastatic Breast Cancer: Shortening the Time Interval for a Better Therapeutic Index. *Breast Care*, 11(1), 22–26. <https://doi.org/10.1159/000442726>
- Schwartz, E. L. (2009). Antivascular Actions of Microtubule-Binding Drugs. *Clinical Cancer Research*, 15(8), 2594–2601. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2710>
- Shaked, Y., Emmenegger, U., Man, S., Cervi, D., Bertolini, F., Ben-David, Y., & Kerbel, R. S. (2005). Optimal biologic dose of metronomic chemotherapy regimens is associated with maximum antiangiogenic activity. *Blood*, 106(9), 3058–3061. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1422>
- Shaked, Y., Pham, E., Hariharan, S., Magidey, K., Beyar-Katz, O., Xu, P., Man, S., Wu, F. T. H., Miller, V., Andrews, D., & Kerbel, R. S. (2016). Evidence Implicating Immunological Host Effects in the Efficacy of Metronomic Low-Dose Chemotherapy. *Cancer Research*, 76(20), 5983–5993. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0136>
- Sharma, P., Abramson, V. G., O'Dea, A., Nye, L., Mayer, I. A., Pathak, H. B., Hoffmann, M., Stecklein, S. R., Elia, M., Lewis, S., Scott, J., Jong, J. A. de, Wang, Y. Y., Yoder, R., Schwensen, K., Finke, K., Heldstab, J., LaFaver, S., Williamson, S. K., . . . Godwin, A. K. (2021). Clinical and Biomarker Results from Phase I/II Study of PI3K Inhibitor Alpelisib plus Nab-paclitaxel in HER2-Negative Metastatic Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 27(14), 3896–3904. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-4879>
- Sobhani, N., Roviello, G., Corona, S. P., Scaltriti, M., Ianza, A., Bortul, M., Zanconati, F., & Generali, D. (2018). The prognostic value of PI3K mutational status in breast cancer: A meta-analysis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(6), 4287–4292. <https://doi.org/10.1002/jcb.26687>
- Sos, M. L., Fischer, S., Ullrich, R., Peifer, M., Heuckmann, J. M., Koker, M., Heynck, S., Stückrath, I., Weiss, J., Fischer, F., Michel, K., Goel, A., Regales, L., Politi, K. A., Perera, S. A., Getlik, M., Heukamp, L. C., Ansén, S., Zander, T., . . . Thomas, R. K. (2009). Identifying genotype-dependent efficacy of single and combined PI3K- and MAPK-pathway inhibition in cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(43), 18351–18356. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907325106>
- Sri S, A. (2016). Pharmacological Activity of Vinca Alkaloids. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 4(3), 27–34.

- Statistisches Bundesamt. (2022). *Todesursachen: Die 10 häufigsten Todesfälle durch Krebs 2022*. <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-krebs-insgesamt.html>
- Sumida, K., Igarashi, Y., Toritsuka, N., Matsushita, T., Abe-Tomizawa, K., Aoki, M., Urushidani, T., Yamada, H., & Ohno, Y. (2011). Effects of DMSO on gene expression in human and rat hepatocytes. *Human and Experimental Toxicology*, *30*(10), 1701–1709. <https://doi.org/10.1177/09603271111399325>
- Sun, Y. S., Zhao, Z., Yang, Z. N., Xu, F., Lu, H. J., Zhu, Z. Y., Shi, W., Jiang, J., Yao, P. P., & Zhu, H.-P. (2017). Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(11), 1387–1397. <https://doi.org/10.7150/ijbs.21635>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: Globocan Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tanaka, H., Matsushima, H., Mizumoto, N., & Takashima, A. (2009). Classification of Chemotherapeutic Agents Based on Their Differential In vitro Effects on Dendritic Cells. *Cancer Research*, *69*(17), 6978–6986. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1101>
- Tao, Z., Shi, A., Lu, C., Song, T., Zhang, Z [Zhengguo], & Zhao, J. (2015). Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochemistry and Biophysics*, *72*(2), 333–338. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0459-6>
- Thirumal Kumar, D., & George Priya Doss, C. (2017). Role of E542 and E545 missense mutations of PIK3CA in breast cancer: A comparative computational approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *35*(12), 2745–2757. <https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1231082>
- Torbett, N. E., Luna-Moran, A., Knight, Z. A., Houk, A., Moasser, M., Weiss, W., Shokat, K. M., & Stokoe, D. (2008). A chemical screen in diverse breast cancer cell lines reveals genetic enhancers and suppressors of sensitivity to PI3K isoform-selective inhibition. *The Biochemical Journal*, *415*(1), 97–110. <https://doi.org/10.1042/BJ20080639>
- Tsang, J. Y. S., & Tse, G. M. (2020). Molecular Classification of Breast Cancer. *Advances in Anatomic Pathology*, *27*(1), 27–35. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000232>
- Twigg, R. S. (1945). Oxidation-Reduction Aspects of Resazurin. *Nature*, *155*(3935), 401–402. <https://doi.org/10.1038/155401a0>
- Vega-Avila, E., & Pugsley, M. K. (2011). An Overview of Colorimetric Assay Methods Used to Assess Survival or Proliferation of Mammalian Cells. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, *54*, 10–14.
- Verheijen, M., Lienhard, M., Schrooders, Y., Clayton, O., Nudischer, R., Boerno, S., Timmermann, B., Selevsek, N., Schlapbach, R., Gmuender, H., Gotta, S., Geraedts, J., Herwig, R., Kleinjans, J., & Caiment, F. (2019). DmsO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. *Scientific Reports*, *9*, Article 4641. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40660-0>
- Vitale, S. R., Martorana, F., Stella, S., Motta, G., Inzerilli, N., Massimino, M., Tirrò, E., Manzella, L., & Vigneri, P. (2021). Pi3k inhibition in breast cancer: Identifying and overcoming different flavors of resistance. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *162*, Article 103334. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2021.103334>
- Vivanco, I., & Sawyers, C. L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer*, *2*, 489–501. <https://doi.org/10.1038/nrc839>
- Wee, S., Wiederschain, D., Maira, S. M., Loo, A., Miller, C., deBeaumont, R., Stegmeier, F., Yao, Y.-M., & Lengauer, C. (2008). Pten-deficient cancers depend on PIK3CB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(35), 13057–13062. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802655105>
- Weigelt, B., Warne, P. H., & Downward, J. (2011). Pik3ca mutation, but not PTEN loss of function, determines the sensitivity of breast cancer cells to mTOR inhibitory drugs. *Oncogene*, *30*, 3222–3233. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.42>
- Weinberg, R. A. (2014). *The Biology of Cancer* (2nd ed.). Garland Science.

- Weintraub, M. A., Liu, D., DeMatteo, R., Goncalves, M. D., & Flory, J. H. (2024). Sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors for hyperglycemia in phosphoinositide 3-kinase pathway inhibition. *Breast Cancer Research and Treatment*, 203(1), 85–93. <https://doi.org/10.1007/s10549-023-07110-y>
- Wen, J., Tong, Y., & Zu, Y. (2015). Low Concentration DMSO Stimulates Cell Growth and In vitro Transformation of Human Multiple Myeloma Cells. *British Journal of Medicine & Medical Research*, 5(1), 65–74. <https://doi.org/10.9734/BJMMR/2015/5276>
- West, K. A., Castillo, S. S., & Dennis, P. A. (2002). Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resistance Updates*, 5(6), 234–248. [https://doi.org/10.1016/S1368-7646\(02\)00120-6](https://doi.org/10.1016/S1368-7646(02)00120-6)
- Whitman, M., Kaplan, D. R., Schaffhausen, B., Cantley, L. C., & Roberts, T. M. (1985). Association of phosphatidylinositol kinase activity with polyoma middle-T competent for transformation. *Nature*, 315(6016), 239–242. <https://doi.org/10.1038/315239a0>
- Wittekind, C. (Ed.). (2017). *TNM-Klassifikation maligner Tumoren* (8. Auflage). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; UICC Global Cancer Control.
- Wu, G., Xing, M., Mambo, E., Huang, X., Liu, J [Junwei], Guo, Z [Zhongmin], Chatterjee, A., Goldenberg, D., Gollin, S. M., Sukumar, S., Trink, B., & Sidransky, D. (2005). Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer. *Breast Cancer Research*, 7(5), R609–R616. <https://doi.org/10.1186/bcr1262>
- Xiao, W., Zhang, G., Chen, B., Chen, X [Xiaoqing], Wen, L., Lai, J., Li, X [Xuerui], Li, M [Min], Liu, H [Hao], Liu, J [Jing], Han-Zhang, H., Lizaso, A., & Liao, N. (2021). Mutational Landscape of PI3K-AKT-mTOR Pathway in Breast Cancer: Implications for Targeted Therapeutics. *Journal of Cancer*, 12(14), 4408–4417. <https://doi.org/10.7150/jca.52993>
- Yang, L., Ye, F., Bao, L., Zhou, X., Wang, Z [Zhe], Hu, P., Ouyang, N., Li, X [Xiaojuan], Shi, Y., Chen, G., Xia, P., Chui, M., Li, W., Jia, Y., Liu, Y [Yueping], Liu, J [Junjun], Ye, J., Zhang, Z [Zhe], & Bu, H. (2019). Somatic alterations of TP53, ERBB2, PIK3CA and CCND1 are associated with chemosensitivity for breast cancers. *Cancer Science*, 110(4), 1389–1400. <https://doi.org/10.1111/cas.13976>
- Yi, Y. W., Kang, H. J., Kim, H. J., Hwang, J. S., Wang, A., & Bae, I. (2013). Inhibition of constitutively activated phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway enhances antitumor activity of chemotherapeutic agents in breast cancer susceptibility gene 1-defective breast cancer cells. *Molecular Carcinogenesis*, 52(9), 667–675. <https://doi.org/10.1002/mc.21905>
- Zanoni, M., Piccinini, F., Arienti, C., Zamagni, A., Santi, S., Polico, R., Bevilacqua, A., & Tesei, A. (2016). 3d tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: A systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Scientific Reports*, 6, Article 19103. <https://doi.org/10.1038/srep19103>
- Zentrum für Krebsregisterdaten im RKI, & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2019). *Krebs in Deutschland für 2015/2016*. Robert Koch-Institut. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/fruehere_ausgaben/downloads/krebs_in_deutschland_12.pdf?__blob=publicationFile
- Zentrum für Krebsregisterdaten im RKI, & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2023). *Krebs in Deutschland für 2019/2020*. Robert Koch-Institut. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_2023.pdf?__blob=publicationFile
- Zhu, H., & Doğan, B. E. (2021). American Joint Committee on Cancer's Staging System for Breast Cancer, Eighth Edition: Summary for Clinicians. *European Journal of Breast Health*, 17(3), 234–238. <https://doi.org/10.4274/ejbh.galenos.2021.2021-4-3>
- Ziegengeist, J. L., Elmes, J. B., Strassels, S. A., Patel, J. N., & Moore, D. C. (2024). Alpelisib-Induced Diabetic Ketoacidosis: A Pharmacovigilance Analysis of the FDA Adverse Event Reporting System and Review of the Literature. *Clinical Breast Cancer*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2024.01.004>

9. Anhang

9.1. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung Brustkrebs nach UICC	5
Tabelle 2: Immunhistochemische Subtypisierung Brustkrebs	6
Tabelle 3: Therapeutische Wirkstoffe (Wirkstoffe, Therapeutika).....	28
Tabelle 4: Kits	28
Tabelle 5: Chemotaxine.....	29
Tabelle 6: Chemikalien und Reagenzien	29
Tabelle 7: Zellen, Zellkulturmedien und Medienzusätze	30
Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien	30
Tabelle 9: Gebrauchsmaterialien.....	31
Tabelle 10: Geräte.....	31
Tabelle 11: Software und Datenbanken.....	32
Tabelle 12: Übersicht der Zelllinien	33
Tabelle 13: Ausgesäte Zellzahlen für Migrations-Assay.....	40
Tabelle 14: Migrationsbedingungen der einzelnen Zelllinien.....	42
Tabelle 15: Schematische Versuchsanordnung in der Boydenkammer	42

9.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel Vinorelbin	9
Abbildung 2: Multimechanismus der metronomischen Chemotherapie (MCT).....	11
Abbildung 3: Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-Aktivierung.....	16
Abbildung 4: p85 α /p110 α Komplex.....	17
Abbildung 5: Strukturformel Alpelisib	20
Abbildung 6: Mikroskopische Aufnahme von MCF-7	33
Abbildung 7: Mikroskopische Aufnahme von MDA-MB-231	34
Abbildung 8: Mikroskopische Aufnahme von T-47D	34
Abbildung 9: Mikroskopische Aufnahme von BT-549.....	35
Abbildung 10: Mikroskopische Aufnahme von BT-20.....	36
Abbildung 11: Mikroskopische Aufnahme von ZR-75-1	36
Abbildung 12: Schematischer Aufbau Boydenkammer	39
Abbildung 13: Formel zur Berechnung des Combination Index (CI)	44
Abbildung 14: Schema der Additionsisobolen mit Combination Index (CI).....	45
Abbildung 15: Einfluss von DMSO auf die Viabilität.....	46
Abbildung 16: Einfluss von Vinorelbin (VRL) + Alpelisib auf die Viabilität von MCF-7	47
Abbildung 17: Einfluss von Vinorelbin (VRL) + Alpelisib auf die Viabilität von T-47D	49

Abbildung 18: Einfluss von Vinorelbin (VRL) + Apelisib auf die Viabilität von MDA-MB-231	50
Abbildung 19: Einfluss von Vinorelbin (VRL) + Apelisib auf die Viabilität von BT-549	51
Abbildung 20: Dosis-Wirkungs-Kurven von Vinorelbin (VRL) und Apelisib für die Viabilität der Zelllinien MCF-7, T-47D, MDA-MB-231 und BT-549	52
Abbildung 21: Isobologramm und Combination Index (CI) für die Viabilität von MCF-7	53
Abbildung 22: Isobologramm und Combination Index (CI) für die Viabilität von T-47D	54
Abbildung 23: Einfluss von Vinorelbin (VRL) + Apelisib auf die Proliferation von MCF-7	55
Abbildung 24: Einfluss von Vinorelbin (VRL) + Apelisib auf die Proliferation von T-47D	56
Abbildung 25: Einfluss von Vinorelbin (VRL) + Apelisib auf die Proliferation von MDA-MB-231	56
Abbildung 26: Dosis-Wirkungs-Kurven von Vinorelbin (VRL) und Apelisib für die Proliferation der Zelllinien MCF-7, T-47D und MDA-MB-231	57
Abbildung 27: Isobologramm und Combination Index (CI) für die Proliferation von MCF-7	57
Abbildung 28: Isobologramm und Combination Index (CI) für die Proliferation von T-47D	58
Abbildung 29: Migrationsverhalten von MCF-7 bei Vinorelbin (VRL) + Apelisib	59
Abbildung 30: Migrierte Zellen MCF-7 nach Vinorelbin (VRL) + Apelisib im Lichtmikroskop	59
Abbildung 31: Migrationsverhalten von MDA-MB-231 bei Vinorelbin (VRL) + Apelisib	60
Abbildung 32: Migrierte Zellen MDA-MB-231 nach Vinorelbin (VRL) + Apelisib im Lichtmikroskop	60
Abbildung 33: Migrationsverhalten von BT-20 bei Vinorelbin (VRL) + Apelisib	61
Abbildung 34: Migrationsverhalten von BT-20 bei Vinorelbin (VRL) + Apelisib (höher dosiert)	61
Abbildung 35: Migrierte Zellen BT-20 nach Vinorelbin (VRL) + Apelisib im Lichtmikroskop	62
Abbildung 36: Migrationsverhalten von ZR-75-1 bei Vinorelbin (VRL) + Apelisib	62
Abbildung 37: Migrierte Zellen ZR-75-1 nach Vinorelbin (VRL) + Apelisib im Lichtmikroskop	63

9.3. Rohdaten

Werte der Abbildung 15

Viabilität von MCF-7, T-47D, MDA-MB-231 und BT-549 unter DMSO-Behandlung nach 7 Tagen. Absolute Werte, alamarBlue®.

Zelllinie	Versuch	Wirkstoff		
		DMSO 0 %	DMSO 0,1 %	DMSO 0,5 %
MCF-7	1	184532	192998	170144
	2	181931	195710	196777
	3	181193	194407	189372
	Mittelwerte 1-3	182552	194371	185431
T-47D	1	139899	158407	146739
	2	185764	163862	152274
	3	156171	132159	112620
	Mittelwerte 1-3	160611	151476	137211
MDA-MB-231	1	131439	122267	122628
	2	130203	149211	142962
	3	132887	173445	162459
	Mittelwerte 1-3	131509	148308	142683
BT-549	1	185384	206080	183498
	2	209282	160720	89839
	3	167656	162516	150301
	Mittelwerte 1-3	187441	176439	141213

Werte der Abbildung 16a

Viabilität von MCF-7 unter Behandlung mit niedrig dosiertem Vinorelbin und Alpelisib nach 3 Tagen. Absolute Werte, alamarBlue®.

Versuch 1		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	148668	127258	98637	78993	45059
	0,63	108262	92389	72531	57246	40065
	1,25	99206	85242	60447	52307	38667
	2,5	71181	50403	45840	47722	44585
	5	68580	52565	47001	48136	48268

Versuch 2		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	133536	105016	73586	51194	37501
	0,63	125618	90354	65902	51628	33269
	1,25	94497	67790	50800	44329	34833
	2,5	62858	41916	42220	40810	35639
	5	49127	40270	39377	39819	29834

Versuch 3		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	148898	133075	99682	66300	42274
	0,63	137366	103852	77789	58460	42404
	1,25	104655	76010	67604	54070	46259
	2,5	70703	51761	53993	48133	39621
	5	55536	49099	51117	43122	37460

Mittelwerte 1-3		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	143701	121783	90635	65495	41611
	0,63	123749	95531	72074	55778	38579
	1,25	99453	76347	59617	50235	39920
	2,5	68247	48026	47351	45555	39948
	5	57748	47311	45832	43692	38520

Werte der Abbildung 16b

Viabilität von MCF-7 unter Behandlung mit niedrig dosiertem Vinorelbin und Alpelisib nach 7 Tagen. Absolute Werte, alamarBlue®.

Versuch 1		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	171932	156772	134224	85336	54213
	0,63	156575	123534	105861	60235	38198
	1,25	164582	129838	69975	47179	35518
	2,5	96617	46486	34033	32860	33749
	5	64818	45068	33786	32744	32439

Versuch 2		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	204800	197285	146623	82155	36443
	0,63	209299	208887	117180	51994	33200
	1,25	201375	115199	69389	45259	32324
	2,5	75709	34515	35076	29220	27099
	5	43697	33893	30765	26365	23758

Versuch 3		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	195832	186462	134042	58626	33756
	0,63	199710	163641	93616	50416	29143
	1,25	164638	84324	52641	37762	28448
	2,5	57891	28548	27091	30085	27146
	5	34683	25675	25849	28169	20854

Mittelwerte 1-3		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	190855	180173	138296	75372	41470
	0,63	188528	165354	105552	54215	33513
	1,25	176865	109787	64002	43400	32097
	2,5	76739	36516	32067	30722	29331
	5	47733	34879	30133	29093	25684

Werte der Abbildung 17a

Viabilität von T-47D unter Behandlung mit niedrig dosiertem Vinorelbin und Alpelisib nach 3 Tagen. Absolute Werte, alamarBlue®.

Versuch 1		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	80389	54281	39122	33450	28740
	0,63	76222	56864	39836	34551	29530
	1,25	74489	54745	40869	35331	30123
	2,5	53461	45779	38521	34973	31955
	5	45595	39346	36097	34367	31291

Versuch 2		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	84547	69144	45773	40146	27949
	0,63	84464	66535	42006	38239	29226
	1,25	55808	50958	41849	38975	30996
	2,5	45524	44090	38620	35257	33670
	5	43481	41802	36906	34001	30155

Versuch 3		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	127768	107576	69295	59928	45274
	0,63	120912	102626	61763	57750	50231
	1,25	101499	101495	66512	58218	55567
	2,5	103714	114516	63282	57917	56769
	5	69663	62957	53792	57066	46315

Mittelwerte 1-3		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	97568	77000	51396	44508	33988
	0,63	93866	75342	47868	43513	36329
	1,25	77265	69066	49743	44175	38895
	2,5	67566	68128	46807	42716	40798
	5	52913	48035	42265	41812	35920

Werte der Abbildung 17b

Viabilität von T-47D unter Behandlung mit niedrig dosiertem Vinorelbin und Alpelisib nach 7 Tagen. Absolute Werte, alamarBlue®.

Versuch 1		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	193690	131996	51309	27559	21846
	0,63	161513	110920	45479	28850	18252
	1,25	173616	112467	45314	31685	19743
	2,5	135873	89099	38984	25025	22549
	5	50537	38569	26404	18724	18062

Versuch 2		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	167688	131956	51883	34554	22905
	0,63	161751	123510	49647	30445	21829
	1,25	91103	67587	39027	29991	19089
	2,5	50049	40309	26174	22127	18561
	5	37354	36365	26819	21836	18907

Versuch 3		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	169330	101905	44061	27552	19827
	0,63	159637	101720	41889	26309	19384
	1,25	157112	97994	39935	25411	20112
	2,5	55863	40307	30716	22301	18945
	5	33525	30204	25583	20758	19469

Mittelwerte 1-3		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	176903	121952	49084	29888	21526
	0,63	160967	112050	45672	28535	19821
	1,25	140610	92683	41425	29029	19648
	2,5	80595	56571	31958	23151	20018
	5	40472	35046	26268	20439	18813

Werte der Abbildung 18a

Viabilität von MDA-MB-231 unter Behandlung mit niedrig dosiertem Vinorelbin und Alpelisib nach 3 Tagen. Absolute Werte, alamarBlue®.

Versuch 1		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	61794	59868	61311	58838	40175
	0,63	39868	43899	43959	43084	34894
	1,25	33504	37476	40291	38419	34247
	2,5	31014	34084	37016	35147	32462
	5	30141	30392	32607	33794	33967

Versuch 2		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	61037	61061	62279	57921	43499
	0,63	37151	37972	41660	47730	34360
	1,25	35468	37574	36375	37044	32643
	2,5	32123	33268	33970	34072	30658
	5	32022	36058	35564	33582	27235

Versuch 3		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	93998	96690	91967	82006	63384
	0,63	85000	88959	83211	77337	66273
	1,25	72208	75375	74242	68481	61305
	2,5	58716	63804	64542	58519	48429
	5	49333	52239	51685	38954	48054

Mittelwerte 1-3		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	72276	72540	71852	66255	49019
	0,63	54006	56943	56276	56050	45176
	1,25	47060	50142	50303	47981	42732
	2,5	40618	43719	45176	42579	37183
	5	37165	39563	39952	35444	36419

Werte der Abbildung 18b

Viabilität von MDA-MB-231 unter Behandlung mit niedrig dosiertem Vinorelbin und Alpelisib nach 7 Tagen. Absolute Werte, alamarBlue®.

Versuch 1		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	195966	204573	212730	203997	154582
	0,63	167591	183610	189797	168018	106697
	1,25	112138	110248	111482	107902	82419
	2,5	75626	61779	75674	61911	61668
	5	46311	47854	49769	45158	32459

Versuch 2		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	190415	201873	209408	188710	151086
	0,63	179303	191257	186129	167446	131928
	1,25	123112	127872	124523	104987	85195
	2,5	65213	71850	69369	57994	45406
	5	45761	48902	47174	32827	37163

Versuch 3		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	175990	195792	193227	198392	128460
	0,63	164006	180300	178531	168474	141094
	1,25	144395	168927	165489	144328	115899
	2,5	106946	108916	108633	82607	69580
	5	48785	52832	57724	59829	41226

Mittelwerte 1-3		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	187457	200746	205122	197033	144709
	0,63	170300	185056	184819	167980	126573
	1,25	126548	135682	133831	119072	94504
	2,5	82595	80848	84559	67504	58885
	5	46953	49863	51556	45938	36949

Werte der Abbildung 19a

Viabilität von BT-549 unter Behandlung mit niedrig dosiertem Vinorelbin und Alpelisib nach 3 Tagen. Absolute Werte, alamarBlue®.

Versuch 1		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	122969	127639	132337	126233	76575
	0,63	72023	66963	74615	61329	58033
	1,25	50633	53011	56771	54179	45636
	2,5	42724	43778	43978	43596	40941
	5	35876	37301	38292	38376	35539

Versuch 2		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	129870	151122	144121	143063	103378
	0,63	79769	86351	92035	89909	68273
	1,25	48503	52903	53321	45737	40684
	2,5	31541	33365	32979	28748	23173
	5	26544	29447	30601	28361	23593

Versuch 3		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	184266	211858	185009	158958	133263
	0,63	163510	157768	181268	144048	137693
	1,25	159815	170216	187129	165647	135804
	2,5	120090	124971	134726	114968	105457
	5	102617	89677	96710	83652	66308

Mittelwerte 1-3		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	145702	163540	153822	142751	104405
	0,63	105101	103694	115973	98429	88000
	1,25	86317	92043	99074	88521	74041
	2,5	64785	67371	70561	62437	56524
	5	55012	52142	55201	50129	41813

Werte der Abbildung 19b

Viabilität von BT-549 unter Behandlung mit niedrig dosiertem Vinorelbin und Alpelisib nach 7 Tagen. Absolute Werte, alamarBlue®.

Versuch 1		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	158984	154175	108083	90233	100676
	0,63	84761	59123	61739	52318	57790
	1,25	36897	35188	34308	26389	28957
	2,5	37911	29393	28732	25951	21070
	5	28764	26160	24587	21236	20226

Versuch 2		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	193204	179814	203655	210063	163677
	0,63	166794	157263	171579	179024	150049
	1,25	89259	84116	82188	69896	60921
	2,5	40928	39740	37676	29052	22270
	5	28248	28263	29094	28376	20600

Versuch 3		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	129337	135434	147294	100354	85077
	0,63	125765	110994	106990	85354	77476
	1,25	121614	118453	103949	87382	82366
	2,5	89442	67359	76507	61516	59760
	5	45774	41367	47238	37882	28752

Mittelwerte 1-3		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	160508	156474	153011	133550	116477
	0,63	125773	109127	113436	105565	95105
	1,25	82590	79252	73482	61223	57415
	2,5	56094	45497	47638	38839	34367
	5	34262	31930	33640	29165	23193

Werte der Abbildung 23

Proliferation von MCF-7 unter Behandlung mit niedrig dosiertem Vinorelbin und Alpelisib nach 7 Tagen. Absolute Werte, alamarBlue®.

Versuch 1		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	1.9547	1.8246	1.8524	1.5434	1.6440
	0,63	1.6787	1.7305	1.8334	1.5018	1.4586
	1,25	1.5766	1.6672	1.7479	1.4288	1.3178
	2,5	1.6983	1.3884	1.1516	1.2010	1.1747
	5	1.1547	0.8139	0.8457	1.2112	0.9549

Versuch 2		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	2.3171	1.7432	0.4977	0.3298	0.2509
	0,63	0.4851	0.3175	0.1569	0.1822	0.1601
	1,25	0.6422	0.5037	0.4448	0.5569	0.3257
	2,5	0.5891	0.4870	0.6225	0.6065	0.3526
	5	0.4874	0.3758	0.3171	0.2091	0.2053

Versuch 3		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	2.0304	1.9776	1.5397	1.0369	0.7923
	0,63	1.6517	1.6548	1.3505	1.1765	0.6792
	1,25	1.9432	1.8095	1.2957	0.9525	0.8086
	2,5	1.4516	1.2976	0.9524	0.8730	0.9773
	5	1.0310	0.7616	0.5558	0.5456	0.6051

Mittelwerte 1-3		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	2.1007	1.8485	1.2966	0.9700	0.8957
	0,63	1.2718	1.2342	1.1136	0.9535	0.7659
	1,25	1.3873	1.3268	1.1628	0.9794	0.8174
	2,5	1.2463	1.0577	0.9089	0.8935	0.8348
	5	0.8910	0.6504	0.5729	0.6553	0.5884

Werte der Abbildung 24

Proliferation von T-47D unter Behandlung mit niedrig dosiertem Vinorelbin und Alpelisib nach 7 Tagen. Absolute Werte, alamarBlue®.

Versuch 1		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	2.1488	1.5954	0.4569	0.2234	0.1949
	0,63	1.4878	0.8599	0.2967	0.1855	0.2244
	1,25	0.6780	0.4150	0.3657	0.2220	0.1769
	2,5	0.3233	0.2496	0.2786	0.5723	0.3230
	5	0.5095	0.2407	0.2174	0.2276	0.2356

Versuch 2		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	2.0172	1.3280	0.5255	0.5771	0.3000
	0,63	1.1713	0.5776	0.3812	0.4877	0.1893
	1,25	0.4152	0.3466	0.3558	0.4606	0.3138
	2,5	0.4545	0.3190	0.4753	1.0658	0.3867
	5	0.4921	0.3289	0.3430	0.3938	0.3381

Versuch 3		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	1.9065	1.1586	0.3399	0.2667	0.5549
	0,63	0.9999	0.4999	0.2851	0.6307	0.2107
	1,25	0.3165	0.2233	0.1251	0.2070	0.2055
	2,5	0.4558	0.2514	0.2036	0.2476	0.2821
	5	0.5892	0.2594	0.3108	0.4386	0.5346

Mittelwerte 1-3		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	2.0242	1.3606	0.4408	0.3557	0.3499
	0,63	1.2197	0.6458	0.3210	0.4346	0.2081
	1,25	0.4699	0.3283	0.2822	0.2965	0.2321
	2,5	0.4112	0.2733	0.3192	0.6286	0.3306
	5	0.5303	0.2763	0.2904	0.3533	0.3694

Werte der Abbildung 25

Proliferation von MDA-MB-231 unter Behandlung mit niedrig dosiertem Vinorelbin und Alpelisib nach 7 Tagen. Absolute Werte, alamarBlue®.

Versuch 1		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	2.5314	2.4398	2.4106	2.3118	2.5132
	0,63	2.4882	2.3020	2.2830	2.0875	2.0943
	1,25	1.8035	1.5327	1.5152	1.5290	1.3276
	2,5	1.0104	0.9060	0.7713	1.0491	0.8719
	5	0.7420	0.8973	0.6146	0.8218	0.6292

Versuch 2		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	1.9956	1.9361	1.8266	1.6027	1.7766
	0,63	1.9436	1.9663	1.9324	1.5741	1.7226
	1,25	2.0509	1.7878	1.6260	1.3611	1.5729
	2,5	1.2141	1.2033	1.4266	1.0698	0.9349
	5	0.9114	0.9008	0.8981	0.7107	0.9505

Versuch 3		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	2.5043	2.3611	2.3384	2.3247	2.5091
	0,63	2.1935	1.9351	1.8294	2.1522	1.7946
	1,25	1.4151	1.3649	1.1668	1.3357	1.1150
	2,5	0.8641	0.8600	0.7544	0.8227	0.7243
	5	0.6786	0.6370	0.5966	0.6937	0.5682

Mittelwerte 1-3		Alpelisib (ng/ml)				
		0	10	100	500	1.000
Vinorelbin (ng/ml)	0	2.3438	2.2457	2.1919	2.0797	2.2663
	0,63	2.2084	2.0678	2.0149	1.9379	1.8705
	1,25	1.7565	1.5618	1.4360	1.4086	1.3385
	2,5	1.0295	0.9898	0.9841	0.9806	0.8437
	5	0.7773	0.8117	0.7031	0.7421	0.7160

Werte der Abbildung 29

Migration von MCF-7 unter Behandlung mit niedrig dosiertem Vinorelbin und Alpelisib nach 7 Tagen. Absolute Zellzahlen, Boydenkammer.

Versuch 1	Zellzahl (Summen aus 10 Gesichtsfeldern pro Vial)	Zellzahl (Mittelwert aus 4 Vials)
Kontrolle RPMI 1640 + Chemotaxin	963	835
	864	
	880	
	633	
Vinorelbin 1,25 ng/ml	238	283
	428	
	230	
	237	
Alpelisib 100 ng/ml	882	774
	950	
	682	
	583	
Vinorelbin 1,25 ng/ml + Alpelisib 100 ng/ml	252	287
	258	
	386	
	250	

Versuch 2	Zellzahl (Summen aus 10 Gesichtsfeldern pro Vial)	Zellzahl (Mittelwert aus 4 Vials)
Kontrolle RPMI 1640 + Chemotaxin	718	657
	749	
	505	
	655	
Vinorelbin 1,25 ng/ml	200	174
	154	
	186	
	154	
Alpelisib 100 ng/ml	470	419
	354	
	396	
	455	
Vinorelbin 1,25 ng/ml + Alpelisib 100 ng/ml	198	219
	260	
	261	
	155	

Versuch 3	Zellzahl (Summen aus 10 Gesichtsfeldern pro Vial)	Zellzahl (Mittelwert aus 4 Vials)
Kontrolle RPMI 1640 + Chemotaxin	1.038	960
	812	
	856	
	1.134	
Vinorelbin 1,25 ng/ml	510	388
	393	
	262	
	9 ¹⁾	
Alpelisib 100 ng/ml	534	565
	493	
	623	
	611	
Vinorelbin 1,25 ng/ml + Alpelisib 100 ng/ml	363	246
	209	
	251	
	160	
1) Ausreißer, Vial praktisch ohne Zellen. Ausreißer wird eliminiert. Mittelwertbildung aus 3 anstatt 4 Vials.		

Versuch 4	Zellzahl (Summen aus 10 Gesichtsfeldern pro Vial)	Zellzahl (Mittelwert aus 4 Vials)
Kontrolle RPMI 1640 + Chemotaxin	523	628
	945	
	850	
	194	
Vinorelbin 1,25 ng/ml	380	391
	438	
	311	
	436	
Alpelisib 100 ng/ml	378	450
	591	
	467	
	363	
Vinorelbin 1,25 ng/ml + Alpelisib 100 ng/ml	175	250
	331	
	274	
	221	

Versuche 1-4	Zellzahl (Mittelwerte der Versuche 1-4)	Zellzahl (Mittelwert aus 4 Versuchen)
Kontrolle RPMI 1640 + Chemotaxin	835	770
	657	
	960	
	628	
Vinorelbin 1,25 ng/ml	283	309
	174	
	388	
	391	
Alpelisib 100 ng/ml	774	552
	419	
	565	
	450	
Vinorelbin 1,25 ng/ml + Alpelisib 100 ng/ml	287	250
	219	
	246	
	250	

Rohdaten der Abbildung 31

Migration von MDA-MB-231 unter Behandlung mit niedrig dosiertem Vinorelbin und Alpelisib nach 7 Tagen. Absolute Zellzahlen, Boydenkammer.

Versuch 1	Zellzahl (Summen aus 10 Gesichtsfeldern pro Vial)	Zellzahl (Mittelwert aus 4 Vials)
Kontrolle RPMI 1640 + Chemotaxin	1.326	1.018
	1.047	
	701	
	999	
Vinorelbin 1,25 ng/ml	972	712
	750	
	560	
	564	
Alpelisib 100 ng/ml	495	851
	1.197	
	722	
	990	
Vinorelbin 1,25 ng/ml + Alpelisib 100 ng/ml	866	698
	581	
	557	
	788	

Versuch 2	Zellzahl (Summen aus 10 Gesichtsfeldern pro Vial)	Zellzahl (Mittelwert aus 4 Vials)
Kontrolle RPMI 1640 + Chemotaxin	1.328	1.116
	1.253	
	993	
	889	
Vinorelbin 1,25 ng/ml	748	675
	651	
	649	
	653	
Alpelisib 100 ng/ml	920	796
	1.002	
	643	
	620	
Vinorelbin 1,25 ng/ml + Alpelisib 100 ng/ml	776	616
	532	
	571	
	584	

Versuch 3	Zellzahl (Summen aus 10 Gesichtsfeldern pro Vial)	Zellzahl (Mittelwert aus 4 Vials)
Kontrolle RPMI 1640 + Chemotaxin	1.066	875
	888	
	1.237	
	307	
Vinorelbin 1,25 ng/ml	809	685
	789	
	840	
	303	
Alpelisib 100 ng/ml	931	978
	883	
	1.107	
	992	
Vinorelbin 1,25 ng/ml + Alpelisib 100 ng/ml	907	798
	758	
	808	
	720	

Versuch 4	Zellzahl (Summen aus 10 Gesichtsfeldern pro Vial)	Zellzahl (Mittelwert aus 4 Vials)
Kontrolle RPMI 1640 + Chemotaxin	283	819
	926	
	920	
	1.145	
Vinorelbin 1,25 ng/ml	525	579
	607	
	646	
	537	
Alpelisib 100 ng/ml	1.048	932
	1.070	
	677	
	136 ¹⁾	
Vinorelbin 1,25 ng/ml + Alpelisib 100 ng/ml	414	621
	747	
	703	
	0 ²⁾	
<p>1) Ausreißer, außerhalb der unteren Ausreißerschranke nach 3s-Regel. Ausreißer wird eliminiert. Mittelwertbildung aus 3 anstatt 4 Vials.</p> <p>2) Ausreißer, Vial ohne Zellen. Ausreißer wird eliminiert. Mittelwertbildung aus 3 anstatt 4 Vials.</p>		

Versuche 1-4	Zellzahl (Mittelwerte der Versuche 1-4)	Zellzahl (Mittelwert aus 4 Versuchen)
Kontrolle RPMI 1640 + Chemotaxin	1.018	957
	1.116	
	875	
	819	
Vinorelbin 1,25 ng/ml	712	663
	675	
	685	
	579	
Alpelisib 100 ng/ml	851	889
	796	
	978	
	932	
Vinorelbin 1,25 ng/ml + Alpelisib 100 ng/ml	698	683
	616	
	798	
	621	

Rohdaten der Abbildung 33

Migration von BT-20 unter Behandlung mit niedrig dosiertem Vinorelbin und Alpelisib nach 7 Tagen. Absolute Zellzahlen, Boydenkammer.

Versuch 1	Zellzahl (Summen aus 10 Gesichtsfeldern pro Vial)	Zellzahl (Mittelwert aus 4 Vials)
Kontrolle RPMI 1640 + Chemotaxin	1.360	1.106
	1.135	
	970	
	958	
Vinorelbin 1,25 ng/ml	1.015	1.037
	1.104	
	1.128	
	900	
Alpelisib 100 ng/ml	1.067	891
	1.009	
	826	
	663	
Vinorelbin 1,25 ng/ml + Alpelisib 100 ng/ml	924	916
	1.066	
	858	
	817	

Versuch 2	Zellzahl (Summen aus 10 Gesichtsfeldern pro Vial)	Zellzahl (Mittelwert aus 4 Vials)
Kontrolle RPMI 1640 + Chemotaxin	954	826
	812	
	841	
	697	
Vinorelbin 1,25 ng/ml	741	804
	784	
	956	
	734	
Alpelisib 100 ng/ml	784	759
	509	
	865	
	878	
Vinorelbin 1,25 ng/ml + Alpelisib 100 ng/ml	680	697
	765	
	775	
	568	

Versuch 3	Zellzahl (Summen aus 10 Gesichtsfeldern pro Vial)	Zellzahl (Mittelwert aus 4 Vials)
Kontrolle RPMI 1640 + Chemotaxin	1.279	1.369
	1.561	
	1.641	
	996	
Vinorelbin 1,25 ng/ml	1.024	1.290
	2.078	
	1.417	
	642	
Alpelisib 100 ng/ml	1.019	1.172
	1.116	
	1.382	
	135 ¹⁾	
Vinorelbin 1,25 ng/ml + Alpelisib 100 ng/ml	891	949
	790	
	1.286	
	830	

1) Ausreißer, außerhalb der unteren Ausreißerschranke nach 3s-Regel. Ausreißer wird eliminiert. Mittelwertbildung aus 3 anstatt 4 Vials.

Versuch 4	Zellzahl (Summen aus 10 Gesichtsfeldern pro Vial)	Zellzahl (Mittelwert aus 4 Vials)
Kontrolle RPMI 1640 + Chemotaxin	1.040	959
	1.033	
	898	
	865	
Vinorelbin 1,25 ng/ml	635	853
	854	
	1.000	
	921	
Alpelisib 100 ng/ml	1.101	889
	969	
	957	
	529	
Vinorelbin 1,25 ng/ml + Alpelisib 100 ng/ml	895	902
	878	
	930	
	905	

Versuche 1-4	Zellzahl (Mittelwerte der Versuche 1-4)	Zellzahl (Mittelwert aus 4 Versuchen)
Kontrolle RPMI 1640 + Chemotaxin	1.106	1.065
	826	
	1.369	
	959	
Vinorelbin 1,25 ng/ml	1.037	996
	804	
	1.290	
	853	
Alpelisib 100 ng/ml	891	928
	759	
	1.172	
	889	
Vinorelbin 1,25 ng/ml + Alpelisib 100 ng/ml	916	866
	697	
	949	
	902	

Rohdaten der Abbildung 34

Migration von BT-20 unter Behandlung mit niedrig dosiertem Vinorelbin und Alpelisib nach 7 Tagen. Perspektivische Austestung höherer Konzentrationen für die Zelllinie BT-20 mit n=2. Absolute Zellzahlen, Boydenkammer.

Versuch 1	Zellzahl (Summen aus 10 Gesichtsfeldern pro Vial)	Zellzahl (Mittelwert aus 4 Vials)
Kontrolle RPMI 1640 + Chemotaxin	1.151	1.385
	1.623	
	1.394	
	1.373	
Vinorelbin 2,5 ng/ml	1.069	1.158
	1.129	
	1.295	
	1.139	
Alpelisib 500 ng/ml	407	535
	583	
	684	
	464	
Vinorelbin 2,5 ng/ml + Alpelisib 500 ng/ml	305	224
	127	
	295	
	169	

Versuch 2	Zellzahl (Summen aus 10 Gesichtsfeldern pro Vial)	Zellzahl (Mittelwert aus 4 Vials)
Kontrolle RPMI 1640 + Chemotaxin	1.196	1.320
	1.454	
	1.380	
	1.251	
Vinorelbin 2,5 ng/ml	1.252	1.099
	1.102	
	970	
	1.070	
Alpelisib 500 ng/ml	320	355
	314	
	247	
	539	
Vinorelbin 2,5 ng/ml + Alpelisib 500 ng/ml	222	259
	224	
	245	
	343	

Versuche 1-2	Zellzahl (Mittelwerte der Versuche 1-2)	Zellzahl (Mittelwert aus 2 Versuchen)
Kontrolle RPMI 1640 + Chemotaxin	1.385	1.353
	1.320	
Vinorelbin 2,5 ng/ml	1.158	1.128
	1.099	
Alpelisib 500 ng/ml	535	445
	355	
Vinorelbin 2,5 ng/ml + Alpelisib 500 ng/ml	224	241
	259	

Rohdaten der Abbildung 36

Migration von ZR-75-1 unter Behandlung mit niedrig dosiertem Vinorelbin und Alpelisib nach 7 Tagen. Absolute Zellzahlen, Boydenkammer.

Versuch 1	Zellzahl (Summen aus 10 Gesichtsfeldern pro Vial)	Zellzahl (Mittelwert aus 4 Vials)
Kontrolle RPMI 1640 + Chemotaxin	406	360
	303	
	430	
	302	
Vinorelbin 1,25 ng/ml	308	270
	277	
	273	
	221	
Alpelisib 100 ng/ml	462	228
	270	
	120	
	58	
Vinorelbin 1,25 ng/ml + Alpelisib 100 ng/ml	278	212
	284	
	127	
	157	

Versuch 2	Zellzahl (Summen aus 10 Gesichtsfeldern pro Vial)	Zellzahl (Mittelwert aus 4 Vials)
Kontrolle RPMI 1640 + Chemotaxin	437	398
	380	
	348	
	427	
Vinorelbin 1,25 ng/ml	309	259
	317	
	196	
	214	
Alpelisib 100 ng/ml	180	228
	304	
	235	
	191	
Vinorelbin 1,25 ng/ml + Alpelisib 100 ng/ml	168	223
	266	
	179	
	277	

Versuch 3	Zellzahl (Summen aus 10 Gesichtsfeldern pro Vial)	Zellzahl (Mittelwert aus 4 Vials)
Kontrolle RPMI 1640 + Chemotaxin	323	352
	162	
	382	
	541	
Vinorelbin 1,25 ng/ml	319	265
	302	
	150	
	290	
Alpelisib 100 ng/ml	460	307
	245	
	0 ¹⁾	
	217	
Vinorelbin 1,25 ng/ml + Alpelisib 100 ng/ml	437	263
	123	
	279	
	211	
1) Ausreißer, Vial ohne Zellen. Ausreißer wird eliminiert. Mittelwertbildung aus 3 anstatt 4 Vials.		

Versuch 4	Zellzahl (Summen aus 10 Gesichtsfeldern pro Vial)	Zellzahl (Mittelwert aus 4 Vials)
Kontrolle RPMI 1640 + Chemotaxin	444	399
	322	
	413	
	417	
Vinorelbin 1,25 ng/ml	223	354
	289	
	692	
	210	
Alpelisib 100 ng/ml	263	252
	248	
	289	
	207	
Vinorelbin 1,25 ng/ml + Alpelisib 100 ng/ml	207	188
	256	
	110	
	180	

Versuche 1-4	Zellzahl (Mittelwerte der Versuche 1-4)	Zellzahl (Mittelwert aus 4 Versuchen)
Kontrolle RPMI 1640 + Chemotaxin	360	377
	398	
	352	
	399	
Vinorelbin 1,25 ng/ml	270	287
	259	
	265	
	354	
Alpelisib 100 ng/ml	228	254
	228	
	307	
	252	
Vinorelbin 1,25 ng/ml + Alpelisib 100 ng/ml	212	221
	223	
	263	
	188	

9.4. Dissertationsbezogene Publikation

Krajnak, S., Trier, J. P., Heinzmann, P. F., Anic, K., Heimes, A.-S., Loewe, A., Schmidt, M., Battista, M. J., Hasenburg, A., & Brenner, W. (2023). Anti-tumor effects of low-dose metronomic vinorelbine in combination with alpelisib in breast cancer cells. *EXCLI Journal*, 22, 114–130.

10. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz besonders bei ... für die Überlassung des Dissertationsthemas und ihre außerordentlich zuverlässige Betreuung bedanken. Bei Fragen und Problemen stand sie mir mit konstruktiver Kritik und einer empathisch-motivierenden Art jederzeit unterstützend zur Seite. Des Weiteren möchte ich mich bei ... als meinen zweiten Betreuer bedanken. Insbesondere zur Einordnung der Arbeit in den klinischen Kontext war er für mich jederzeit ansprechbar. Ferner möchte ich mich bei ... für die Annahme meiner Dissertation als zweiten Gutachter bedanken. Ich möchte mich weiterhin bei Novartis Pharma für die finanzielle Unterstützung des Forschungsprojekts bedanken, in welchem meine Arbeit eingebettet war.

Während meiner Einarbeitungsphase in der Arbeitsgruppe nahmen sich ... und ... viel Zeit, um mir auf geduldige Weise die Laborarbeit näherzubringen. Auch über die gesamte Zeit meiner Doktorarbeit hinweg reagierten sie bei Schwierigkeiten in den Versuchen verständnisvoll und stets hilfsbereit. Ihre Erfahrungen halfen mir im Laboralltag sehr weiter, wofür ich mich bedanke.

Ich bedanke mich außerdem bei allen anderen Forschenden des Labors für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen bereichernden Gespräche sowie die gegenseitige Motivation in frustrierenden Arbeitsphasen.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich sowohl während des Medizinstudiums als auch der Doktorarbeit in meinen Vorhaben durchweg unterstützte. Hervorzuheben ist dabei meine Lebensgefährtin ..., die mir von Beginn an moralisch zur Seite stand. Für die vielen Stunden, die ich im Labor arbeitete, brachte sie außerordentlich großes Verständnis auf.

11. Tabellarischer Lebenslauf

