

**Untersuchungen zum Einfluss von Pictilisib,
Pazopanib und Sorafenib auf Migrationsvermögen und
Aktivität von Rac1 in Medulloblastom-Zellen *in vitro***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Leonie Franziska Schön

aus Wiesbaden

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachterin: Prof. Dr. med. Dagmar Dilloo
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Herrlinger

Tag der Mündlichen Prüfung: 13.01.2025

Aus dem Zentrum für Kinderheilkunde, Abteilung Pädiatrische Hämatologie und
Onkologie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Deutsche Zusammenfassung	5
1.1 Einleitung	5
1.2 Material und Methoden	14
1.3 Ergebnisse	15
1.4 Diskussion	20
1.5 Zusammenfassung	25
1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	26
2. Veröffentlichung	35
Abstract	35
Introduction	36
Materials and Methods	36
Results	38
Discussion	43
References	47
3. Danksagung	49

Abkürzungsverzeichnis

AKT	Protein Kinase B
CRIB	Cdc42/Rac1 interactive binding
Cdc42	Cell division control protein 42 homolog
Erk	Extracellular-signal regulated kinase
FGFR	Fibroblast derived growth factor receptor
gCIS	Genecentric common insertion site
GST	Glutathion-S transferase
GTP	Guanosintriphosphate
MAPK	Mitogen activated protein kinase
PDGFR	Platelet derived growth factor receptor
Pak1	p21-activated kinase
PI3K	Phosphoinositid-3 kinase
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RAS	Rat sarcoma
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma
Rho	Ras-homolog
SHH	Sonic Hedgehog
TP53	Tumor Protein p53
WNT	Wingless

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Das Medulloblastom, der zweithäufigste maligne ZNS-Tumor im Kindesalter

Das Medulloblastom ist der zweithäufigste maligne Tumor des zentralen Nervensystems im Kindesalter. Der Tumor macht ungefähr 20 % aller primären Hirntumoren im Kindesalter aus, wobei etwa 70 % der betroffenen Kinder jünger als zehn Jahre sind. Jungen sind 1,7-mal häufiger betroffen als Mädchen. Es wird angenommen, dass Medulloblastome im Rahmen der frühen kindlichen Hirnentwicklung entstehen und daher vor allem im Kindesalter auftreten. Lediglich ein Viertel der Fälle wird im Erwachsenenalter diagnostiziert. Das Medulloblastom ist im vierten Ventrikel oder dem zerebellaren Parenchym lokalisiert und wird als WHO-Grad 4 Tumor angesehen (Juraschka und Taylor, 2019; MacDonald et al., 2014; Northcott et al., 2012; Packer et al., 1999; Schwalbe et al., 2017; Vladoiu et al., 2019).

In etwa 11 % der Medulloblastom-Fälle kann eine Keimbahnmutation nachgewiesen werden. Die häufigsten Mutationen finden sich dabei in den Genen *APC*, *BRCA2*, *PALB2*, *PTCH1*, *SUFU* und *TP53* (Waszak et al., 2018). Drei sind dabei besonders zu erwähnen: Eine Mutation im Tumorsuppressorgen *TP53*, die sich beim Li-Fraumeni-Syndrom findet, erhöht das Risiko an einem Medulloblastom zu erkranken. Bei Vorliegen einer Mutation im *APC*-Gen, das dem WNT Signalweg zugehörig ist, finden sich Medulloblastome neben einer familiären Polyposis im Rahmen des Turcot-Syndroms. Bei einer Mutation des *PTCH1*-Gens beim Gorlin-Syndrom, kommen Medulloblastome ebenfalls im Kindesalter gehäuft vor (Juraschka und Taylor, 2019).

Molekulargenetische Gruppeneinteilung

Das Medulloblastom bezeichnet als Oberbegriff unterteilbare Tumorguppen, die von unterschiedlichen Zellpopulationen des Kleinhirns auszugehen scheinen (Waszak et al.,

2018). Für das Medulloblastom wird ebenso wie für andere Tumorarten angenommen, dass ähnliche Transkriptome die Grundlage für biologisch ähnliches Verhalten darstellen, mit vergleichbaren Prognosen assoziiert sind und eine Grundlage für zielgerichtete Therapien darstellen. In der WHO-Klassifikation von 2007 wurden Medulloblastome noch auf Basis des vorliegenden histologischen Musters unterteilt. Histologisch werden ein klassisches, ein desmoplastisches/noduläres, ein extensiv noduläres und ein großzelliges/anaplastisches Wachstumsmuster unterschieden. Nachdem mehrere voneinander unabhängige Studien vier distinkte Gruppen beschrieben hatten, ist seit der WHO-Klassifikation von 2016 eine zusätzliche Einteilung anhand molekularer Charakteristika vorgesehen. In der aktuellen Fassung der WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2021 werden fünf Gruppen unterschieden und zum Teil in weitere Untergruppen eingeteilt (Cho et al., 2011; Kool et al., 2012; Louis et al., 2016; Northcott et al., 2011; Northcott et al., 2012; Taylor et al., 2012).

Aktuell werden folgende Gruppen unterschieden: WNT-aktiviert, SHH-aktiviert TP53-Wildtyp, SHH-aktiviert TP53-mutiert, die non-WNT/non-SHH Gruppe 3 und die non-WNT/non-SHH Gruppe 4. Innerhalb der beiden SHH-Gruppen sind jeweils vier weitere Untergruppen beschrieben. Die non-WNT/non-SHH Gruppen wurden zudem jeweils um acht weitere Untergruppen ergänzt. Diese neue Unterteilung reflektiert Ergebnisse großer Kohortenstudien, in denen weitere Gruppen mittels genetischer und epigenetischer Analysen identifiziert wurden (Cavalli et al., 2017; Louis et al., 2021; Northcott et al., 2017; Schwalbe et al., 2017; Sharma et al., 2019).

Gruppencharakteristika, Risikostratifizierung und Prognose

Medulloblastome der WNT-Gruppe stellen die kleinste Gruppe dar und weisen eine gute Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von über 90 % auf. Mutationen im β -Catenin codierenden CTNNB1 Gen sind die namensgebenden Mutationen dieser Gruppe (Northcott et al., 2012; Pietsch et al., 2014; Schwalbe et al., 2017).

Tumore der SHH-Gruppe zeigen ohne das Vorliegen einer TP53 Mutation eine intermediäre Prognose, die 5-Jahres-Überlebensrate ist im Vergleich zu denen der WNT-Gruppe

mit 60 % reduziert. Man findet somatische Mutationen der Gene PTCH1, SMO, SUFU und GLI1 oder 2, die Akteure im Sonic Hedgehog-Signalweg sind (Northcott et al., 2017; Schwalbe et al., 2017). Eine weitere Gruppe bilden Tumore der SHH-Gruppe mit einer TP53 Mutation. Diese Gruppe umfasst etwa 10 % aller Medulloblastom-Fälle und weist vor allem beim Vorliegen einer Keimbahnmutation oder dem gleichzeitigen Vorliegen einer MYCN-Amplifikation, eine schlechte Prognose mit einer Überlebenswahrscheinlichkeit von deutlich unter 50 % auf (Zhukova et al., 2013; Ramaswamy et al., 2016).

Die Tumoren der non-WNT/non-SHH Gruppen 3 und 4 machen zusammen 60 % aller Medulloblastom-Fälle aus. Die Überlebensrate in dieser Gruppe ist ebenfalls deutlich reduziert und liegt bei 20 bis 30 %. In dieser Gruppe werden die transkriptional und epigenetisch distinkten Gruppen non-WNT/non-SHH 3 und 4 zusammengefasst, die sich einige Gemeinsamkeiten teilen. Dazu gehören Hinzugewinnung der Chromosomen 7, 17q und 18 sowie den Verlust der Chromosomen 8, 11p und des X-Chromosoms. Die am häufigsten auffindbare Chromosomenaberration ist das Vorliegen eines Isochromosoms 17q. Außerdem finden sich für diese Gruppe exklusive Strukturvarianten in den Protoonkogenen GF11 und GF11B. Analysen der DNS-Methylierung von non-WNT/non-SHH Tumormustern ließen eine Unterteilung in insgesamt acht weitere Untergruppen zu, wobei sich in manchen der Gruppen auch Tumore fanden, die sowohl Merkmale von Gruppe 3 und Gruppe 4 Tumoren aufwiesen (Sharma et al., 2019). Spezielles Merkmal von Tumoren der Gruppe 3 ist eine in bis zu 20 % der Fälle vorliegende MYC-Amplifikation, welche in solchen der Gruppe 4 eher selten zu finden ist. Das Vorliegen dieser Amplifikation ist mit einer niedrigen 5-Jahres-Überlebensrate assoziiert (Cavalli et al., 2016; Korshunov, Northcott et al., 2011; Northcott et al., 2012; Ramaswamy et al., 2016; Schwalbe et al., 2017; Sharma et al., 2019).

Risikobasierte Therapie-Stratifizierung

Neben der molekularen Gruppenzuordnung des Tumors spielen vor allem das Ergebnis der primären neurochirurgischen Tumoresektion und das Vorliegen etwaiger Metastasen eine entscheidende prognostische Rolle (Northcott et al., 2012; Ramaswamy et al., 2016; Zapotocky et al., 2017; Zeltzer et al., 1999). Da das Medulloblastom lokal infiltrativ wächst,

kann es nach onkologischen Gesichtspunkten zumeist nicht vollständig reseziert und nicht ohne adjuvante Therapie geheilt werden. Die Wahl der komplementären Strahlen- und Chemotherapie ist abhängig von Risikostatus und Alter des betroffenen Kindes.

Patienten mit einer bekannten Metastasierung und einer Resttumormasse größer/gleich $1,5 \text{ cm}^2$ gelten, ebenso wie Patienten die jünger als drei Jahre sind, als Hochrisikopatienten und erhalten eine höhere Dosis Chemotherapie. Diese wird bei Kindern, die älter als drei Jahre sind, um eine kraniospinale Strahlentherapie ergänzt. Die Heilungsrate dieser optimierten Behandlungsstrategie liegt bei etwa 70 bis 80 %, verringert sich jedoch beim Vorliegen von Metastasen auf einen Wert von 30 bis 40 % (Juraschka und Taylor, 2019). Ein Mehrwert einer „second look“-Operation, insbesondere auch bei Tumoren mit hohem Risikoprofil, konnte nicht belegt werden (Thompson et al., 2016).

Das Verhindern der Metastasierung sowie die Behandlung von bereits bestehenden Metastasen stellen die höchste Hürde bei der Behandlung maligner Neoplasien dar. Trotz dieser zentralen prognostischen Bedeutung ist der Metastasierungsprozess von Medulloblastomen bisher unzureichend untersucht (Fults et al., 2019). Auf Basis der Erkenntnisse der molekularen Analysen bedarf es einer Anpassung bzw. Neuausrichtung des komplementären Therapieregimes, da diese eine differenziertere Stratifizierung der benötigten Therapie-Intensität ermöglichen (Juraschka und Taylor, 2019; Hovestadt et al., 2020). Die Akut- und Langzeitfolgen der intensiven Chemo- und insbesondere auch der Strahlentherapie für die oft sehr jungen Patienten, stellen einen dringlichen Grund zur fortlaufenden Optimierung des therapeutischen Vorgehens dar (Boman et al., 2013; Moxon-Emre et al., 2016; Packer et al., 2013; Spiegler et al., 2004).

Metastasierungsprozess und Angriffspunkte für zielgerichtete Therapien

In einer 2017 veröffentlichten Studie fanden sich in 23 % der erstdiagnostizierten Medulloblastom-Fälle Metastasen (Zapotocky et al., 2017). Die am häufigsten metastasierten Tumoren gehören dabei den non-WNT/non-SHH Gruppe 3 und 4 an, während Tumoren der SHH-Gruppe eher zu lokalen Rezidiven neigen. Noch seltener entwickelten sich Metastasen in Tumoren der WNT-Gruppe (Ramaswamy et al., 2013; Schwalbe et al.,

2017; Zapotocky et al., 2017). Metastasen unterscheiden sich sowohl im Maus-Modell als auch im Menschen in ihren molekularen Eigenschaften stark vom Primärtumor, auch wenn die Gruppen-Zugehörigkeit über den Prozess der Metastasierung hinaus erhalten bleibt. Hingegen gleichen sich Metastasen und Rezidiv-Tumoren auf molekularer Ebene. Es wird daher angenommen, dass sowohl Metastasen als auch Rezidive von einer molekularen Unterpopulation des Primärtumors abstammen (Morrissy et al., 2016; Ramaswamy et al., 2013; Wu et al., 2012). Retrospektive Analysen wiesen ferner gruppenspezifische Metastasierungsmuster der molekularen Untergruppen nach. Während Metastasen von Tumoren der non-WNT/non-SHH Gruppe 3 ein laminares Wachstumsmuster zeigten, zeichneten sich Metastasen von solchen der non-WNT/non-SHH Gruppe 4 durch ein noduläres Wachstumsmuster aus. Supraselläre Metastasen fanden sich in dieser Studie ebenfalls exklusiv in Tumoren der Gruppe 4. Die Untersuchungen dieser Studie zeigten ferner, dass bei Tumoren der non-WNT/non-SHH Gruppe 3 vergleichsweise kleine Primärtumoren bei bereits bestehender Metastasierung vorliegen, so dass die Annahme nahe liegt, dass Tumoren dieser Gruppe besonders früh metastasieren. Für die verschiedenen Tumoruntergruppen sind ferner spezifische Entstehungslokalisationen beschrieben und auch für Metastasen werden spezifische Lokalisationen berichtet (Zapotocky et al., 2017).

Medulloblastom-Metastasen bilden sich nahezu ausschließlich entlang der Leptomeninx, Metastasen außerhalb des ZNS sind selten und treten dann am häufigsten im Knochenmark auf (Rochkind et al., 1991; Fults et al., 2019). Lange Zeit wurde aufgrund dieses Verteilungsmusters der Metastasen angenommen, dass das Medulloblastom ausschließlich über die Liquor-Wege metastasiert. Jedoch konnte im Maus-Modell auch eine hämatogene Ausbreitung nachvollzogen werden. (Garzia et al., 2018) Es wurde für das Medulloblastom ein Modell der leptomeningealen Disseminierung vorgeschlagen, welches sich an dem der hämatogenen Metastasierungsrouten orientiert (Fults et al., 2019). Dabei unterteilen die Autoren drei Schritte: die Initiierung, die Dispersion und die Kolonisation. Zunächst erhöht sich die Motilität und Invasivität der Tumorzellen, was die Zellen in einen Stammzell-ähnlichen Zustand versetzt. Dies führt dazu, dass die Tumorzellen sich von der primären Tumormasse lösen und in den Liquor übergehen (Initiierung). Im

nächsten Schritt bewegen sich die Tumorzellen durch die Liquorräume, in denen sie verschiedenen Zelltod auslösenden Effekten entgehen müssen (Dispersion). Im letzten Schritt siedeln sich die Tumorzellen entlang der Leptomeninx an und bilden dort eine Metastase (Kolonisation). Jeder dieser Teilschritte kann als potenziell angreifbarer Vorgang angesehen werden, um einer Metastasen-Entstehung entgegenzuwirken.

Molekulare Regulation der Metastasierung

Es wurden inzwischen mehrere Signalwege im Medulloblastom beschrieben, die in die Bildung von Metastasen involviert sind und als mögliche Angriffspunkte für zielgerichtete Therapien diskutiert werden. Unter anderem wurde festgestellt, dass der Platelet-derived-growth-factor Rezeptor (PDGFR) in metastasierten Primärtumoren häufig überexprimiert ist und seine Stimulation die Migration der Tumorzellen *in vitro* begünstigt (Abouantoun et al., 2011; Gilbertson und Clifford, 2003; Gilbertson et al., 2006; MacDonald et al., 2001). Das für den PDGFR-alpha kodierende Gen PDGFR α wurde außerdem als eine gCIS (gene-centric common insertion site) sowohl in Primärtumoren als auch Metastasen identifiziert und scheint somit eine zentrale Rolle in der Pathogenese des Medulloblastoms und bei der Entstehung von Metastasen zu spielen (Wu et al., 2012).

Der PDGFR-Signalweg sowie weitere Signalwege beeinflussen Mitglieder des Ras/MAPK-Signalwegs. Teil dieser Signalkaskade ist auch Erk 1/2, welches im Medulloblastom hochreguliert ist und dessen vielfältige Rolle in der Invasion und Migration von Medulloblastomen in mehreren Studien belegt und analysiert wurde (Schönholzer et al., 2020; van Ommeren et al., 2020; Włodarski et al., 2006; Yuan et al., 2010). Darüber hinaus sind auch Mitglieder des Phosphoinositid-3-Kinase-Signalswegs (PI3K) wie Akt in Medulloblastomen häufig hochreguliert und sind sowohl in der Pathogenese des Medulloblastoms als auch in der Tumorzellmigration von Belang. Proliferation und Migration werden durch die Hemmung der PI3K Aktivität gleichermaßen verringert (Arcaro und Guerreiro, 2007; Guerreiro et al., 2008; Hartmann et al., 2006; van Ommeren et al., 2020; Włodarski et al., 2006). Neben einer Aktivierung des PI3K-Signalwegs durch eine gesteig-

gerte Aktivität der Tyrosinkinasen wird auch durch den im Medulloblastom vermehrt vorkommenden Verlust des auf Chromosom 10q lokalisierten Tumorsuppressorgens PTEN die Aktivität des PI3K-Signalwegs erhöht (Hartmann et al., 2006; Northcott et al., 2012).

Bei einer medikamentösen Inhibition der zuvor genannten Signalwege kommt es zu einer Reduktion der Zellmigration, die mit Veränderungen des Zytoskeletts einhergeht (Abouantoun et al., 2011; Dudu et al., 2012; Gilbertson und Clifford, 2003; Guerreiro et al., 2008; MacDonald et al., 2001). Zentrale Funktionen der Zytoskelett-Organisation, wie Zellfortbewegung, Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und Adhäsion, werden durch kleine Rho-GTPasen gesteuert. Auch im neoplastischen Zellmetabolismus wird ihnen eine Rolle zugeschrieben (Kazanietz und Caloca, 2017). Für die Rho-GTPase Rac1 wurde eine erhöhte Aktivität in vielen malignen Tumoren dokumentiert. In verschiedenen Tumorentitäten konnte eine Korrelation dieser übermäßigen Aktivierung mit einer erhöhten Invasionstiefe und Metastasierungsrate assoziiert werden (De et al., 2019; Parri und Chiarugi 2010; Porter et al., 2016). Die Ursachen für die erhöhte Aktivität sind mannigfaltig und schließen unter anderem eine Überexpression oder Aktivierung vorgeschalteter Signalwege, *Gain-of-function* Mutationen und eine abnorme intrazelluläre Verteilung mit ein (De et al., 2019). Rac1 stellt dabei ein Schlüsselement in mehreren Signalwege dar, die unter anderem die Zellmigration, die Zellproliferation aber auch Resistenzmechanismen betreffen. Es gilt daher als ein vielversprechender Angriffspunkt für zielgerichtete Therapien (De et al., 2019; Tan et al., 2020).

Eine Reihe von *in vitro* Untersuchungen konnten die Relevanz der kleinen Rho GTPase Rac1 auch für die Migration von Medulloblastom-Zellen demonstrieren (Chen et al., 2011; Yuan et al., 2010; Zavarella et al., 2009). Auf die Aktivierung des PDGFR folgte eine erhöhte Migrationsrate, die mit erhöhten Leveln von aktiven Erk, Rac1 und Pak1 assoziiert ist (Yuan et al., 2010). Ebenso führt die Transfektion mit konstitutiv aktiven Rac1 zu einer höheren Invasionsrate (Chen et al., 2011). Eine Überexpression von Rac1 wurde in Medulloblastom-Tumorbiopsien und -Zelllinien nachgewiesen, unter anderem auch für die in der vorliegenden Studie untersuchte Zelllinie Daoy (Chen et al., 2011; Zavarella et al., 2009). In über 90 Medulloblastom-Proben von Primärtumoren konnte außerdem eine ver-

mehrte Phosphorylierung von Pak1, welches direkt von Rac1 aktiviert wird, mit einer verringerten 5-Jahres Überlebensrate assoziiert werden (Yuan et al., 2010). Die gezielte Inhibition von Rac1 mittels shRNA, Gen-Transfektion und der Einsatz von spezifischen Rac1-Inhibitoren führten in mehreren Studien zu einer starken Beeinträchtigung der Migration und wirkten sich auf die Konformation des Zytoskeletts von Medulloblastom-Zellen *in vitro* aus (Chen et al., 2011; Yuan et al., 2010; Zavarella et al., 2009).

Zielsetzung der Arbeit

Da spezifische Inhibitoren für Rac1 bisher nicht für den klinischen Einsatz verfügbar sind, war es das Ziel dieser Arbeit, die Auswirkungen einer medikamentösen Inhibition von auf Rac1 einflussnehmenden Signalwege im Hinblick auf die Rac1-Inhibierung näher zu untersuchen. In vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe ergaben sich vielversprechende anti-neoplastische, aber auch anti-migratorische Wirkungen für den PI3K-Inhibitor Pictilisib (GDC-0941) sowie die Multikinase-Inhibitoren Pazopanib und Sorafenib, die unter anderem den PDGF, VEGF und RAF-Signalweg inhibieren (Craveiro et al., 2014; Ehrhardt et al., 2015; Ehrhardt et al., 2018). Aufgrund ihres Wirkungsprofils können sich beide Substanzgruppen potenziell auf die Aktivität von Rac1 auswirken. Der PI3K-Signalweg beeinflusst die Generierung phosphorylierter Lipide, die wiederum Akt und GEFs und somit Rho GTPasen wie Rac1 aktivieren (Crespo et al., 2016; Xue et al., 2012). Die eingesetzten Multikinase-Inhibitoren Pazopanib und Sorafenib schließen in ihrem Zielprofil beide den PDGF-Rezeptor und weitere Zielstrukturen ein, die den RAS/MAPK/ERK-Signalweg aktivieren, welcher seinerseits einen stimulierenden Effekt auf die Aktivität von Rac1 hat (Yuan et al., 2010). Tyrosinkinase-Rezeptoren gelten als vielversprechende therapeutische Ziele, da sie sowohl im primären Medulloblastom als auch in dessen Metastasen exprimiert werden (Taylor et al., 2012; Wu et al., 2012). In der vorliegenden Publikation (Schoen et al., 2022) wurde der Einfluss der oben genannten Substanzen auf die Aktivität von Rac1, die Zellmigration und die beteiligten Signalwege *in vitro* untersucht. Der Mangel an Untersuchungsmaterial von Primärtumoren und zugehörigen Metastasen sowie die verkürzte Überlebenszeit von Versuchstieren im Maus-Modell, erschweren die Untersuchung des Metastasierungs-Verhaltens von Medulloblastomen erheblich (van Ommeren et al., 2020). Es wurden daher zwei adhärent wachsende

Zelllinien mit unterschiedlicher molekularer Gruppen-Zuordnung gewählt, Daoy und MEB-Med-8A, um den Einfluss der genannten Substanzen auf Rac1 und die Auswirkungen auf die Migration der Medulloblastom-Zellen differenzierter zu beleuchten.

1.2 Material und Methoden

Die klinisch verfügbaren Substanzen Pictilisib (GDC-0941), Pazopanib (GW786034B) und Sorafenib (BAY 43-9006) wurden an *in vitro* Modellen von zwei Tumorzelllinien mit Hochrisikoprofil aber unterschiedlicher Gruppenzugehörigkeit getestet. Dabei richteten sich die eingesetzten Konzentrationen der Medikamente nach bereits publizierten Dosis-Wirkungs-Analysen (Craveiro et al., 2014; Ehrhardt et al., 2015). Die Zelllinie Daoy ist eine der am häufigsten untersuchten Medulloblastom-Zelllinien. Sie wird der SHH-Gruppe zugeordnet und trägt eine TP53-Mutation. Die Zelllinie MEB-Med-8A wird in die c-MYC-amplifizierte non-WNT/non-SHH Gruppe 3 eingeordnet (Ivanov et al., 2016). Um den Aktivierungszustand des kleinen G-Proteins Rac1 zu bestimmen, wurde ein Pull-Down Assay (Merck Millipore) durchgeführt. Dabei wird mittels des GST-Fusionsproteins, das der p-21 Bindungsdomäne (PBD) von Pak1 gleichkommt, GTP-gebundenes bzw. aktives Rac1 von inaktivem Rac1 getrennt. Die Bindungsstelle, die Cdc42/Rac1 Interactive Binding (CRIB)-Region, besteht nur zur Bindung bei der aktiven, GTP-gebundenen Form von Rac1. Somit ist es möglich, das aktive Protein aus dem Zytoplasma spezifisch zu isolieren und mittels Westernblot mögliche medikamentöse Einflüsse zu visualisieren und zu quantifizieren. Ferner wurden die zytosolischen und nukleären Gesamtmengen von Rac1 mittels SDS-Page und Western Blot nach subzellulärer Fraktionierung bestimmt. Auch der zytosolische Gehalt von (p)Erk1/2 und (p)Akt wurden mittels Westernblot analysiert. Darüber hinaus wurde der Einfluss der Substanzen auf die Migrationskapazität der Tumorzellen in Scratch Assays über einen Zeitraum von 30 Stunden in 6-stündigen Abschnitten dokumentiert und die Auswirkungen auf die Proliferationsrate sowie die Apoptose-Rate durch eine Applikation von Propidiumiodid und konsekutiver Durchflusszytometrie untersucht. Die Morphologie des Zytoskeletts unbehandelter und behandelter Tumorzellen wurde in subkonfluenten Zellpopulationen mit besonderem Fokus auf die Migrationsfront ebenfalls in Scratch Assays mittels Färbung des Aktin-Zytoskeletts mit Phalloidin und Fluoreszenz-Mikroskopie visualisiert. Auch die subzelluläre Lokalisation von Rac1 wurde durch Immunfluoreszenz bestimmt.

1.3 Ergebnisse

In der vorliegenden Publikation werden die Einflüsse der klinisch verfügbaren Substanzen Pictilisib, Pazopanib und Sorafenib auf die Zellmorphologie, das Migrationsverhalten und die zytoplasmatische Aktivität und Verteilung von Rac1 in Medulloblastom-Zellen *in vitro* untersucht (Schoen et al., 2022). Zunächst zeigen wir, dass die zwei untersuchten Zelllinien bereits im unbehandelten Zustand eine unterschiedliche Zellmorphologie aufweisen. Zellen der Zelllinie Daoy besitzen eine eher mesenchymale Morphologie mit zahlreichen Zellfortsätzen (Abb. 1a). Die Zellen der MEB-Med-8A Zelllinie zeichnen sich durch eine ovaläre Form bei insgesamt geringerer Größe und weniger Zellfortsätzen aus. Ferner weisen sie einen häufig stark deformierten Zellkern auf. Wir dokumentieren im Anschluss daran die Präsenz von Rac1 im Zytosol und zum ersten Mal auch in den Zellkernen beider Zelllinien (Abb. 1b und 2a).

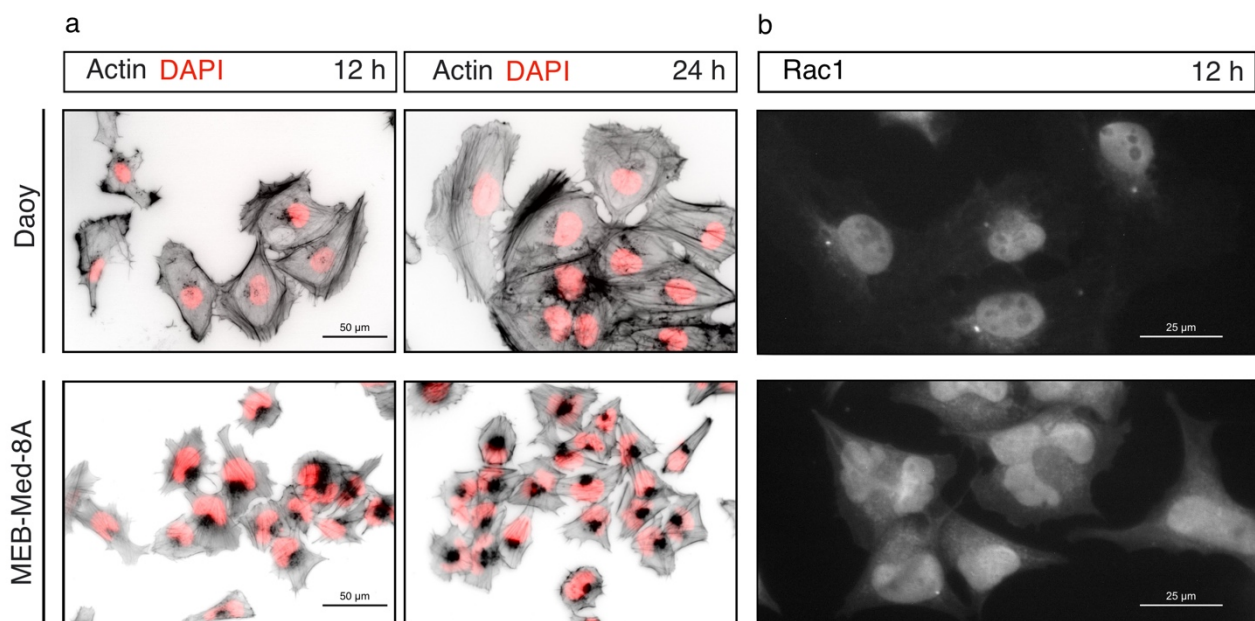


Abb. 1: Visualisierung des Aktin-Zytoskeletts (a) und Verteilung von Rac1 (b) in nicht-konfluenten Populationen Daoy und MEB-Med-8A Zellen mittels Färbung mit Alexa Fluor-555 gekoppelten Phalloidins, Kernfärbung mit DAPI nach 12 h bzw. 24 h ohne Applikation von Medikamenten. Alleinige Färbung mit einem Alexa Fluor-488 gekoppelten Rac1 Antikörper bei 40 X Vergrößerung nach 12 h. Modifiziert nach Schoen et al., 2022, Abb. 1A.

Auf Basis der durchgeführten Pulldown-Analysen zeigen wir zudem, dass alle getesteten Substanzen den Gehalt an aktivem Rac1 im Zytoplasma senken und dass in MEB-Med-8A Zellen der zytosolische Gesamtgehalt von Rac1 durch den Einsatz der Tyrosinkinase-Inhibitoren vermindert wird (Abb. 2a). Wie erwartet kam es außerdem durch den Einsatz des PI3K-Inhibitors zu einem vollständigen Rückgang der Phosphorylierung von Akt. Ferner dokumentieren wir eine Hochregulierung von pERK1/2 beim Einsatz beider Tyrosinkinase-Inhibitoren in Zellen der Zelllinie Daoy nach einer Applikationszeit von 24 Stunden, während es zu diesem Zeitpunkt zu einer deutlichen Reduktion von pERK 1/2 in den MEB-Med-8A Zellen kommt (Abb. 2b).

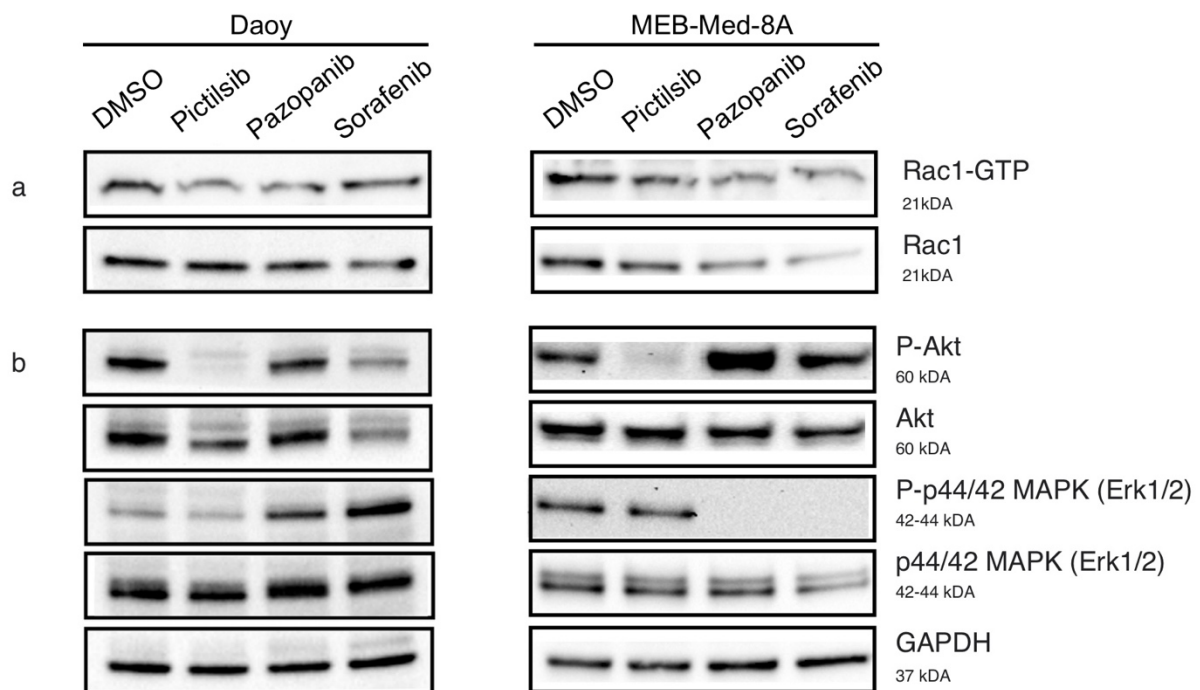


Abb. 2: Westernblot Analyse des GTP-Rac1 Pulldown (a) und der Zelllysate auf p-Akt1 und p-Erk (b), 24 h (Daoy) bzw. 12 h (MEB-Med-8A) nach Applikation der Medikamente. Modifiziert nach Schoen et al., 2022, Abb. 2F, 3F, 4B und 4D.

Ferner analysieren wir die Effekte der drei Inhibitoren auf die Morphologie des Zytoskeletts und die Migrationskapazität der Tumorzellen (Abb. 3 und 4). Die Tyrosinkinase-Inhibitoren induzieren, trotz ihres unterschiedlich gewichteten Wirkungsprofils, wirksame anti-

migratorische und anti-neoplastische Einflüsse. Im direkten Vergleich der zwei Substanzgruppen zeigt sich, dass der anti-migratorische Effekt von Pictilisib in den Scratch Assays früher eintritt und insgesamt dem der zwei getesteten Tyrosinkinase-Inhibitoren überlegen ist. Im Vergleich zu den Tyrosinkinase-Inhibitoren dominiert beim Einsatz von Pictilisib der anti-migratorische Effekt gegenüber dessen geringeren anti-proliferativen und pro-apoptotischen Effekt (Abb. 3).

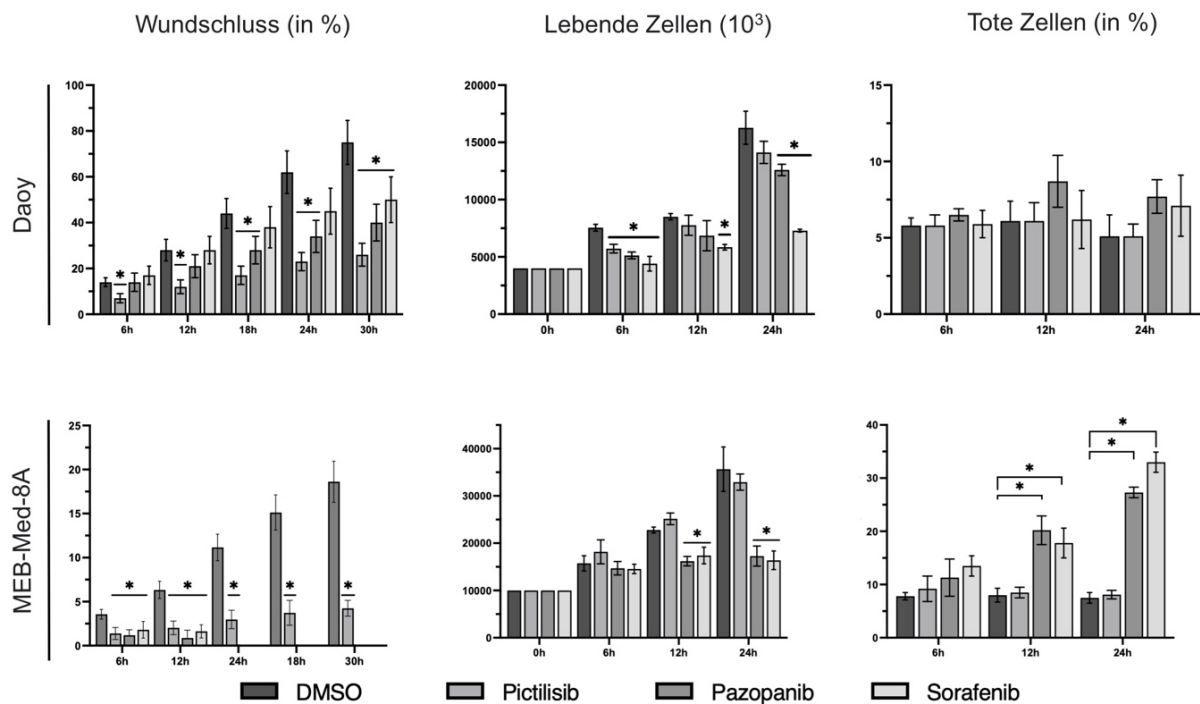


Abb. 3: Wundschluss über einen Zeitraum von 30 h und Auswirkung der Medikamente auf die Zellzahl lebender und toter Zellen über einen Zeitraum von 24 h in beiden Zelllinien. Modifiziert nach Schoen et al. 2022, Abb. 2C-E, 3C-E.

Auch der Vergleich des medikamentösen Effekts auf die zwei verschiedenen Tumorzelllinien zeigten voneinander abweichende Reaktionen. Der Einsatz von Tyrosinkinase-Inhibitoren führte zu einem Ablösen der MEB-Med-8A Zellen, was zum einen auf eine medikamentös induzierte erhöhte Apoptose-Rate in dieser Zelllinie als auch auf starke morphologische Veränderungen aufgrund eines Zusammenbruchs des Zellskeletts zurückgeführt werden kann (Abb. 4). In Daoy-Zellen konnte dagegen keine vermehrte Ablösung

der Zellen beobachtet werden – bei diesen war der ansonsten beobachtete anti-neoplastische Effekt im hier untersuchten Zeitraum also weniger stark ausgeprägt. Somit lässt sich festhalten, dass der Effekt der Tyrosinkinase-Inhibitoren durch die breitgefächerte Blockade mehrerer Signalwege im Vergleich zu der akzentuierten anti-migratorischen Wirkung des PI3K Inhibitors Pictilisib zu weniger spezifischen Verminderung der migratorischen Kapazität der Tumorzellen führt.

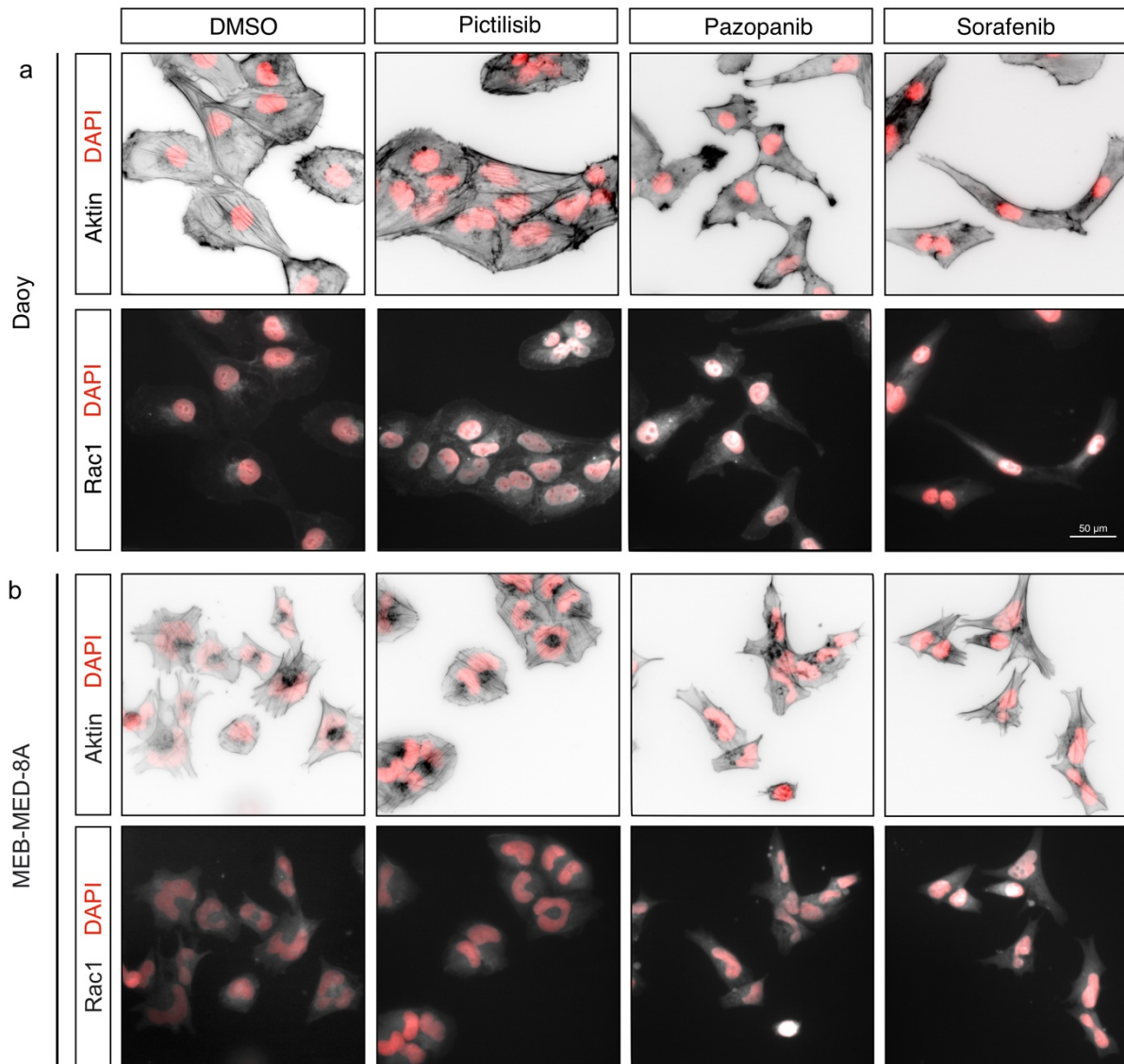


Abb. 4: Aktin-Zytoskelett und zytoplasmatische Verteilung von Rac1 in subkonfluenten Zellpopulationen nach 24 h Medikamentenexposition, außer MEB-Med-8A: Pazopanib und Sorafenib nach jeweils 12 h Medikamentenexposition. Modifiziert nach Schoen et al. 2022, Abb 2A und 3A.

1.4 Diskussion

Trotz der kontinuierlichen Anpassung und Verbesserung des Therapieregimes des Medulloblastoms werden neue Behandlungsansätze aufgrund der hochgradig schädigenden Nebenwirkungen etablierter Therapieformen auf das junge Patientenkollektiv benötigt. Das Erkennen und gezielte Behandeln von Hochrisikopatienten steht dabei im Mittelpunkt und soll unter Integration der zugrundeliegenden genetischen Eigenschaften des Tumors sowie einem besseren Verständnis der molekularen Tumor-Pathogenese für zielgerichtete Therapiekonzepte genutzt werden.

In den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde der Fokus auf die Analyse der anti-migratorischen Wirkung von zwei unterschiedlichen Tyrosinkinase-Inhibitoren, Pazopanib und Sorafenib, und des PI3K-Inhibitors Pictilisib gerichtet (Schoen et al., 2022). Zusätzliches Augenmerk lag auf der kleinen Rho-GTPase Rac1, da diese als zentraler Regulator von Migration, Invasivität und Metastasierung des Medulloblastoms wirkt (Chen et al., 2011; De et al., 2019; Yuan et al., 2010; Zavarella et al., 2009). Die drei im Rahmen der vorliegenden Arbeit getesteten Substanzen verringerten grundsätzlich den Anteil an aktiviertem zytoplasmatischen Rac1, auch wenn sich substanz- und zelllinienabhängiger Unterschiede nachweisen ließen. Dabei riefen sie unterschiedliche morphologische Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts hervor und reduzierten die Migrationskapazität der Zellen. Die PI3K-Blockade stellte sich dabei im direkten Vergleich mit den Tyrosinkinase-Inhibitoren als eine deutlich potentere anti-migratorische Maßnahme dar.

Sowohl auf die Zelllinie Daoy, die der SHH-Gruppe zugeordnet wird, als auch auf die Zellen der non-WNT/non-SHH Gruppe 3 zugehörige Zelllinie MEB-Med8A zeigten die Tyrosinkinase-Inhibitoren eine früh einsetzende und signifikant inhibierende Wirkung. Im Rahmen der Blockierung des PI3K-Signalweges zeigte sich neben der signifikanten Hemmung der Migrationsgeschwindigkeit auch ein deutlicher Verlust von aktinreichen Zellfortsätzen an der Zellmembran migrierender sowie isolierter Tumorzellen. Dieser Prozess ist, rein morphologisch betrachtet, mit dem der Mesenchymalen-Epithelialen Transition

vereinbar. Bei der Lokalisation von Rac1 an der Plasmamembran spielen Phospholipide, die im Rahmen des PI3K/Akt Signalwegs entstehen, eine zentrale Rolle (De et al., 2015; Payapilly und Malliri, 2018). An der Migrationsfront treibt Rac1 die Fortbewegung der Zellen an, indem es verschiedene Signalwege aktiviert, die an der Entstehung und Aufrechterhaltung von Lamellipodien beteiligt sind. (Lopez-Guerrero et al., 2020; Ridley, 2011).

In Übereinstimmung mit ihrem breiten Wirkungsspektrum führte die Anwendung der Tyrosinkinase-Inhibitoren zu einem allgemeinen Um- und Abbau des Aktin-Zytoskeletts sowie der aktinreichen Zellfortsätze. In MEB-Med-8A Zellen induzieren die Tyrosinkinase-Inhibitoren ferner eine Ablösung der Tumorzellen, wobei ein Teil der Tumorzellen in die Apoptose überging, während andere weiterhin vital waren. Eine vergleichbar starke Ablösung der Zellen war im Falle der Zelllinie Daoy nicht zu beobachten, und auch der anti-proliferative Effekt der Tyrosinkinase-Inhibitoren war innerhalb des beobachteten Zeitraums vergleichsweise gering bzw. nicht signifikant. Die Mutation von TP53 könnte im Fall der Zelllinie Daoy den Prozess der Anoikis verhindern (Zugasti et al., 2001). Es ist anzunehmen, dass die von Tyrosinkinase-Inhibitoren vermittelte, vollständige Aufhebung der Erk1/2-Phosphorylierung in MEB-Med-8A auch zu einer Apoptose und vermehrten Ablösung der Zellen beiträgt. Dagegen könnte die paradox vermehrte Aktivierung von Erk 1/2 in Daoy-Zellen nach 24-stündiger Applikation der Tyrosinkinase-Inhibitoren die vergleichsweise moderate anti-proliferative Wirkung der Inhibitoren erklären, insbesondere da Erk 1/2 in Rahmen der Tumorzell-Proliferation und Migration von Tumoren der Sonic Hedgehog-Gruppe eine bedeutende Rolle zugeschrieben wurde (Abouantoun et al., 2011; Park et al., 2019; Schönholzer et al., 2020).

Erk1/2 nimmt eine zentrale Stellung inmitten eines verflochtenen onkogenen Signalnetzwerks ein und galt daher lange Zeit als eine vielversprechende Zielstruktur in der zielgerichteten Krebstherapie. Jedoch sind mehrfach unerwünschte Nebeneffekte und Resistenzen beobachtet worden, wenn therapeutisch in die MAPK-Signalkaskade eingegriffen wurde (Liu et al., 2018). Wie auch in den vorliegenden Untersuchungen wurden paradoxe Aktivierungen des Signalwegs beobachtet (Hatzivassiliou et al., 2010; Karajannis et al.,

2014; Poulikakos et al., 2010; Yokoyama et al., 2017). In einer Phase-II-Studie zur Bewertung der Wirksamkeit von Sorafenib bei pädiatrischen, niedriggradigen Astrozytomen wurde die paradoxe Hochregulierung der Erk-Phosphorylierung sogar mit einem fortschreitenden Tumorwachstum bei einer signifikanten Anzahl von Patienten in Verbindung gebracht, was zum vorzeitigen Abbruch der Studie führte (Karajannis et al., 2014). Ferner spielt auch die Aktivität und zelluläre Lokalisation von Erk 1/2 für die Migration des Medulloblastoms eine besondere Rolle. So berichten Schönholzer et al., dass der Multi-kinase-Inhibitor Dasatinib zwar zu einer verminderten mesenchymalen Migration von Medulloblastom-Zellen durch eine Herunterregulierung von Erk 1/2 führte, bei einer Untergruppe jedoch eine geringe Aktivität erhalten blieb. Diese Zellen nahmen eine amöboide Morphologie an und behielten ihre invasiven Fähigkeiten bei. (Schönholzer et al., 2020) Rac1 und Erk unterliegen überdies mehreren Berichten zufolge einer wechselseitigen Regulierung (De et al., 2019; Tong et al., 2013; Via et al., 2003). Auch im Falle des Medulloblastoms gibt es Berichte über einen beidseitigen Einfluss der Erk-Phosphorylierung auf die Aktivität von Rac1 und RhoA (Yuan et al., 2010; Zavarella et al., 2009), so dass die übersteigerte Aktivität von Erk 1/2 in den hier durchgeführten Experimenten die Annahme stärkt, dass die Aktivierung von Rac1 nicht exklusiv über Erk 1/2 reguliert wird. Aufgrund dieser Berichte und der zentralen Bedeutung des Signalwegs ist die hier beobachtete paradoxe Aktivierung von Erk 1/2 besorgniserregend und sollte daher im Rahmen weiterer Untersuchungen berücksichtigt werden.

Auch im Fall von Rac1 gibt es Berichte darüber, dass neben dem Aktivierungsstatus auch der räumlich-zeitlichen Lokalisierung eine regulierende Funktion für verschiedene zelluläre Funktionen zukommt (De et al., 2019). In den durchgeführten immunzytochemischen Untersuchungen und Westernblots zeigte sich neben der verringerten zytosolischen Aktivität eine Umverteilung von Rac1 nach Gabe der verschiedenen Substanzen. Daneben ergaben die durchgeführten Analysen zum ersten Mal den Nachweis von Rac1 im Zellkern beider Zelllinien. Daher erscheint es wahrscheinlich, dass sich die beobachteten Auswirkungen nicht ausschließlich auf die Modulation der Aktivität, sondern auch auf die Lokalisation von Rac1 zurückführen lassen. Rac1 ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, das in mehreren Zellkompartimenten nachgewiesen werden konnte. Die Einflüsse von

nukleärem Rac1 umfassen unter anderem die Modulation der Zellkern-Form und der Migration sowie einen Einfluss auf Akteure intranukleärer Signalwege (De et al., 2019; Payapilly und Malliri, 2018). Die Translokation von Rac1 in den Zellkern ist Zellzyklus abhängig, kann aber auch durch andere zelluläre Prozesse begünstigt werden. So wird die nukleäre Translokation zum Beispiel durch eine Erk-abhängige Phosphorylierung an Threonin 108 reguliert (Tong et al., 2013). Es wurden außerdem erhöhte Mengen von Rac1 in den Zellkernen mehrerer aggressiver Tumorzelllinien nachgewiesen und gleichzeitig mit einer erhöhten Tendenz zur Verformung des Zellkerns in Verbindung gebracht, wie sie auch hier in den Zellen der Zelllinie MEB-Med-8A beobachtet werden konnte. Die nukleäre Rac1-Translokation wird durch das Chaperon Nucleophosmin reguliert und es wurde gezeigt, dass ein Defekt dieses Mechanismus zu einer Akkumulation von Rac1 im Zellkern führte. Im Zytoplasma steigt dadurch der zytoplasmatische Gehalt von RhoA, was in der Studie mit einem amöboiden Migrationsmodus und einer erhöhten Invasionsrate assoziiert war (Navarro-Lérida et al., 2015). Die beobachtete nukleäre Ansammlung von Rac1 sowie die Zellkerndeformierung in MEB-Med-8A könnten sich potenziell auf das Invasionsverhalten der Zellen auswirken, was in weiterführenden Untersuchungen anhand von 3D-Modellen der migrierenden Zellen untersucht werden sollte.

In dieser Studie haben wir die klinisch bereits einsetzbaren Substanzen Pictilisib, Pazopanib und Sorafenib in ihrer Rolle als potenzielle Rac1-Inhibitoren wie auch als Modulatoren des Zytoskeletts und der Migration beim Medulloblastom beleuchtet. Obwohl bei der Entwicklung von Rac1-Inhibitoren für die Anwendung *in vitro* Fortschritte erzielt wurden, gibt es bis heute keinen klinisch zugelassenen Inhibitor (De et al., 2019). Zuletzt wurde berichtet, dass das R-Enantiomer des als Schmerzmedikation eingesetzten Ketorolac eine inhibierende Wirkung der kleinen GTPasen Rac1 und Cdc42 zeigt. Für das Ovarialkarzinom konnte *in vitro* und *in vivo* ein anti-neoplastischer und anti-migratorischer Effekt mit verringerter Tumoraussaat sowie eine insgesamt reduzierte Tumorlast erzielt werden (Grimes et al., 2021; Guo et al., 2015). Auch in einem Maus-Modell eines aggressiven Mamma-Karzinoms konnte eine anti-neoplastische Wirkung des R-Enantiomers demonstriert werden und sollte in weiteren Untersuchungen mit dem Ziel Rac1-Inhibition berücksichtigt werden (Peretti et al., 2018).

Die morphologischen und molekularen Unterschiede zwischen den beiden Hochrisiko-Medulloblastom-Zelllinien und die unterschiedliche Wirkung der getesteten Medikamente sind beispielhaft für die Herausforderungen bei der gezielten Therapie verschiedener molekularer Untergruppen dieser hochgradig bösartigen Erkrankung. Darüber hinaus rechtfertigen die vielgestaltigen Wechselwirkungen der beiden onkogenen PI3K/AKT- und MAPK/ERK-Signalkaskaden kombinierte zielgerichtete Ansätze. Dies ist von besonderer Bedeutung, da die selektive Hemmung eines Signalwegs zu einer paradoxen Hochregulierung einzelner Elemente anderer Signalwege führen kann. Zusammengenommen lassen diese Beobachtungen, die bereits bei nur zwei Medulloblastom-Zelllinien eine hochgradige Diversität illustrieren, es unwahrscheinlich erscheinen, dass es einen universellen Angriffspunkt gibt. Mit Kombinationsstrategien ließe sich aber wohl neben den Wechselwirkungen auch das Problem der potenziellen Resistenz nach längerer Exposition gegenüber einzelnen zielgerichteten Medikamenten in Angriff nehmen (Cao et al., 2015). Beim Medulloblastom konnte bereits *in vitro* eine verstärkte antineoplastische Aktivität der PI3K-Hemmung mit den Tyrosinkinase-Inhibitoren Axitinib und Vandetinib beobachten werden (Craveiro et al., 2017; Ehrhardt et al., 2018). Auch eine kombinierte Inhibition des Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptors (FGFR) und PI3K war nachweislich wirksamer als ein singulärer Ansatz und erhöhte die Behandlungsempfindlichkeit zuvor resistenter Medulloblastom-Zelllinien (Holzhauser et al., 2020). Diese Beobachtungen und die hier dargelegten Ergebnisse machen eine kombinierte Anwendung von PI3K- und Tyrosinkinase-Inhibitoren zu einer vielversprechenden therapeutischen Option, die unter anderem auch auf Rac1 als einen wichtigen nachgeschalteten Effektor abzielt.

1.5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit zeigen wir, dass die klinisch verfügbaren Medikamente Pictilisib, Pazopanib und Sorafenib die Migration von Zellen zweier Medulloblastom-Zelllinien unterschiedlicher aggressiver Subtypen *in vitro* inhibieren. Dabei senken alle drei Substanzen den zytoplasmatischen Gehalt von aktivem Rac1, welches innerhalb der Migration von Medulloblastomen eine zentrale regulierende Stellung innehat. Dabei differenzieren wir voneinander abweichende Effekte der Substanzklassen. Unter anderem demonstrieren wir, dass der PI3K-Inhibitor Pictilisib im direkten Vergleich einen deutlich effektiveren und früher einsetzenden anti-migratorischen Effekt auf die Zellen hat. Die eingesetzten Tyrosinkinase-Inhibitoren weisen hingegen im untersuchten Zeitraum einen stärkeren anti-proliferativen Effekt auf und führen ferner zu einem Ablösen der Zellen der Zelllinie MEB-Med-8A. Parallel dokumentieren wir eine paradoxe Hochregulierung von Erk 1/2 in den Zellen der untersuchten Zelllinie Daoy. Durch immunzytochemische Färbungen des Aktin-Zytoskeletts decken wir morphologische Unterschiede zwischen den zwei Zelllinien auf und analysieren charakteristische Auswirkungen der Substanzen auf die Struktur des Zytoskeletts. Ferner analysieren wir die Verteilung von Rac1 und zeigen hier zum ersten Mal, dass Rac1 im Zellkern beider Zelllinien lokalisiert ist. Diese Beobachtungen illustrieren die zentrale Rolle von Rac1 in der Migration von Medulloblastomen und bieten einen differenzierten Einblick in ungleiche Wirkweisen von klinisch bereits einsetzbaren Substanzgruppen.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Abouantoun TJ, Castellino RC, MacDonald TJ. Sunitinib induces PTEN expression and inhibits PDGFR signaling and migration of medulloblastoma cells. *J Neurooncol* 2011; 101: 215–226

Arcaro A, Guerreiro A. The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway in Human Cancer: Genetic Alterations and Therapeutic Implications. *Curr Genomics* 2007; 8: 271–306

Boman KK, Hörnquist L, De Graaff L, Rickardsson J, Lannering B, Gustafsson G. Disability, body image and sports/physical activity in adult survivors of childhood CNS tumors: Population-based outcomes from a cohort study. *J Neurooncol* 2013; 112: 99–106

Cao X, Kaneko T, Li JS, Liu AD, Voss C, Li SSC. A phosphorylation switch controls the spatiotemporal activation of Rho GTPases in directional cell migration. *Nat Commun* 2015; 6: 7721–7721

Cavalli FMG, Remke M, Rampasek L, Peacock J, Shih DJH, Luu B, et al., Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups. *Cancer Cell* 2017; 31: 737-754

Chen B, Gao Y, Jiang T, Ding J, Zeng Y, Xu R, Jiang X. Inhibition of tumor cell migration and invasion through knockdown of Rac1 expression in medulloblastoma cells. *Cell Mol Neurobiol* 2011; 31: 251–257

Cho YJ, Tsherniak A, Tamayo P, Santagata S, Ligon A, Greulich H, Berhoukim R, Amani V, Goumnerova L, Eberhart CG, Lau CC, Olson JM, Gilbertson RJ, Gajjar A, Delattre O, Kool M, Ligon K, Meyerson M, Mesirov JP, Pomeroy SL. Integrative Genomic Analysis of Medulloblastoma Identifies a Molecular Subgroup That Drives Poor Clinical Outcome. *J Clin Oncol* 2011; 29: 1424–1424

Craveiro RB, Ehrhardt M, Holst MI, Pietsch T, Dilloo D. In comparative analysis of multi-kinase inhibitors for targeted medulloblastoma therapy pazopanib exhibits promising in vitro and in vivo efficacy. *Oncotarget* 2014; 5: 7149–7161

Crespo S, Kind M, Arcaro A. The role of the PI3K/AKT/mTOR pathway in brain tumor metastasis. *J Cancer Metastasis Treat* 2016; 2: 80–89

De P, Aske JC, Dey N. RAC1 Takes the Lead in Solid Tumors. *Cells* 2019; 8: 382–382

Dudu V, Able RA, Rotari V, Kong Q, Vazquez M. Role of epidermal growth factor-triggered PI3K/Akt signaling in the migration of medulloblastoma-derived cells. *Cell Mol Bioeng* 2012; 5: 403–413

Ehrhardt M, Craveiro RB, Holst MI, Pietsch T, Dilloo D. The PI3K inhibitor GDC-0941 displays promising in vitro and in vivo efficacy for targeted medulloblastoma therapy. *Onco-target* 2015; 6: 802–813

Ehrhardt M, Craveiro RB, Velz J, Olschewski M, Casati A, Schönberger S, Pietsch T, Dilloo D. The FDA approved PI3K inhibitor GDC-0941 enhances in vitro the anti-neoplastic efficacy of Axitinib against c-myc-amplified high-risk medulloblastoma. *J Cell Mol Med* 2018; 22: 2153–2161

Fults DW, Taylor MD, Garzia L. Leptomeningeal dissemination: a sinister pattern of medulloblastoma growth. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics* 2019: 1–9

Garzia L, Kijima N, Morrissy AS, De Antonellis P, Guerreiro-Stucklin A, Holgado BL, Wu X, Wang X, Parsons M, Zayne K, Manno A, Kuzan-Fischer C, Nor C, Donovan LK, Liu J, Qin L, Garancher A, Liu KW, Mansouri S, Luu B, Thompson YY, Ramaswamy V, Peacock J, Farooq H, Skowron P, Shih DJH, Li A, Ensan S, Robbins CS, Cybulsky M, Mitra S, Ma Y, Moore R, Mungall A, Cho YJ, Weiss WA, Chan JA, Hawkins CE, Massimino M, Jabado N, Zapotocky M, Sumerauer D, Bouffet E, Dirks P, Tabori U, Sorensen PHB, Brastianos PK, Aldape K, Jones SJM, Marra MA, Woodgett JR, Wechsler-Reya RJ, Fults DW, Taylor MD. A Hematogenous Route for Medulloblastoma Leptomeningeal Metastases. *Cell* 2018; 172: 1050-1062.e14

Gilbertson RJ, Clifford SC. PDGFRB is overexpressed in metastatic medulloblastoma. *Nat Genet* 2003; 35: 197–198

Gilbertson RJ, Langdon JA, Hollander A, Hernan R, Hogg TL, Gajjar A, et al., Mutational analysis of PDGFR-RAS/MAPK pathway activation in childhood medulloblastoma. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)* 2006; 42: 646–649

Grimes MM, Kenney SR, Dominguez DR, Brayer KJ, Guo Y, Wandering-Ness A, Hudson L. The R-enantiomer of ketorolac reduces ovarian cancer tumor burden in vivo. *BMC Cancer* 2021; 21: 1–16

Guerreiro AS, Fattet S, Fischer B, Shalaby T, Jackson SP, Schoenwaelder SM, Grotzer MA, Delattre O, Arcaro A. Targeting the PI3K p110A isoform inhibits medulloblastoma proliferation, chemoresistance, and migration. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 6761–6769

Guo Y, Kenney SR, Muller CY, Adams S, Rutledge T, Romero E, Murray-Kreza C, Prekeris R, Sklar LA, Hudson LG, Wandering-Ness A. R-Ketorolac Targets Cdc42 and Rac1 and Alters Ovarian Cancer Cell Behaviors Critical for Invasion and Metastasis. *Mol Cancer Ther* 2015; 14: 2215–2227

Hartmann W, Digon-Söntgerath B, Koch A, Waha A, Endl E, Dani I, Denkhaus D, Goodyer CG, Sörensen N, Wiestler OD, Pietsch T. Phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT signaling is activated in medulloblastoma cell proliferation and is associated with reduced expression of PTEN. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 3019–3027

Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, Brandhuber BJ, Anderson DJ, Alvarado R, Ludlam MJ, Stokoe D, Gloor SL, Vigers G, Morales T, Aliagas I, Liu B, Sideris S, Hoeflich KP, Jaiswal BS, Seshagiri S, Koeppen H, Belvin M, Friedman LS, Malek S. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 2010; 464: 431–435

Holzhauser S, Lukoseviciute M, Andonova T, Ursu RG, Dalianis T, Wickström M, Kostopoulou O. Targeting Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) and Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) Signaling Pathways in Medulloblastoma Cell Lines. *Anticancer Res* 2020; 40: 53–66

Hovestadt V, Ayrault O, Swartling FJ, Robinson GW, Pfister SM, Northcott PA. Medulloblastomics revisited: biological and clinical insights from thousands of patients. *Nat Rev Cancer* 2020; 20: 42–56

Ivanov DP, Coyle B, Walker DA, Grabowska AM. In vitro models of medulloblastoma: Choosing the right tool for the job. *J Biotechnol* 2016; 236: 10–25

Juraschka K, Taylor MD. Medulloblastoma in the age of molecular subgroups: a review. *J Neurosurg Pediatr* 2019; 24: 353–363

Karajannis MA, Legault G, Fisher MJ, Milla SS, Cohen KJ, Wisoff JH, Harter DH, Goldberg JD, Hochman T, Merkelson A, Bloom MC, Sievert AJ, Resnick AC, Dhall G, Jones DT, Korshunov A, Pfister SM, Eberhart CG, Zagzag D, Allen JC. Phase II study of sorafenib in children with recurrent or progressive low-grade astrocytomas. *Neuro Oncol* 2014; 16: 1408–1416

Kazanietz MG, Caloca MJ. The Rac GTPase in cancer: From old concepts to new paradigms. *Cancer Res* 2017; 77: 5445–5451

Kool M, Korshunov A, Remke M, Jones DT, Schlanstein M, Northcott PA, Cho YJ, Koster J, Schouten-van Meeteren A, van Vuurden D, Clifford SC, Pietsch T, von Bueren AO, Rutkowski S, McCabe M, Collins VP, Bäcklund ML, Haberler C, Bourdeaut F, Delattre O, Doz F, Ellison DW, Gilbertson RJ, Pomeroy SL, Taylor MD, Lichter P, Pfister SM. Molecular subgroups of medulloblastoma: An international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathol* 2012; 123: 473–484

Liu F, Yang X, Geng M, Huang M. Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B* 2018; 8: 552–562

Lopez-Guerrero AM, Espinosa-Bermejo N, Sanchez-Lopez I, Macartney T, Pascual-Caro C, Orantos-Aguilera Y, Rodriguez-Ruiz L, Perez-Oliva AB, Mulero V, Pozo-Guisado E, Martin-Romero FJ. RAC1-Dependent ORAI1 Translocation to the Leading Edge Supports Lamellipodia Formation and Directional Persistence. *Sci Rep* 2020; 10: 6580

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 2016; 131: 803–820

Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, Hawkins C, Ng HK, Pfister SM, Reifenberger G, Soffietti R, von Deimling A, Ellison DW. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol* 2021; 23: 1231–1251

MacDonald TJ, Aguilera D, Castellino RC. The rationale for targeted therapies in medulloblastoma. *Neuro Oncol* 2014; 16: 9–20

MacDonald TJ, Brown KM, LaFleur B, Peterson K, Lawlor C, Chen Y, Packer RJ, Cogen P, Stephan DA. Expression profiling of medulloblastoma: PDGFRA and the RAS/MAPK pathway as therapeutic targets for metastatic disease. *Nat Genet* 2001; 29: 143–152

Morrissy AS, Garzia L, Shih DJ, Zuyderduyn S, Huang X, Skowron P, Remke M, Cavalli FM, Ramaswamy V, Lindsay PE, Jelveh S, Donovan LK, Wang X, Luu B, Zayne K, Li Y, Mayoh C, Thiessen N, Mercier E, Mungall KL, Ma Y, Tse K, Zeng T, Shumansky K, Roth AJ, Shah S, Farooq H, Kijima N, Holgado BL, Lee JJ, Matan-Lithwick S, Liu J, Mack SC, Manno A, Michealraj KA, Nor C, Peacock J, Qin L, Reimand J, Rolider A, Thompson YY, Wu X, Pugh T, Ally A, Bilenky M, Butterfield YS, Carlsen R, Cheng Y, Chuah E, Corbett RD, Dhalla N, He A, Lee D, Li HI, Long W, Mayo M, Plettner P, Qian JQ, Schein JE, Tam A, Wong T, Birol I, Zhao Y, Faria CC, Pimentel J, Nunes S, Shalaby T, Grotzer M, Pollack IF, Hamilton RL, Li XN, Bendel AE, Fults DW, Walter AW, Kumabe T, Tominaga T, Collins VP, Cho YJ, Hoffman C, Lyden D, Wisoff JH, Garvin JH Jr, Stearns DS, Massimi L, Schüller U, Sterba J, Zitterbart K, Puget S, Ayrault O, Dunn SE, Tirapelli DP, Carlotti CG, Wheeler H, Hallahan AR, Ingram W, MacDonald TJ, Olson JJ, Van Meir EG, Lee JY, Wang KC, Kim SK, Cho BK, Pietsch T, Fleischhack G, Tippelt S, Ra YS, Bailey S, Lindsey JC, Clifford SC, Eberhart CG, Cooper MK, Packer RJ, Massimino M, Garre ML, Bartels U, Tabori U, Hawkins CE, Dirks P, Bouffet E, Rutka JT, Wechsler-Reya RJ, Weiss WA, Collier LS, Dupuy AJ, Korshunov A, Jones DT, Kool M, Northcott PA, Pfister SM, Largaespada DA, Mungall AJ, Moore RA, Jabado N, Bader GD, Jones SJ, Malkin D, Marra MA, Taylor MD. Divergent clonal selection dominates medulloblastoma at recurrence. *Nature* 2016; 529: 351–357

Moxon-Emre I, Taylor MD, Bouffet E, Hardy K, Campen CJ, Malkin D, Hawkins C, Laperriere N, Ramaswamy V, Bartels U, Scantlebury N, Janzen L, Law N, Walsh KS, Mabbott DJ. Intellectual outcome in molecular subgroups of medulloblastoma. *J Clin Oncol* 2016; 34: 4161–4170

Navarro-Lérida I, Pellinen T, Sanchez SA, Guadamillas MC, Wang Y, Mirtti T, Calvo E, Del Pozo MA. Rac1 nucleocytoplasmic shuttling drives nuclear shape changes and tumor invasion. *DevCell* 2015; 32: 318–334

Northcott Paul A, Dubuc AM, Pfister S, Taylor MD. Molecular subgroups of medulloblastoma. *Expert Rev Neurother* 2012; 12: 871–884

Northcott PA, Korshunov A, Witt H, Hielscher T, Eberhart CG, Mack S, Bouffet E, Clifford SC, Hawkins CE, French P, Rutka JT, Pfister S, Taylor MD. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J Clin Oncol* 2011; 29: 1408–1414

Northcott PA, Shih DJ, Peacock J, Garzia L, Morrissy AS, Zichner T, Stütz AM, Korshunov A, Reimand J, Schumacher SE, Beroukhir R, Ellison DW, Marshall CR, Lionel AC, Mack S, Dubuc A, Yao Y, Ramaswamy V, Luu B, Rolider A, Cavalli FM, Wang X, Remke M, Wu X, Chiu RY, Chu A, Chuah E, Corbett RD, Hoad GR, Jackman SD, Li Y, Lo A, Mungall KL, Nip KM, Qian JQ, Raymond AG, Thiessen NT, Varhol RJ, Birol I, Moore RA, Mungall AJ, Holt R, Kawauchi D, Roussel MF, Kool M, Jones DT, Witt H, Fernandez-L A, Kenney AM, Wechsler-Reya RJ, Dirks P, Aviv T, Grajkowska WA, Perek-Polnik M, Haberler CC, Delattre O, Reynaud SS, Doz FF, Pernet-Fattet SS, Cho BK, Kim SK, Wang KC, Scheur-len W, Eberhart CG, Fèvre-Montange M, Jouvet A, Pollack IF, Fan X, Muraszko KM, Gillespie GY, Di Rocco C, Massimi L, Michiels EM, Kloosterhof NK, French PJ, Kros JM, Olson JM, Ellenbogen RG, Zitterbart K, Kren L, Thompson RC, Cooper MK, Lach B, McLendon RE, Bigner DD, Fontebasso A, Albrecht S, Jabado N, Lindsey JC, Bailey S, Gupta N, Weiss WA, Bognár L, Klekner A, Van Meter TE, Kumabe T, Tominaga T, El-babaa SK, Leonard JR, Rubin JB, Liao LM, Van Meir EG, Fouladi M, Nakamura H, Cinalli G, Garami M, Hauser P, Saad AG, Iolascon A, Jung S, Carlotti CG, Vibhakar R, Ra YS, Robinson S, Zollo M, Faria CC, Chan JA, Levy ML, Sorensen PH, Meyerson M, Pomeroy SL, Cho YJ, Bader GD, Tabori U, Hawkins CE, Bouffet E, Scherer SW, Rutka JT, Malkin D, Clifford SC, Jones SJ, Korbel JO, Pfister SM, Marra MA, Taylor MD. Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes. *Nature* 2012; 488: 49–56

Northcott PA, Buchhalter I, Morrissy AS, Hovestadt V, Weischenfeldt J, Ehrenberger T, Gröbner S, Segura-Wang M, Zichner T, Rudneva VA, Warnatz HJ, Sidiropoulos N, Phillips AH, Schumacher S, Kleinheinz K, Waszak SM, Erkek S, Jones DTW, Worst BC, Kool M, Zapatka M, Jäger N, Chavez L, Hutter B, Bieg M, Paramasivam N, Heinold M, Gu Z, Ishaque N, Jäger-Schmidt C, Imbusch CD, Jugold A, Hübschmann D, Risch T, Amstislavskiy V, Gonzalez FGR, Weber UD, Wolf S, Robinson GW, Zhou X, Wu G, Finkelstein D, Liu Y, Cavalli FMG, Luu B, Ramaswamy V, Wu X, Koster J, Ryzhova M, Cho YJ, Pomeroy SL, Herold-Mende C, Schuhmann M, Ebinger M, Liao LM, Mora J, McLendon RE, Jabado N, Kumabe T, Chuah E, Ma Y, Moore RA, Mungall AJ, Mungall KL, Thiessen N, Tse K, Wong T, Jones SJM, Witt O, Milde T, Von Deimling A, Capper D, Korshunov A, Yaspo ML, Kriwacki R, Gajjar A, Zhang J, Beroukhir R, Fraenkel E, Korbel JO, Brors B, Schlesner M, Eils R, Marra MA, Pfister SM, Taylor MD, Lichter P. The whole-genome landscape of medulloblastoma subtypes. *Nature* 2017. 54: 311-317

Packer RJ, Cogen P, Vezina G, Rorke LB. Medulloblastoma: Clinical and biologic aspects. *Neuro Oncol* 1999; 1: 232–250

Packer RJ, Zhou T, Holmes E, Vezina G, Gajjar A. Survival and secondary tumors in children with medulloblastoma receiving radiotherapy and adjuvant chemotherapy: results of Children's Oncology Group trial A9961. *Neuro Oncol* 2013; 15: 97–103

Park AK, Lee JY, Cheong H, Ramaswamy V, Park SH, Kool M, et al., Subgroup-specific prognostic signaling and metabolic pathways in pediatric medulloblastoma. *BMC Cancer* 2019; 19: 571

Payapilly A, Malliri A. Compartmentalisation of RAC1 signalling. *Curr Opin Cell Biol* 2018; 54: 50–56

Peretti AS, Dominguez D, Grimes MM, Hathaway HJ, Prossnitz ER, Rivera MR, Wandinger-Ness A, Kusewitt DF, Hudson LG. The R-Enantiomer of Ketorolac Delays Mammary Tumor Development in Mouse Mammary Tumor Virus-Polyoma Middle T Antigen (MMTV-PyMT) Mice. *Am J Pathol* 2018; 188: 515–524

Pietsch T, Schmidt R, Remke M, Korshunov A, Hovestadt V, Jones DT, Felsberg J, Kaulich K, Goschzik T, Kool M, Northcott PA, von Hoff K, von Bueren AO, Friedrich C, Mytarek M, Skladny H, Fleischhack G, Taylor MD, Cremer F, Lichter P, Faldum A, Reifemberger G, Rutkowski S, Pfister SM. Prognostic significance of clinical, histopathological, and molecular characteristics of medulloblastomas in the prospective HIT2000 multicenter clinical trial cohort. *Acta Neuropathol* 2014; 128: 137–149

Poulikakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* 2010; 464: 427–430

Ramaswamy V, Remke M, Bouffet E, Bailey S, Clifford SC, Doz F, Kool M, Dufour C, Vassal G, Milde T, Witt O, von Hoff K, Pietsch T, Northcott PA, Gajjar A, Robinson GW, Padovani L, André N, Massimino M, Pizer B, Packer R, Rutkowski S, Pfister SM, Taylor MD, Pomeroy SL. Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era: the current consensus. *Acta Neuropathol* 2016; 131: 821–831

Ramaswamy V, Remke M, Bouffet E, Faria CC, Perreault S, Cho YJ, Shih DJ, Luu B, Dubuc AM, Northcott PA, Schüller U, Gururangan S, McLendon R, Bigner D, Fouladi M, Ligon KL, Pomeroy SL, Dunn S, Triscott J, Jabado N, Fontebasso A, Jones DT, Kool M, Karajannis MA, Gardner SL, Zagzag D, Nunes S, Pimentel J, Mora J, Lipp E, Walter AW, Ryzhova M, Zheludkova O, Kumirova E, Alshami J, Croul SE, Rutka JT, Hawkins C, Tabori U, Codisposi KE, Packer RJ, Pfister SM, Korshunov A, Taylor MD. Recurrence patterns across medulloblastoma subgroups: An integrated clinical and molecular analysis. *Lancet Oncol* 2013; 14: 1200–1207

Ridley AJ. Life at the leading edge. *Cell* 2011; 145: 1012–1022.

Rochkind S, Blatt I, Sadeh M, Goldhammer Y. Extracranial metastases of medulloblastoma in adults: Literature review. *Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991; 54: 80–86

Schoen LF, Craveiro RB, Pietsch T, Moritz T, Troeger A, Jordans S, Dilloo D. The PI3K inhibitor pictilisib and the multikinase inhibitors pazopanib and sorafenib have an impact

on Rac1 level and migration of medulloblastoma in vitro. *J Cell Mol Med* 2022; 26: 5832–5845

Schönholzer MT, Migliavacca J, Alvarez E, Santhana Kumar K, Neve A, Gries A, Ma M, Grotzer MA, Baumgartner M. Real-time sensing of MAPK signaling in medulloblastoma cells reveals cellular evasion mechanism counteracting dasatinib blockade of ERK activation during invasion. *Neoplasia* 2020; 22: 470–483

Schwalbe EC, Lindsey JC, Nakjang S, Crosier S, Smith AJ, Hicks D, Rafiee G, Hill RM, Iliasova A, Stone T, Pizer B, Michalski A, Joshi A, Wharton SB, Jacques TS, Bailey S, Williamson D, Clifford SC. Novel molecular subgroups for clinical classification and outcome prediction in childhood medulloblastoma: A cohort study. *Lancet Oncol* 2017; 18: 958–971

Sharma T, Schwalbe EC, Williamson D, Sill M, Hovestadt V, Mynarek M, Rutkowski S, Robinson GW, Gajjar A, Cavalli F, Ramaswamy V, Taylor MD, Lindsey JC, Hill RM, Jäger N, Korshunov A, Hicks D, Bailey S, Kool M, Chavez L, Northcott PA, Pfister SM, Clifford SC. Second-generation molecular subgrouping of medulloblastoma: an international meta-analysis of Group 3 and Group 4 subtypes. *Acta Neuropathol* 2019; 138: 309–326

Spiegler BJ, Bouffet E, Greenberg ML, Rutka JT, Mabbott DJ. Change in neurocognitive functioning after treatment with cranial radiation in childhood. *J Clin Oncol* 2004; 22: 706–713

Tan S, Yi P, Wang H, Xia L, Han Y, Wang H, Zeng B, Tang L, Pan Q, Tian Y, Rao S, Oyang L, Liang J, Lin J, Su M, Shi Y, Liao Q, Zhou Y. RAC1 Involves in the Radioreistance by Mediating a-Mesenchymal Transition in Lung Cancer. *Front Oncol* 2020; 10: 1–12

Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, Remke M, Cho YJ, Clifford SC, Eberhart CG, Parsons DW, Rutkowski S, Gajjar A, Ellison DW, Lichter P, Gilbertson RJ, Pomeroy SL, Kool M, Pfister SM. Molecular subgroups of medulloblastoma: The current consensus. *Acta Neuropathol* 2012; 123: 465–472

Thompson EM, Hielscher T, Bouffet E, Remke M, Luu B, Gururangan S, McLendon RE, Bigner DD, Lipp ES, Perreault S, Cho YJ, Grant G, Kim SK, Lee JY, Rao AAN, Giannini C, Li KKW, Ng HK, Yao Y, Kumabe T, Tominaga T, Grajkowska WA, Perek-Polnik M, Low DCY, Seow WT, Chang KTE, Mora J, Pollack IF, Hamilton RL, Leary S, Moore AS, Ingram WJ, Hallahan AR, Jouvett A, Fèvre-Montange M, Vasiljevic A, Faure-Contier C, Shofuda T, Kagawa N, Hashimoto N, Jabado N, Weil AG, Gayden T, Wataya T, Shalaby T, Grotzer M, Zitterbart K, Sterba J, Kren L, Hortobágyi T, Klekner A, László B, Pócza T, Hauser P, Schüller U, Jung S, Jang WY, French PJ, Kros JM, van Veelen MC, Massimi L, Leonard JR, Rubin JB, Vibhakkar R, Chambless LB, Cooper MK, Thompson RC, Faria CC, Carvalho A, Nunes S, Pimentel J, Fan X, Muraszko KM, López-Aguilar E, Lyden D, Garzia L, Shih DJH, Kijima N, Schneider C, Adamski J, Northcott PA, Kool M, Jones DTW, Chan JA, Nikolic A, Garre ML, Van Meir EG, Osuka S, Olson JJ, Jahangiri A, Castro BA, Gupta N, Weiss WA, Moxon-Emre I, Mabbott DJ, Lassaletta A, Hawkins CE, Tabori U, Drake J, Kulkarni A, Dirks P, Rutka JT, Korshunov A, Pfister SM, Packer RJ, Ramaswamy V, Taylor

MD. Prognostic value of medulloblastoma extent of resection after accounting for molecular subgroup: a retrospective integrated clinical and molecular analysis. *Lancet Oncol* 2016; 17: 484–495

Tong J, Li L, Ballermann B, Wang Z. Phosphorylation of Rac1 T108 by Extracellular Signal-Regulated Kinase in Response to Epidermal Growth Factor: a Novel Mechanism to Regulate Rac1 Function. *Mol Cell Biol* 2013; 33: 4538–4551

Van Ommeren R, Garzia L, Holgado BL, Ramaswamy V, Taylor MD. The molecular biology of medulloblastoma metastasis. *Brain Pathol* 2020; 30: 691–702

Vial E, Sahai E, Marshall CJ. ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility. *Cancer Cell* 2003; 4: 67–79

Vladoiu MC, El-Hamamy I, Donovan LK, Farooq H, Holgado BL, Sundaravadanam Y, Ramaswamy V, Hendrikse LD, Kumar S, Mack SC, Lee JJY, Fong V, Juraschka K, Przelicki D, Michealraj A, Skowron P, Luu B, Suzuki H, Morrissy AS, Cavalli FMG, Garzia L, Daniels C, Wu X, Qazi MA, Singh SK, Chan JA, Marra MA, Malkin D, Dirks P, Heisler L, Pugh T, Ng K, Notta F, Thompson EM, Kleinman CL, Joyner AL, Jabado N, Stein L, Taylor MD. Childhood cerebellar tumours mirror conserved fetal transcriptional programs. *Nature* 2019; 572: 67–73

Waszak SM, Northcott PA, Buchhalter I, Robinson GW, Sutter C, Groebner S, Grund KB, Brugières L, Jones DTW, Pajtler KW, Morrissy AS, Kool M, Sturm D, Chavez L, Ernst A, Brabetz S, Hain M, Zichner T, Segura-Wang M, Weischenfeldt J, Rausch T, Mardin BR, Zhou X, Baciuc C, Lawerenz C, Chan JA, Varlet P, Guerrini-Rousseau L, Fults DW, Grajkowska W, Hauser P, Jabado N, Ra YS, Zitterbart K, Shringarpure SS, De La Vega FM, Bustamante CD, Ng HK, Perry A, MacDonald TJ, Hernáiz Driever P, Bendel AE, Bowers DC, McCowage G, Chintagumpala MM, Cohn R, Hassall T, Fleischhack G, Eggen T, Wesenberg F, Feychting M, Lannering B, Schüz J, Johansen C, Andersen TV, Rööslä M, Kuehni CE, Grotzer M, Kjaerheim K, Monoranu CM, Archer TC, Duke E, Pomeroy SL, Shelagh R, Frank S, Sumerauer D, Scheurlen W, Ryzhova MV, Milde T, Kratz CP, Samuel D, Zhang J, Solomon DA, Marra M, Eils R, Bartram CR, von Hoff K, Rutkowski S, Ramaswamy V, Gilbertson RJ, Korshunov A, Taylor MD, Lichter P, Malkin D, Gajjar A, Korbel JO, Pfister SM. Spectrum and prevalence of genetic predisposition in medulloblastoma: a retrospective genetic study and prospective validation in a clinical trial cohort. *Lancet Oncol* 2018; 19: 785–798

Włodarski P, Grajkowska W, Łojek M, Rainko K, Jóźwiak J. Activation of Akt and Erk pathways in medulloblastoma. *Folia Neuropathol* 2006; 44: 214–220

Wesseling P, Pfister SM, Ellison DW, Tylor MD, Korshunov A, Northcott PA, Kaur K, Clifford SC. Embryonal Tumors. In: WHO Classification of Tumours Editorial Board. Central nervous system tumours [Internet]. Lyon (Frankreich): International Agency for Research on Cancer; 2021 [zitiert am 30.03.2024]. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 6). Abrufbar unter: <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/45>.

Wu X, Northcott PA, Dubuc A, Dupuy AJ, Shih DJ, Witt H, Croul S, Bouffet E, Fults DW, Eberhart CG, Garzia L, Van Meter T, Zagzag D, Jabado N, Schwartzentruber J, Majewski J, Scheetz TE, Pfister SM, Korshunov A, Li XN, Scherer SW, Cho YJ, Akagi K, MacDonald TJ, Koster J, McCabe MG, Sarver AL, Collins VP, Weiss WA, Largaespada DA, Collier LS, Taylor MD. Clonal selection drives genetic divergence of metastatic medulloblastoma. *Nature* 2012; 482: 529–533

Xue G, Restuccia DF, Lan Q, Hynx D, Dirnhofer S, Hess D, Rüegg C, Hemmings BA. Akt/PKB-mediated phosphorylation of Twist1 promotes tumor metastasis via mediating cross-talk between PI3K/Akt and TGF- β signaling axes. *Cancer Discov* 2012; 2: 248–259

Yokoyama N, Matsunobu T, Matsumoto Y, Fukushima JI, Endo M, Hatano M, Nabeshima A, Fukushima S, Okada S, Iwamoto Y. Activation of ERK1/2 Causes Pazopanib Resistance via Downregulation of DUSP6 in Synovial Sarcoma Cells. *Sci Rep* 2017; 7: 1–12

Yuan L, Santi M, Rushing EJ, Cornelison R, MacDonald TJ. ERK activation of p21 activated kinase-1 (Pak1) is critical for medulloblastoma cell migration. *Clin Exp Metastasis* 2010; 27: 481–491

Zapotocky M, Mata-Mbemba D, Sumerauer D, Liby P, Lassaletta A, Zamecnik J, Krskova L, Kyncl M, Stary J, Laughlin S, Arnoldo A, Hawkins C, Tabori U, Taylor MD, Bouffet E, Raybaud C, Ramaswamy V. Differential patterns of metastatic dissemination across medulloblastoma subgroups. *J Neurosurg Pediatr* 2017: 1–8

Zavarella S, Nakada M, Belverud S, Coniglio SJ, Chan A, Mittler MA, Schneider SJ, Symons M. Role of Rac1-regulated signaling in medulloblastoma invasion. Laboratory investigation. *J Neurosurg Pediatr* 2009; 4: 97–104

Zeltzer PM, Boyett JM, Finlay JL, Albright AL, Rorke LB, Milstein JM, Allen JC, Stevens KR, Stanley P, Li H, Wisoff JH, Geyer JR, McGuire-Cullen P, Stehbens JA, Shurin SB, Packer RJ. Metastasis stage, adjuvant treatment, and residual tumor are prognostic factors for medulloblastoma in children: Conclusions from the Children's Cancer Group 921 randomized phase III study. *J Clin Oncol* 1999; 17: 832–845

Zhukova N, Ramaswamy V, Remke M, Pfaff E, Shih DJ, Martin DC, Castelo-Branco P, Baskin B, Ray PN, Bouffet E, von Bueren AO, Jones DT, Northcott PA, Kool M, Sturm D, Pugh TJ, Pomeroy SL, Cho YJ, Pietsch T, Gessi M, Rutkowski S, Bogner L, Klekner A, Cho BK, Kim SK, Wang KC, Eberhart CG, Fevre-Montange M, Fouladi M, French PJ, Kros M, Grajkowska WA, Gupta N, Weiss WA, Hauser P, Jabado N, Jouvett A, Jung S, Kumabe T, Lach B, Leonard JR, Rubin JB, Liao LM, Massimi L, Pollack IF, Shin Ra Y, Van Meir EG, Zitterbart K, Schüller U, Hill RM, Lindsey JC, Schwalbe EC, Bailey S, Ellison DW, Hawkins C, Malkin D, Clifford SC, Korshunov A, Pfister S, Taylor MD, Tabori U. Subgroup-Specific Prognostic Implications of TP53 Mutation in Medulloblastoma. *J Clin Oncol* 2013; 31: 2927–2935

Zugasti O, Rul W, Roux P, Peyssonnaud C, Eyche A, Franke TF, Fort P, Hibner U. Raf-MEK-Erk Cascade in Anoikis Is Controlled by Rac1 and Cdc42 via Akt. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 6706–6717.

2. Veröffentlichung



Received: 22 February 2022 | Revised: 24 September 2022 | Accepted: 28 September 2022

DOI: 10.1111/jcmm.17604

ORIGINAL ARTICLE

WILEY

The PI3K inhibitor pictilisib and the multikinase inhibitors pazopanib and sorafenib have an impact on Rac1 level and migration of medulloblastoma in vitro

Leonie F. Schoen¹ | Rogerio B. Craveiro² | Torsten Pietsch³ | Thomas Moritz⁴ | Anja Troeger⁵ | Silvia Jordans¹ | Dagmar Dilloo¹

¹Department of Pediatric Hematology and Oncology, Center for Pediatrics, University Hospital Bonn, Bonn, Germany

²Department of Orthodontics, University Hospital RWTH Aachen, Aachen, Germany

³Department of Neuropathology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany

⁴Institute of Experimental Hematology, Hannover Medical School, Hannover, Germany

⁵Department of Pediatric Hematology, Oncology and Stem Cell Transplantation, University Hospital Regensburg, Regensburg, Germany

Correspondence

Leonie F. Schoen, Department of Pediatric Hematology and Oncology, Center for Pediatrics, University of Bonn Medical Center, Venusberg-Campus 1, 53127 Bonn, Germany.

Email: leonie.schoen@uni-bonn.de

Abstract

Metastatic disease is the leading cause of death in children suffering from medulloblastoma and a major treatment challenge. The evidence of leptomeningeal dissemination defines the most aggressive tumours and is associated with increased mortality; thus, inhibition of migration as a factor involved in the process of metastatic disease is fundamental for the treatment and prevention of metastatic dissemination. Targeting the small Rho GTPases Rac1 has been shown to effectively impair medulloblastoma cell migration in vitro. Yet clinically applicable selective Rac1 inhibitors are still lacking. In view of the pertinent oncogenic role of the PI3K signalling cascade and tyrosine kinase-mediated signalling pathways in medulloblastoma, we explored clinically available targeted therapeutics to this effect. Here, we show that Rac1 is expressed in both the cytoplasm and nucleus in the medulloblastoma cell lines Daoy and MEB-Med-8A representative of two high risk medulloblastoma entities. We demonstrate that activated Rac1 is subject to substantial downmodulation following administration of the clinically available inhibitor of the PI3K pathway Pictilisib (GDC-0941) and the multityrosine kinase inhibitors Pazopanib and Sorafenib. The application of those drugs was associated with reduced mobility of the medulloblastoma cells and alterations of the actin skeleton. Of note, PI3K inhibition reveals the strongest anti-migratory effect in Daoy cells. Thus, our in vitro observations provide new insights into different strategies of blocking Rac1 and inhibiting migration in medulloblastoma employing clinically available agents paving the way for confirmatory studies in in vivo models.

KEYWORDS

actin cytoskeleton, cell migration, ERK/MAPK, medulloblastoma, PI3K, Rac1

Leonie F. Schoen and Rogerio B. Craveiro contributed equally to this work.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2022 The Authors. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* published by Foundation for Cellular and Molecular Medicine and John Wiley & Sons Ltd.

1 | INTRODUCTION

Medulloblastoma is the most common malignant brain tumour in children. Despite ongoing optimization of standard therapy, the prognosis for high-risk cases is still poor.^{1,2} The current WHO classification divides medulloblastoma into different molecularly defined types each associated with a distinct risk profile.³ Clinically, disseminated disease is present in up to one-third of medulloblastoma patients at diagnosis and has a high negative impact on survival representing one of the major treatment challenges.^{2,4-6} Thus, novel therapeutic strategies geared towards inhibition of local and metastatic spread are warranted to improve prognosis.^{2,7}

Several signalling pathways have been shown to be involved in tumour dissemination in medulloblastoma. The platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) overexpressed in metastatic medulloblastoma was found to be one of the key modulators of metastasis.⁸⁻¹¹ Activation of upstream tyrosine kinase receptors drives oncogenic processes in medulloblastoma via the Ras/MAPK pathway as well as PI3K signalling.¹²⁻¹⁵ Downstream, the MAPK- and PI3K-pathways influence the activity of Rho GTPases. They represent a family of small signalling G proteins that orchestrate conformational changes of the actin cytoskeleton modulating cellular polarity and motility. Rho GTPases cycle between an active GTP-bound and an inactive GDP-bound conformation with guanine exchange factors (GEF) supporting the activation state by deactivation of GTPase-activating proteins (GAP). Furthermore, guanine nucleotide dissociation inhibitors (GDI) stabilize Rho GTPases in an inactive state.^{16,17} There is abundant evidence for the central role of the Rho GTPase Rac1 for tumour invasiveness and metastatic growth. Rac1 has also been attributed a central role in epithelial to mesenchymal transition (EMT) enhancing the migratory capacity of tumour cells with a negative impact on prognosis.¹⁷⁻¹⁹ Rac1 expression has been confirmed by immunohistochemistry in a series of medulloblastoma specimens and has been shown to act as a central effector of migration in medulloblastoma models.^{9,18,20,21,22} While genetic silencing or chemical inhibition have been successfully employed so far in tumour models, no pharmacological Rac1-specific inhibitors are currently available for clinical use.^{18,21,22} Therefore, the application of clinically approved drugs that either interfere with upstream regulators of Rac1 activation or block downstream effectors represent a potential therapeutic option worth exploring.

We have previously demonstrated that the multikinase inhibitors (MKI) Pazopanib and Sorafenib targeting the PDGFR among other tyrosine kinase receptors and the direct PI3K-inhibitor Pictilisib (GDC-0941) exhibit potent anti-neoplastic capacities in orthotopic xenograft models of medulloblastoma including anti-migratory effects *in vitro*.^{23,24} Thus, the three drugs target signalling elements upstream of Rac1 and show acceptable tolerability in clinical studies in addition to anti-neoplastic activity in different tumour types including advanced renal cell carcinoma, hepatocellular carcinoma and solid tumours.²⁵⁻²⁷ In the present report, we demonstrate that both MKI and the PI3K inhibitor reduce levels of activated Rac1 in two medulloblastoma cell lines representing two molecularly defined

medulloblastoma entities with high metastatic potential. The cell line MEB-Med-8A has been derived from anon-WNT/non-SHHMB (group 3) and bears a MYC amplification which has been shown to promote migration and metastasis in medulloblastoma.^{28,29} The cell line Daoy displays markers of SHH activation and carries a mutation of the TP53 suppressor gene.^{29,30} We describe here distinct modulation of the actin cytoskeleton and inhibition of migration in these two medulloblastoma cell lines through targeting critical signalling pathways upstream of Rac1.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Reagents and antibodies

Pictilisib (GDC-0941) applied at 1 μ M, Pazopanib (GW786034B) applied 15 μ M and Sorafenib (BAY 43-9006) applied at 10 μ M were obtained from LC Laboratories and dissolved in cell culture grade DMSO (Sigma Aldrich). All antibodies used in this study are given in Table S1 (supplementary files). Alexa Flour® 555 coupled Rhodamine Phalloidin for actin staining was purchased from Invitrogen, Thermofisher.

2.2 | Cell culture

The medulloblastoma cell line Daoy (HTB 186) was obtained from ATCC and the medulloblastoma cell line MEB-Med-8A was kindly provided by Prof. T. Pietsch, University of Bonn. Both were maintained in complete medium comprising Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen) including L-glutamine and supplemented with 1 mM sodium pyruvate (PAA), 100 U/ml penicillin (Invitrogen), 100 μ l/ml streptomycin (Invitrogen) and 10% foetal bovine serum (FBS, Invitrogen) under standard culture conditions.

2.3 | Immunofluorescence microscopy

Daoy (2×10^4) and MEB-Med-8A (4×10^4) cells were seeded in 12-well culture dishes containing sterilized coverslips and allowed to adhere overnight in complete medium. Cells for scratch assays were seeded on glass coverslips (Rac1 staining) or in 12-wells (actin stains) to reach about 90% of confluency. Then, monolayers were scratch wounded using a pipette tip and wells were washed once with pre-warmed PBS before applying new medium containing inhibitors in the above-mentioned concentrations.

Inhibitor treatment was performed for indicated time intervals and cells were fixed afterwards with 4% paraformaldehyde for 10 min at 37°C. Following 5 min permeabilization (0.2% Triton X-100, Boehringer Mannheim) and 60 min blocking with 3% BSA in PBS, cells were stained with primary antibody overnight in a moisturized chamber at 4°C. After washing with PBS, secondary antibodies were applied for 90 min at RT. Rhodamine Phalloidin (Invitrogen, Thermofisher) was

added for 20 min (scratch assays) or in combination with the secondary antibody (Rac1/actin counterstain). Cells were embedded in Prolong Glass antifade solution including DAPI (Invitrogen) to stain nuclei. Immunofluorescence microscopy was performed with a Nikon Eclipse TiS inverted microscope equipped with a CCD monochrome camera DS 2 M. Images were analysed with Fiji imaging software (ImageJ, 1.53c/NIH). Confocal microscopy was performed with the Nikon A1 LFOV in Galvano Scan mode (for 488 nm and 561 nm laserlines) or PMT (405 nm laserline) at a pinhole setting of 1 AU and a dimension of 1024 × 1024 pixels. Laser power, PM detector gains and offset were set with DMSO samples and kept constant for inhibitor-treated samples of the same experimental batch to ensure comparability. Z-stacks from top to bottom of the cells were taken in 0.3 µm steps and extended focus pictures were prepared in average intensity Z-projection mode (ImageJ, 1.53c/NIH).

2.4 | Analysis of cell migration after scratch wounding

The in vitro scratch assay was performed as described by Liang et al.³¹. Briefly, Daoy and MEB-Med-8A cells were plated in 12-well cell culture dishes and allowed to adhere and spread for 12 h at 37°C. The confluent monolayer was scratched in a straight line with a p200 pipette tip for Daoy or a p100 pipette tip for MEB-Med-8A. Cellular debris was washed off and the cells were incubated with 1 µM Pictilisib (GDC-0941), 15 µM Pazopanib or 10 µM Sorafenib. The migration of the cells into the scratch was documented at the same area every 6 h of treatment using 10× magnification (Nikon Eclipse TiS inverted microscope equipped to a CCD monochrome camera DS 2 M). The scratch closure was analysed using NIS-Elements Imaging Software by assigning cell-free areas as ROI and comparing decrease of wound area between untreated and treated conditions after indicated time intervals.

2.5 | Determination of cell viability and cell death effects

Medulloblastoma cell lines Daoy (3×10^5) or MEB-Med-8A (7×10^5) were seeded in 6-well cell culture dishes in complete medium. After overnight culture, cells were treated with inhibitors for 6, 12 or 24 h. Supernatants and trypsinized cells were collected and combined after the indicated time intervals, resuspended in an equal volume of PBS and stained with Propidium-Iodide (Milenyi Biotech). The number of viable versus dead cells was analysed by Flow Cytometry (Navios, Beckman Coulter) by counting cells for 120 s in the same volume and at constant speed.

2.6 | GTP-bound Rac1 pull-down assay

A Rac1 Activation Magnetic Beads Pulldown Assay was performed following the manufacturer's instructions (Merck Millipore). Briefly,

cells were cultured on cell culture dishes in complete medium. Cells were treated with inhibitors for 24 h. After collection and centrifugation of floating cells, the monolayers were washed once with ice-cold PBS, scraped off the dish in 800 µl of the provided lysis buffer including phosphatase and protease inhibitors (Roche), and combined with the floating cells' fraction. After pelleting cell debris at 4°C for 10 min, the supernatant was measured for protein content using protein Assay (BioRad). For assessment of total Rac1 protein, 25 µg of lysates were separated by SDS-PAGE while for GTP-bound Rac1 samples were diluted to 1 mg/ml in lysis buffer and 1 mg of total protein was incubated with 10 µl PAK-PBD for 45 min at 4°C. Beads were magnetically collected, repeatedly washed in lysis buffer, centrifuged and resuspended in 10 µl of 2× Laemmli sample buffer (Bio-Rad).

2.7 | Subcellular fractionation

Subcellular fractions were prepared following the method described in Tong et al.³² Briefly, cells were grown in 10 cm culture dishes for 48 h, washed twice with cold PBS and scraped off the plates in 500 µl homogenization buffer including phosphate and protease inhibitor mix (Roche). Homogenates were passed through a 23-gauge needle 20 times on ice and nuclei were separated from cytoplasmatic and membrane contents by centrifugation at $200 \times g$ for 10 min at 4°C. The supernatants were collected as 'cytosolic fraction', while the pellet contained the 'nuclear fraction'. Cytosolic fractions were centrifuged at $14,000 \times g$ for 10 min to clear the fraction from nuclear remains. Nuclear fractions were resuspended in 200 µl of homogenization buffer and again centrifuged at $200 \times g$ for 10 min at 4°C to remove remains of the cytoplasm and membranes. This washing step was repeated 3 times. The last nuclear pellet was resuspended in 100 µl of RIPA buffer (Merck Millipore, incl. inhibitors). As nuclear fractions contained a high amount of DNA, samples were subjected to ultrasound treatment for 5 min to fragment DNA strands. Equal protein amounts were loaded on SDS-PAGE according to protein determination (Precision Red Advanced Protein Assay Reagent, Cytoskeleton Inc.).

2.8 | Immunoblotting and densitometry

Separated proteins from SDS-PAGE were transferred onto nitrocellulose membranes by semi-dry blotting at 25 V for 30 min (Bio-Rad). The membranes were blocked for 1 h at RT in 1× Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20 (TBST) supplemented with 5% BSA. Primary antibody incubation was carried out overnight at 4°C and followed by incubation with the respective secondary antibody for 1 h at room temperature. Immunoreactivity was detected by chemiluminescence (PIERCE ECL western blotting substrate, Thermofisher) and quantified by ChemiDoc XRS Imaging System (Bio-Rad). Blots from Figure 1D were analysed with the SpectraMax i3X (Molecular Devices) equipped with a ScanLater module in high resolution scan. Densitometry of Western blots was performed using ImageJ 1.53c.

2.9 | Statistical analysis

The two-sided Student's *t*-test (Graph Pad Prism) was applied to determine statistical significance of difference between groups. $p < 0.05$ (*) was considered as statistically significant. Values stated within the text and figures represent mean $\pm$ standard deviation.

3 | RESULTS

3.1 | Daoy and MEB-Med-8A exhibit different morphology of the actin skeleton

The two medulloblastoma cell lines Daoy and MEB-Med-8A representative of different molecular MB types with high metastatic potential present with a different morphology of the actin cytoskeleton after phalloidin staining (Figure 1A). Daoy cells displayed a voluminous cortical actin network framing the cytoplasmic border. MEB-Med-8A cells were overall smaller and appeared more compact in direct comparison with Daoy cells. They exhibited prominent stress fibres, and the membranes showed less actin-rich protrusions. The nuclei of MEB-Med-8A cells were usually kidney-shaped, sometimes also highly deformed with aggregates of actin located next to the indentation of the nucleus. Rac1 is ubiquitously expressed in the human body and locates to both, the cytoplasm and the nucleus.³³ In Daoy cells, Rac1 accumulated in a circular formation around the nucleus with gradual dissipation into the cytoplasm towards the plasma membrane where accentuated Rac1 staining was shown. In MEB-Med-8A cells, compact Rac1 accumulations were found in the nuclear indentation localizing in the same place as the actin conglomeration and additionally dispersed throughout the cytoplasm (Figure 1B). In keeping with the Western blot analysis of

cytoplasmatic and nuclear fractions of Rac1 (Figure 1C) fluorescent staining revealed a Rac1 signal in the nuclei of both cell lines.

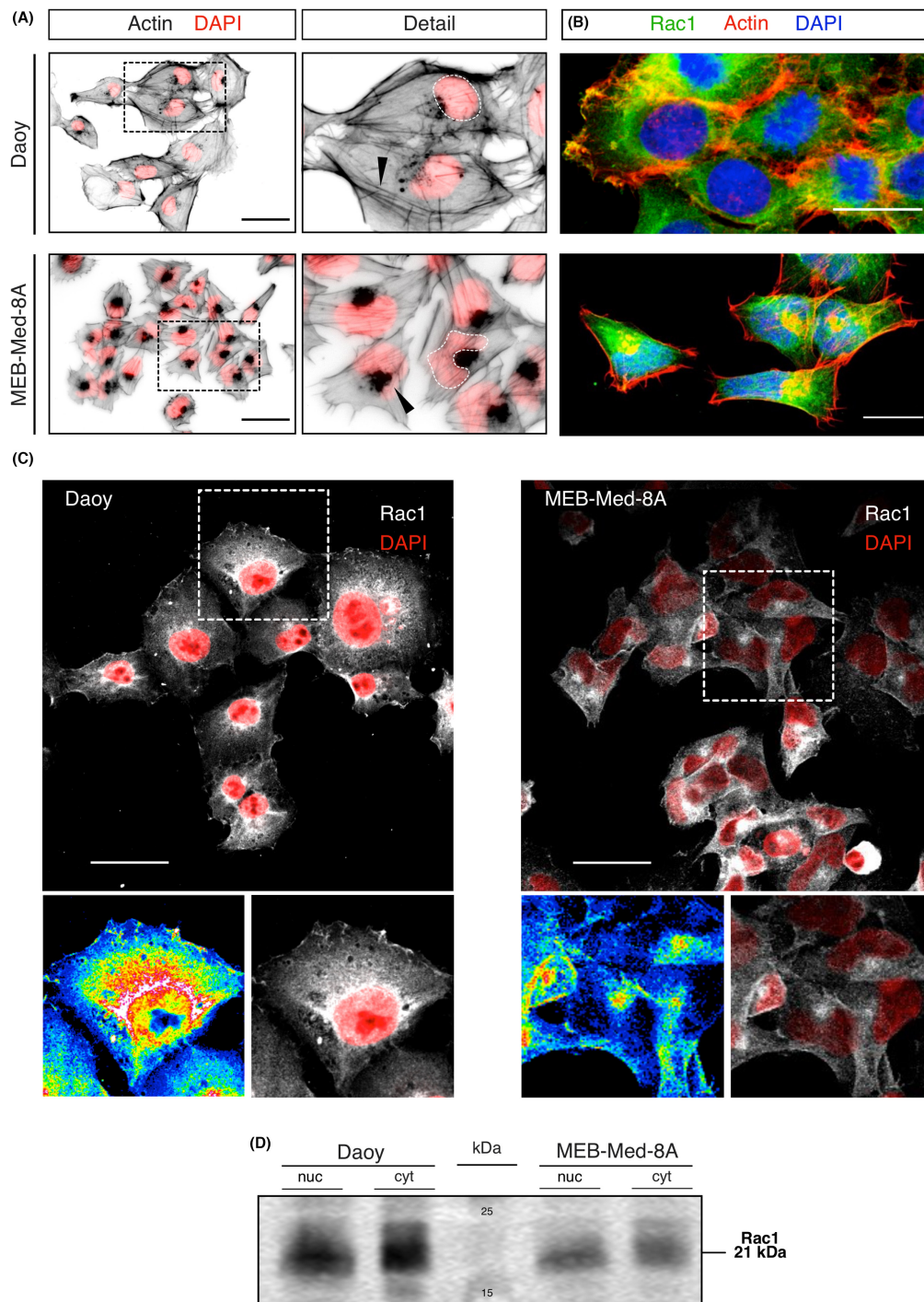
3.2 | PI3K and multikinase inhibition promoted the disassembly of actin-rich protrusions

To examine the influence of the drug treatment on localization of Rac1 and cytoskeletal confirmation, microfilaments were fluorescently labelled by AlexaFluor-555 coupled phalloidin (Figures 2A and 3A). Representative pictures after 24 h are shown except for MEB-Med-8A treated with Pazopanib and Sorafenib as the effect of these drugs was seen earlier and the MEB-Med-8A cells started to detach after 12 h of exposure to the MKI.

Application of Pictilisib resulted in the reduction of the cortical actin network and membrane protrusions. The cortical actin rich protrusions were thinning out in Daoy cells and both cell lines appeared in an overall more rounded shape. After 24 h of treatment with the PI3K inhibitor, cells of both cell lines were aggregated in small islands with rounded borders, tight cell-cell connections and more apparent stress fibres.

In contrast, Pazopanib and Sorafenib caused clumping of the microfilaments in the former filigree actin-based protrusions, while the cells lost their rounded shape and the circular arrangement of actin, particularly in Daoy. The cellular appearance was more spindle-shaped, as actin-rich protrusions became elongated extending into different directions resulting in an overall stellate appearance of the cell formation. Cell-cell connections were less prominent and especially Sorafenib caused pronounced elongation in the cells in both cell lines. MEB-Med-8A cells progressively decreased in size and lost components of the cytoskeleton, which had spanned out the cytoplasm in untreated cells. Cell-cell connections were diminished, and

FIGURE 1 Medulloblastoma cells of different subgroups reveal distinct actin cytoskeletal features, nuclear shape, and differential distribution of Rac1. (A) Actin skeleton of Daoy and MEB-Med-8A cells was stained with Alexa Fluor-555 coupled phalloidin 24 h after seeding and imaged by fluorescence microscopy (40x objective). Grey scale images were inverted to show phalloidin-staining (actin) in black and merged with RGB images showing nuclei (DAPI counterstain) in red. Dashed white lines outline nuclear shapes displaying a characteristic deformation of the nucleus in MEB-Med-8A cells. Actin cytoskeleton was arranged in a prominent circular structure underlying the cellular cortex in Daoy cells or in distinct perinuclear accumulations in MEB-Med-8A cells (black arrowheads, detail view) situated in the characteristic nuclear indentation. Pictures are representative of three independent experiments. Scales indicate 50 μ m. (B) Microfilaments (actin, red), nucleus (DAPI, blue) and Rac1 (green) were stained in medulloblastoma cell lines and Z-stacks were prepared by means of confocal laser-scanning microscopy with a 40x water immersion objective (NA 1.15). The extended focus pictures show subcellular distribution of Rac1 with respect to actin filaments. Rac1 is seen in the cytoplasm in both cell lines and additionally localizes to the cortical network at the plasma membrane in Daoy cells, while in MEB-Med-8A cells Rac1 is located to the microfilament accumulation in close vicinity to the nucleus but does not seem to be present at high concentrations at the cell boundary. Scales indicate 20 μ m. (C) Daoy and MEB-Med-8A cells were stained for Rac1 (grayscale) and DAPI (red) and imaged by confocal laser-scanning microscopy as described in (B). Extended focus pictures show the subcellular distribution of Rac1 in the two different cell lines with respect to the nucleus and cytoplasm. Detailed views (inserts) in grayscale and 16-colour lookup tables (LUT) illustrate that the major proportion of Rac1 is in a ring like structure around the nucleus and thinned out towards the cellular border. In MEB-Med-8A cells the maximum signal of Rac1 was captured in an aggregation equivalent to the actin accumulation and situated close to the nucleus or within the nuclear indentation characteristic of MM8A. Scales indicate 50 μ m. (D) Subcellular fractions of medulloblastoma cells were analysed by immunoblot to assess the presence of Rac1 in the cytoplasmatic and nuclear compartment of both cell lines. Either fraction shows positive signals for Rac1 upon detection using a Rac1 specific antibody (BD Biosciences). The expected molecular weight (21 kDa) is confirmed by the molecular weight marker shown in the middle lane (kDa). Results are representative of three independent experiments.



cells arranged in a more linear manner. These effects were accompanied by increased detachment and ensuing apoptosis.

3.3 | PI3K blockade by Pictilisib (GDC-0941) and suppression of tyrosine kinase signalling by the MKI Pazopanib and Sorafenib caused cytoskeletal changes and interfered with migration

To evaluate the influence of PI3K- and multikinase inhibition on tumour cell mobility, we stained scratched cells with fluorescently labelled phalloidin and DAPI-counterstain after DMSO or drug treatment. DMSO-treated migrating Daoy cells presented hallmarks of collective cell migration in which one cell appeared to lead a group of cells (Daoy, Figure 2B). The leading cells displayed more actin-rich protrusions than the cells that followed the leading edge. Untreated MEB-Med-8A cells exhibited a different migratory pattern and migrated more slowly into the scratch (MEB-Med-8A, Figure 3B). In contrast to Daoy cells, the MEB-Med-8A cells appeared not to migrate in group formation. They showed less actin-rich protrusions of which just a few showed an orientation towards the opposite side of the scratch.

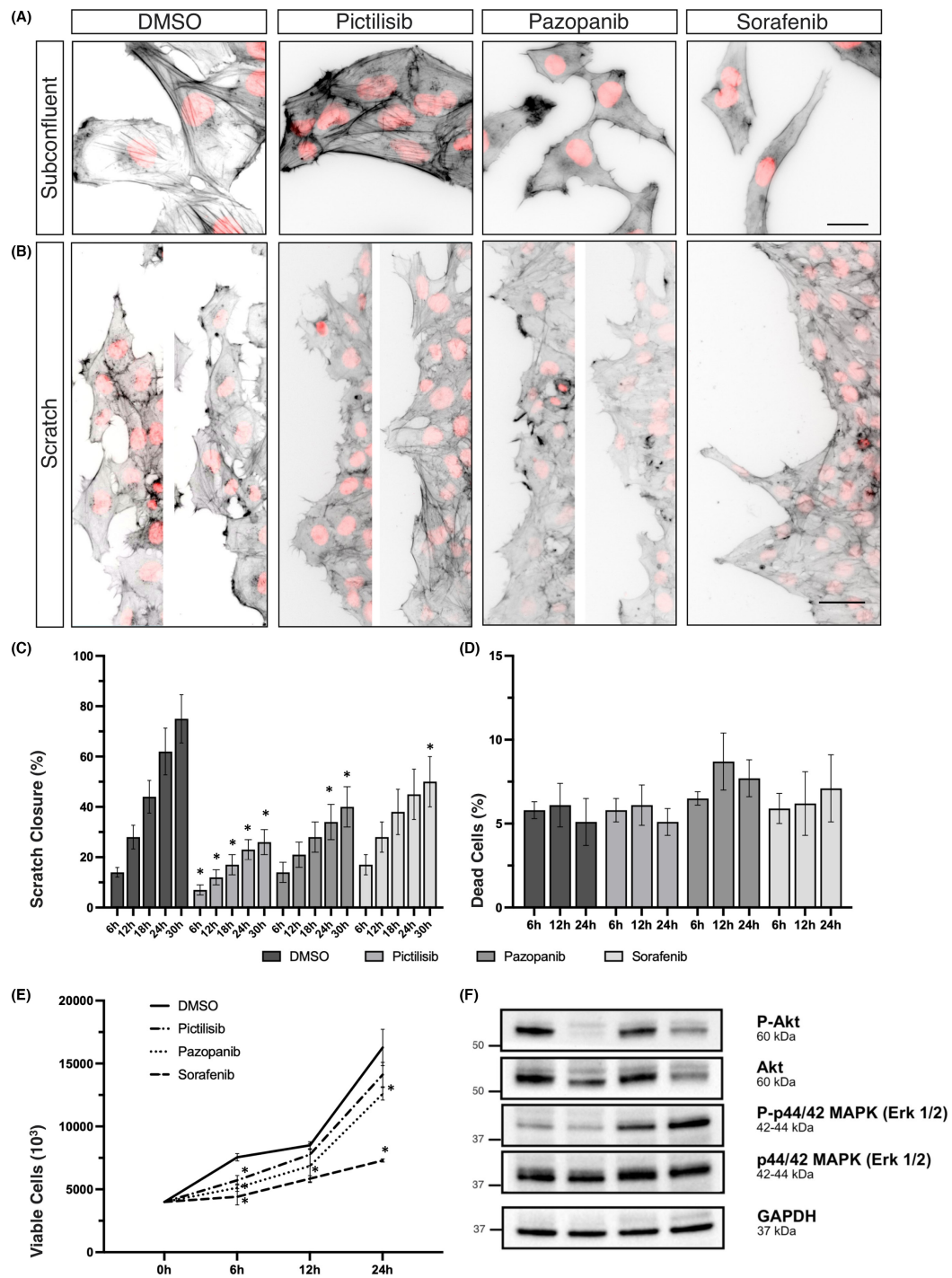
The application of the PI3K inhibitor Pictilisib led to an overall reduction of actin-rich protrusions and flattened the scratch borders in both cell lines. In Daoy, it reduced the formation of groups reaching out into the scratch. These observations match with those made in the subconfluent cell staining (Figures 2A and 3A) and may well contribute to the impairment of migration in both cell lines. Treatment with the MKI Pazopanib and Sorafenib induced disassembly of actin-rich protrusions at the scratch border in both cell lines and Sorafenib additionally led to an elongation of Daoy cells. In MEB-Med-8A, the MKI also caused an increasing loss of adhesive capacities resulting in the detachment of MEB-Med-8A cells after around 12 h of drug exposure.

3.4 | PI3K inhibition impairs migration more effectively than interference with tyrosine kinase receptors

In order to compare the anti-migratory capacity of Pictilisib, Pazopanib and Sorafenib, we analysed wound closure of the scratch assays with respect to early phase of drug exposure (Figure 2C (Daoy) and Figure 3C (MEB-Med-8A)). The PI3K inhibitor revealed the most effective inhibition of migration in Daoy cells. After 6 h, wound closure was already significantly impaired by Pictilisib. After 30 h of Pictilisib treatment, only $26.2 \pm 4.6\%$ of the scratch wound was closed compared with $74.8 \pm 9.6\%$ wound closure in untreated Daoy cells. The MKI slowed down the migration of Daoy cells less effectively with a significant anti-inhibitory effect seen at 18 h following Pazopanib treatment. At that time, wound closure was at $27.6 \pm 6.4\%$ compared with $43.9 \pm 6.5\%$ in the untreated control. For Sorafenib, the inhibitory effect on migration reached significance only after 30 h of drug exposure with $50.2 \pm 10.4\%$ of the scratch closed compared with $74.8 \pm 9.6\%$ in untreated cells. Sorafenib differed from Pazopanib and the PI3K inhibitor in that it also exerted considerable anti-proliferative activity over the complete assessed time interval starting at 6 h of treatment (Figure 2E).

MEB-Med-8A cells migrate considerably slower than Daoy cells with only $18.62 \pm 2.3\%$ of wound closure in untreated MEB-Med-8A observed after 30 h (Figure 3C). As in Daoy, in MEB-Med-8A, the PI3K inhibitor suppressed cellular motility profoundly with significant attenuation of migration discernable as early as 6 h of Pictilisib application. Even after 30 h only $4.2 \pm 0.7\%$ of the scratch wound was closed. Of note, PI3K inhibition did not affect cellular survival or cellular proliferation and was therefore likely to dominantly suppress the migratory capacities during this early phase of drug exposure (Figure 3E).

FIGURE 2 PI3K- and multikinase inhibition alter the actin cytoskeleton and interfere with migration of Daoy cells. (A) Daoy cells were seeded and Pictilisib (GDC-0941, 1 μ M), Pazopanib (15 μ M), and Sorafenib (10 μ M) were applied for 24 h. Cells were stained with Alexa Fluor-555 coupled phalloidin to visualize the actin cytoskeleton (grayscale, inverted) and DAPI as nuclear counterstain (red). Images were captured using a fluorescence microscope (40x objective) and processed in ImageJ. Data are representative of two independent experiments. Scales indicate 25 μ m. (B) A confluent monolayer of Daoy cells was scratch wounded, debris was gently washed off and fresh medium including kinase inhibitors was applied. After 24 h the actin cytoskeleton was stained with Alexa Fluor-555 coupled phalloidin (grayscale, inverted) and DAPI as nuclear counterstain (red). Fluorescence microscopy was performed using a 10x objective. Two images of representative staining from two independent experiments are presented except for Sorafenib. In the latter we focused on showing a larger scratch border to better present elongated cells. Scales indicate 50 μ m. (C) Scratches were performed as described above and treated with kinase inhibitors. After incubation for 0, 6, 12, 24, and 30 h non-stained living cells were imaged using an inverted microscope in phase contrast taking care to image exactly the same scratch region. The kinetic of the scratch closure was analysed using NIS imaging software by measuring the size of the area of the cell free zone in each distinct scratch region after the indicated time interval. Results are shown in comparison to the untreated cells. All values below an asterisk show significantly lower scratch closure compared with the DMSO control group (* $p < 0.05$). The data represent the mean $\pm$ SD of two independent experiments. (D and E) Daoy cells were seeded in 6-well plates and inhibitors were applied. The fraction of PI-positive dead cells (D) and number of viable cells (E) was assessed after 6, 12 and 24 h by flow cytometry. All values below an asterisk show significantly changed cell survival compared with the DMSO control group (* $p < 0.05$). The data shown represent the mean $\pm$ SD of three independent experiments. (F) Daoy cells were treated with inhibitors for 24 h and cell lysates were prepared followed by SDS-PAGE and immunoblot to assess total protein levels of (p-)Akt and (p-)Erk with GAPDH as loading control. The same GAPDH bands are shown in Figure 4B since they were part to the same experiment. The data shown are representative of two independent experiments.



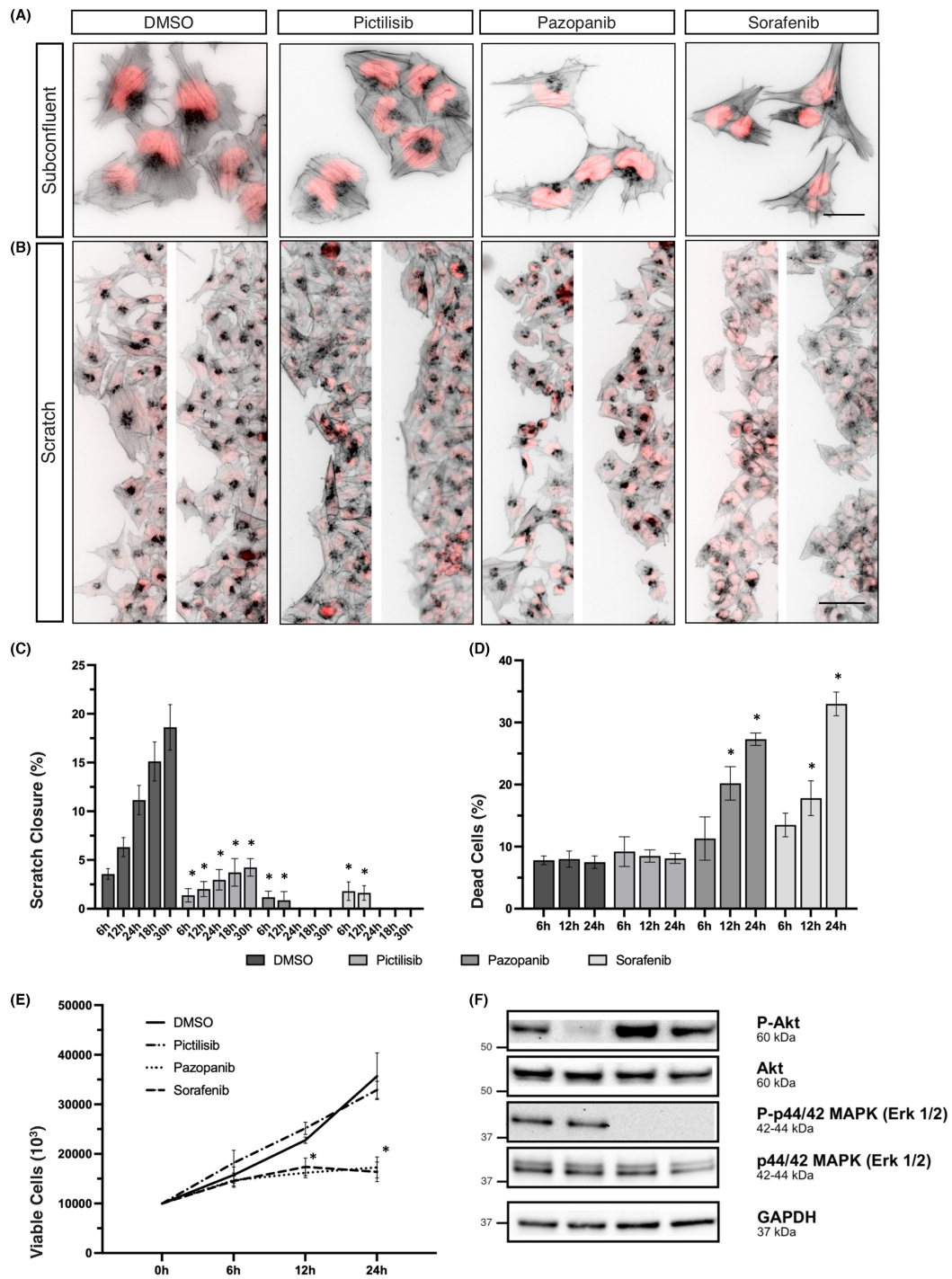


FIGURE 3 PI3K- and multikinase inhibition alter the actin cytoskeleton and interfere with migration of MEB-Med-8A. (A) MEB-Med-8A cells were seeded and treated with inhibitors for 24 h (Pictilisib) or 12 h (Pazopanib and Sorafenib) and stained with Alexa Fluor-555 coupled phalloidin to visualize the actin cytoskeleton (grayscale, inverted) and DAPI as nuclear counterstain (red). Images were captured using a fluorescence microscope (40x objective) and processed in ImageJ. Data are representative of two independent experiments. Scales indicate 25 μ m. (B) A confluent grown monolayer of MEB-Med-8A cells was scratch wounded, debris was gently washed off and fresh medium including kinase inhibitors was applied. After 24 h (DMSO and Pictilisib) and 12 h (Pazopanib and Sorafenib) the actin cytoskeleton was stained with Alexa Fluor-555 coupled phalloidin (grayscale, inverted) and DAPI as nuclear counterstain (red). Fluorescence microscopy was performed using a 10x objective. Two images of representative staining from two independent experiments are presented. Scales indicate 50 μ m. (C) Scratches were performed as described above and treated with kinase inhibitors. After incubation for 0, 6, 12, 24, and 30 h non-stained living cells were imaged using an inverted microscope in phase contrast taking care to repetitively image the same scratch region. The kinetic of the scratch closure was analysed using NIS imaging software by measuring the size of the cell free area in the distinct scratch regions after the indicated time interval. Results are shown in comparison to the untreated cells. All values below an asterisk show significantly lower scratch closure compared with the DMSO control group (* $p < 0.05$). The data represent the mean $\pm$ SD of two independent experiments. (D and E) MEB-Med-8A cells were seeded in 6-well plates and PI3K- or tyrosine kinase inhibitors were applied. The percentage of viable cells (E) and of PI-positive dead cells (D) was assessed after 6, 12 and 24 h by flow cytometry. All values below an asterisk are significantly different from control (* $p < 0.05$). The data shown represent the mean $\pm$ SD of three independent experiments. (F) MEB-Med-8A cells were treated with inhibitors for 12 h and cell lysates were prepared followed by SDS-PAGE and immunoblot to assess total protein levels of (p-)Akt and (p-)Erk with GAPDH as loading control. The same GAPDH bands are shown in Figure 4D since they were part to the same experiment. The data shown are representative of two independent experiments.

Following treatment with the MKI, wound closure was observable only during the first 12 h. Thereafter, MEB-Med-8A lost their adhesive properties. This could be attributed to several effects. Profound morphological changes of the cytoskeleton as presented in Figures 2A and 3A was in part due to induction of MKI-mediated apoptosis with 20% and 30% apoptosis at 12 and 24 h, respectively (Figure 3D). Still, particularly upon Sorafenib treatment, there was a threefold increase of the fraction of viable floating cells ($n = 2$; data not shown). Additionally, the anti-proliferative activity of the MKI might have contributed to a delay in wound closure. In contrast to Daoy, in MEB-Med-8A cells, the lack of scratch wound closure was supposedly a cumulative effect of anti-migratory, anti-proliferative and pro-apoptotic mechanisms. We additionally examined the influence of the substances on the phosphorylation of the signalling elements AKT and Erk 1/2 after 12 h (MEB-Med-8A, Figure 3F) and 24 h (Daoy, Figure 2F) of drug exposure. AKT phosphorylation was completely abrogated by PI3K inhibition in both cell lines without a distinct influence on Erk1/2 phosphorylation (Figure 3F). The treatment with the MKI resulted in upregulation of phosphorylated Erk 1/2 in Daoy cells in contrast to a complete abrogation of Erk 1/2 phosphorylation in MEB-Med-8A cells.

3.5 | Levels of activated Rac1 were substantially reduced after treatment with Pictilisib, Pazopanib or Sorafenib

To examine the influence of the PI3K inhibitor and the MKI on the activity of Rac1, we performed a GTP-Rac1 pulldown assay using a fusion protein corresponding to the p-21 binding domain (PBD) of the p21-activated kinase (PAK1) bound to a magnetic bead. PAK1 is a downstream effector which binds with the PBD in the Cdc42/Rac Interactive Binding Region (CRIB), when Rac1 is in an active GTP-bound conformation. Activated Rac1 was reduced in both cell lines by treatment with either Pictilisib, Pazopanib or Sorafenib albeit to

differing degrees (Figure 4B,D). In principle, reduction of activated Rac1 could be the result of reduced Rac1 protein or impaired conversion into its activated form. In MEB-MED-8A, we observed a reduction of Rac1 protein levels accompanied by a suppression of Rac1 activity in Pictilisib- and Pazopanib-treated cells with a ratio of 0.62 and 0.45, respectively. Sorafenib treatment resulted in a profound reduction of Rac1 protein such that the ratio of activated to total Rac1 was 0.71 although as a net result activated Rac1 was markedly reduced to 25.5% in comparison with control. In Daoy, drug-induced decrease of Rac1 protein level largely paralleled reduction of activated Rac1.

In addition to reduction of activated Rac1, all three drugs caused a visible effect on cytoplasmic Rac1 distribution (Figure 4A,C). In Daoy, demarcation of the nucleus by annular Rac1 staining became less pronounced and Rac1 was more spread throughout the entire cell. In MKI-treated Daoy cells, change of cellular morphology to a more spindle-shaped phenotype was accompanied by redistribution of Rac1. In MEB-MED-8A cells, perinuclear Rac1 accumulations were maintained following Pictilisib treatment with overall rarefaction of Rac1 staining observed after MKI-application (Figure 4C) which is in keeping with the Western blot results (Figure 4B,D).

4 | DISCUSSION

Metastasis is the leading cause of death in children suffering from medulloblastoma and therefore a key target to further improve treatment strategies. The small Rho GTPase Rac1 has long been identified as a critical factor in migration, invasiveness, and metastasis in an array of cancers including medulloblastoma.^{9,20,34} Thus, Rac1 activation has been shown by genetic interference to drive medulloblastoma migration in vitro. Rac1 has been documented to be ubiquitously expressed among a wide range of tumour samples.²⁰ Moreover, its direct downstream effector Pak1 has been found to be overexpressed in an association with unfavourable outcome.⁹

Beyond its pro-migratory potential, Rac1 is a critical modulator of several other hallmarks of cancerogenesis such as tumour cell proliferation, anti-apoptotic mechanisms, drug resistance and angiogenesis.^{18,19} Upstream of Rac1, the PI3K/AKT pathway as well as PDGFR signalling, triggering the (RAF) RAS/MAPK/ERK cascade govern migration and proliferation in medulloblastoma.^{2,14} These pathways have been linked to EMT promotion, a process by which cancer cells gain mesenchymal features and enhanced migratory capacity.³⁵ Here, we document in two molecular types of medulloblastoma with high metastatic potential, activation of cytosolic Rac1, and pronounced phosphorylation of AKT and Erk1/2. Despite different subgroup affiliations and slightly different morphology, both exhibited mesenchymal features such as actin-rich protrusions and loose cell connections. In consort, morphology and migratory pattern are slightly different, with Daoy cells migrating in groups and MEB-Med-8A cells moving more individually in keeping with findings reported for organotypic cerebellum slice cultures.³⁶

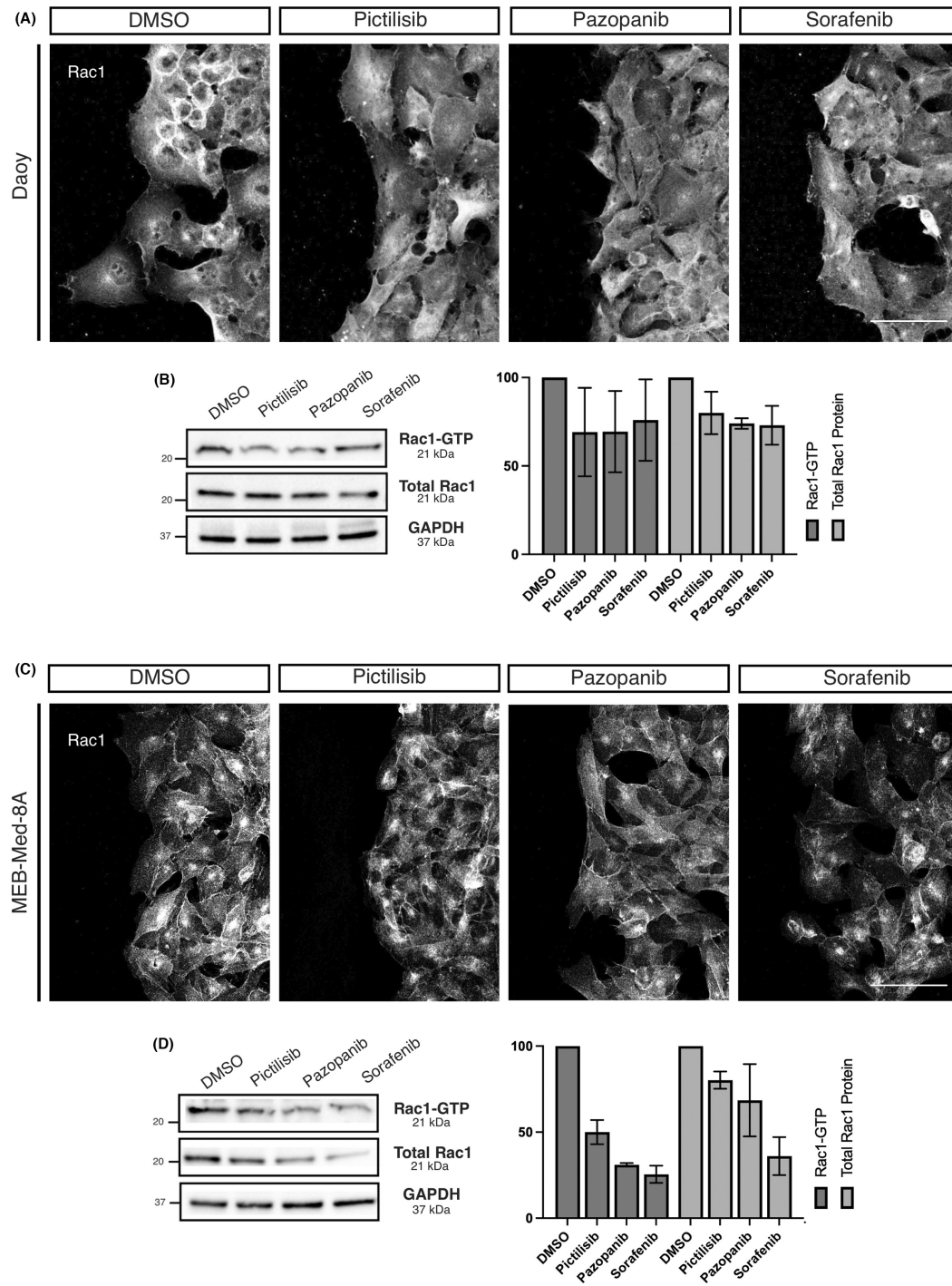
Rac1 is known to be a key regulator in the multifaceted process of cancer cell migration and invasion, but irrespective of its pertinent role, clinically validated selective Rac1 inhibitors are not available to date.^{19,22} We have previously shown that the MKI Pazopanib and Sorafenib, as well as the PI3K inhibitor Pictilisib, displayed promising anti-neoplastic activity in vitro as well as in orthotopic xenograft models of medulloblastoma.^{23,24} This alongside the clinical availability of the above-mentioned MKI and the PI3K inhibitor formed the rationale to explore their potential for suppression of Rac1-driven migration. Of note, activated Rac1 was reduced by PI3K inhibition as well as by the application of the MKI albeit to varying degrees. This is in line with our former observations that in both cell lines these MKI effectively suppress phosphorylated STAT3 which is recognized as a downstream effector of Rac1.²⁴ The MKI however did not affect AKT-phosphorylation despite downmodulation of GTP-bound Rac1 particularly in MEB-Med-8A indicating that modulation of diverse signalling events can still merge in Rac1 inactivation as a common downstream event.

We show here that the reduction of GTP-bound active form of Rac1 by the inhibition of PI3K is accompanied by impaired cellular migration in both cell lines associated with profound conformational cytoskeletal changes such as intensification of cellular connections

and formation of isolated cellular clusters in the absence of any anti-proliferative or pro-apoptotic activity starting during the first hours of drug exposure. Concomitant to downmodulation of activated Rac1 by PI3K inhibition a loss of mesenchymal features can be observed.³⁵ Consistent with their broad-spectrum target range, MKI application provokes a more general breakdown of the actin cytoskeleton and disassembly of actin-rich protrusions. The MKI are considerably less effective for impairing migration compared with direct PI3K-blockade in Daoy. In MEB-Med-8A, MKI attenuate Rac1 activity and induce cellular detachment with a proportion of cells entering apoptosis. In this context, it is of interest that loss of cellular anchorage is known to trigger cellular death, a process called anoikis. Cell death caused by detachment requires the activation of several signalling pathways as well as intact p53.³⁷ Daoy cells belong to a molecular type of medulloblastoma characterized by p53 mutations. This also fits with the reportedly central role of Erk1/2 in proliferation and migration, especially in SHH-activated medulloblastoma to which the Daoy cell line belongs.^{10,15,38} Therefore, aberrant up-regulation of Erk1/2 in Daoy cells in the presence of the MKI may serve as a cell survival signal which would explain the comparatively moderate anti-proliferative effect of the MKI in Daoy cells while in MEB-Med-8A MKI-mediated complete abrogation of Erk1/2 phosphorylation may also contribute to apoptosis.

Rac1 and Erk activity are interconnected in many cancer types and are reportedly subject to reciprocal regulation.^{21,32,39} Also, Erk phosphorylation may be modulated by the counter-balancing effects of Rac1 and RhoA activity levels in medulloblastoma.^{9,20} In addition to other influences, the PI3K pathway deserves consideration^{20,40,41} as Erk1/2 is situated in the midst of an intricately intertwined oncogenic signalling network. Paradoxical upregulation of Erk activation following a therapeutic interception of selected oncogenic pathways as observed here upon exposure to MKI is not uncommon and needs to be considered in targeted treatment design.⁴²⁻⁴⁵ Thus, with the MAPK (RAF-MEK-ERK) signalling cascade facilitating cell proliferation, survival and transformation in a myriad of cancers, it is of concern that Raf inhibitors such as Sorafenib can induce a paradoxical activation of the MAPK pathway resulting in increased Erk1/2 phosphorylation, which has been linked to adverse effects.⁴⁶ In a phase II study assessing the efficacy of Sorafenib in paediatric low-grade

FIGURE 4 Levels of activated GTP-bound Rac1 are reduced after PI3K blockage and inhibition of tyrosine kinases. (A and B). Confluently grown monolayers of Daoy or MEB-Med-8A cells were scratch wounded and treated with Pictilisib (GDC-0941), Pazopanib or Sorafenib. After 12 h (MEB-Med-8A) or 24 h (Daoy) cells were fixed and stained with a Rac1 antibody to assess relative subcellular distribution of Rac1 at the scratch border. Scratch areas were imaged by confocal laser scanning microscopy using a 40x water immersion objective. Z-stacks were performed to analyse Rac1 signals from top to bottom of the cells in 1024 × 1024 resolution using Galvano mode for the 488 laserline. Extended focus pictures were prepared using ImageJ software and show Rac1 distribution (grayscale) in the cells at the scratch border. Pictures presented are representative for two individual experiments. Scales indicate 50 µm. (B and D) Lysates of drug treated MEB-Med-8A (12 h) or Daoy (24 h) cells were prepared and a pulldown of GTP-bound Rac1 was performed with a PAK PBD-1 fusion protein followed by immunoblot analysis of Rac1. From the same lysates SDS-PAGE followed by immunoblot to Rac1 were prepared to analyse the level of total cytoplasmatic Rac1. Densitometry analysis was performed using ImageJ 1.53c software. Signals of GTP-bound Rac1 and total Rac1 levels were determined, and levels were compared with untreated control cells. Levels of total Rac1 were normalized to GAPDH as a loading control. The same GAPDH bands are shown in Figures 2F and 3F since the same blotted membranes were used in both experimental parts to determine expression levels of the respective proteins in relation to GAPDH of the same membrane. The data shown are representative of two independent experiments for the pulldown and four independent experiments for total cytoplasmatic Rac1 levels.



astrocytoma, paradox upregulation of Erk phosphorylation was even associated with progressive tumour growth in a significant number of patients resulting in premature termination of the study.⁴⁴ In medulloblastoma, following in vitro treatment with the MKI Dasatinib resulted in reduced mesenchymal migration via downregulation of ERK1/2 in the majority of cells; however, in a subset low-level Erk1/2 activity was preserved. These cells acquired amoeboid morphology while maintaining invasive capacities.¹⁵ Although our 2D model system does not lend itself to definitively ascertain such a shift between mesenchymal and amoeboid migratory phenotypes, it is of note that Rac1 has been attributed a central regulatory role for these different modes of migration.^{19,47}

Besides its activation status, the spatio-temporal localization of Rac1 determines its different cellular functions. At the leading edge, Rac1 drives cell migration through protrusion of lamellipodia while nuclear Rac1 influences are still subject to investigation and include modulation of the nuclear shape.^{21,33} Here, we demonstrate that Rac1 is present in the nuclear and cytoplasmic compartments in both medulloblastoma cell lines. Rac1 distribution is cell cycle dependent but can also be altered by phosphorylation through regulators including AKT and Erk1/2. This indicates that blockage of PI3K and tyrosine kinases potentially exerts a dual effect altering both Rac1 activity status as well as its localization.²¹ Rac1 phosphorylation at T108 is known to facilitate translocation of cytosolic Rac1 to the nucleus a process regulated by Erk activation.^{32,48}

Here, we show that PI3K inhibition as well as inhibition of tyrosine kinase driven signalling pathways in medulloblastoma cells decrease activated Rac1 particularly in MEB-Med-8A. In Daoy, redistribution of Rac1 is observed with dissipation of annular perinuclear Rac1 accumulation. In both untreated Daoy and MEB-Med-8A, we delineate for the first time localization of Rac1 in the nucleus. Aberrant localization of Rac1 to the nucleus has been reported to be involved in the organization of the nuclear membrane and results from an imbalance in nuclear Rac1 shuttling facilitated in part by the chaperone B23.^{49,50} Nuclear accumulation of Rac1 has been reported to influence nuclear shape and plasticity associated with higher invasion capacities.^{33,49} In MEB-Med-8A cells, deformed nuclei are particularly noticeable and present themselves kidney-shaped with a prominent perinuclear actin aggregate co-localizing with Rac1 in the nuclear indentation. Nuclear plasticity is a prerequisite for cancer cells to effectively navigate through the extracellular matrix.⁵¹

In this study, we illustrated the multifaceted role of Pictilisib, Pazopanib and Sorafenib as inhibitors of Rac1, as modulators of the cytoskeleton and migration in medulloblastoma. While significant progress has been made in designing Rac1 inhibitors for in vitro use, to date, there is no clinically approved inhibitor available.^{19,22} Our results show that these clinically available therapeutics can suppress Rac1 activation and decrease migratory capacity in medulloblastoma. Indeed PI3K-blockage is a potent means to induce a process resembling mesenchymal to epithelial transition (MET) and inhibit migration in medulloblastoma cells. Following inhibition of PI3K signalling, modulation of cytosolic Rac1 is associated with the

reorganization of actin fibres and loss of the mesenchymal phenotype particularly in Daoy associated with a reduction in vimentin (data not shown). Also, tyrosine kinase receptors including PDGFR are promising therapeutic targets as they are expressed in primary medulloblastoma as well as metastases.^{52,53} The morphological and molecular differences between the two high-risk medulloblastoma cell lines and the differential impact of the tested drugs are exemplary for the challenges in targeted therapy of the different molecular subgroups in this highly malignant disease. Moreover, the intricate crosstalk between the two oncogenic PI3K/AKT and MAPK/ERK signalling cascades upregulated concomitantly not just in medulloblastoma but in a wide variety of cancer, warrant combined targeted approaches. This is of particular importance in view of the potential for paradox upregulation of individual elements following selective inhibition of one pathway alone. Combination strategies also address the issue of resistance following prolonged exposure to single targeted drugs. In medulloblastoma, we have already delineated enhanced anti-neoplastic activity of PI3K inhibition with the MKI Axitinib and Vandetanib in vitro.^{54,55} Whilst clinical trials evaluating combinations of specific inhibitors of the downstream effectors Erk1/2 and AKT exhibited considerable toxicity limiting clinical efficacy, the combination of Sorafenib and Pazopanib with Everolimus for PI3K inhibition seem to exhibit improved tolerability.⁵⁶⁻⁵⁸ Also has combined treatment with fibroblast growth factor receptor and PI3K inhibitors shown to increase anti-proliferative capacities and enhance treatment sensitivity of medulloblastoma cells.⁵⁹ These observations and the findings outlined here prospectively render a combined application of PI3K and multi kinase inhibitors as a promising therapeutic option targeting Rac1 as a key downstream effector governed by both signalling pathways in medulloblastoma.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Leonie Franziska Schön: Conceptualization (equal); investigation (equal); visualization (lead); writing – original draft (lead); writing – review and editing (equal). **Rogério Bastos Craveiro:** Conceptualization (equal); investigation (equal); methodology (equal); supervision (lead); writing – original draft (supporting); writing – review and editing (equal). **Torsten Pietsch:** Resources (equal); writing – review and editing (equal). **Thomas Moritz:** Writing – review and editing (equal). **Anja Troeger:** Conceptualization (supporting); writing – review and editing (equal). **Silvia Jordans:** Validation (supporting); writing – review and editing (equal). **Dagmar Dilloo:** Conceptualization (lead); methodology (equal); writing – review and editing (equal).

ACKNOWLEDGMENT

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose. The authors declare that no funds, grants or other support were received during the preparation of this manuscript. The authors confirm that there are no conflicts of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Leonie F. Schoen  <https://orcid.org/0000-0002-7025-8037>

Silvia Jordans  <https://orcid.org/0000-0002-7578-8926>

REFERENCES

- Schwalbe EC, Lindsey JC, Nakjang S, et al. Novel molecular subgroups for clinical classification and outcome prediction in childhood medulloblastoma: a cohort study. *Lancet Oncol*. 2017;18:958-971.
- van Ommeren R, Garzia L, Holgado BL, Ramaswamy V, Taylor MD. The molecular biology of medulloblastoma metastasis. *Brain Pathol*. 2020;30:691-702.
- Louis DN, Perry A, Wesseling P, et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Neuro-Oncology*. 2021;23:1231-1251.
- Ramaswamy V, Remke M, Bouffet E, et al. Recurrence patterns across medulloblastoma subgroups: an integrated clinical and molecular analysis. *Lancet Oncol*. 2013;14:1200-1207.
- Zapotocky M, Mata-Mbamba D, Sumerauer D, et al. Differential patterns of metastatic dissemination across medulloblastoma subgroups. *J Neurosurg Pediatr*. 2017;1-8:145-152. doi:10.3171/2017.8.PEDS17264
- Fults DW, Taylor MD, Garzia L. Leptomeningeal dissemination: a sinister pattern of medulloblastoma growth. *J Neurosurg Pediatr*. 2019;1-9:613-621. doi:10.3171/2018.11.peds18506
- von Bueren AO, Kortmann RD, von Hoff K, et al. Treatment of children and adolescents with metastatic medulloblastoma and prognostic relevance of clinical and biologic parameters. *J Clin Oncol*. 2016;34:4151-4160.
- Gilbertson RJ, Clifford SC. PDGFRB is overexpressed in metastatic medulloblastoma. *Nat Genet*. 2003;35:197-198.
- Yuan L, Santi M, Rushing EJ, Cornelison R, MacDonald TJ. ERK activation of p21 activated kinase-1 (Pak1) is critical for medulloblastoma cell migration. *Clin Exp Metastasis*. 2010;27:481-491.
- Abouantoun TJ, Castellino RC, MacDonald TJ. Sunitinib induces PTEN expression and inhibits PDGFR signaling and migration of medulloblastoma cells. *J Neuro-Oncol*. 2011;101:215-226.
- MacDonald TJ, Aguilera D, Castellino RC. The rationale for targeted therapies in medulloblastoma. *Neuro-Oncology*. 2014;16:9-20.
- Hartmann W, Digon-Söntgerath B, Koch A, et al. Phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT signaling is activated in medulloblastoma cell proliferation and is associated with reduced expression of PTEN. *Clin Cancer Res*. 2006;12:3019-3027.
- Guerreiro AS, Fattet S, Fischer B, et al. Targeting the PI3K p110A isoform inhibits medulloblastoma proliferation, chemoresistance, and migration. *Clin Cancer Res*. 2008;14:6761-6769.
- Crespo S, Kind M, Arcaro A. The role of the PI3K/AKT/mTOR pathway in brain tumor metastasis. *J Cancer Metastasis Treat*. 2016;2:80.
- Schönholzer MT, Migliavacca J, Alvarez E, et al. Real-time sensing of MAPK signaling in medulloblastoma cells reveals cellular evasion mechanism counteracting dasatinib blockade of ERK activation during invasion. *Neoplasia (United States)*. 2020;22:470-483.
- Hodge RG, Ridley AJ. Regulating rho GTPases and their regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17:496-510.
- Svensmark JH, Brakebusch C. Rho GTPases in cancer: friend or foe? *Oncogene*. 2019;38:7447-7456. doi:10.1038/s41388-019-0963-7
- Kazanietz MG, Caloca MJ. The Rac GTPase in cancer: from old concepts to new paradigms. *Cancer Res*. 2017;77:5445-5451. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-1456
- De P, Rozeboom BJ, Aske JC, Dey N. Active rac1 promotes tumorigenic phenotypes and therapy resistance in solid tumors. *Cancer*. 2020;12:1-16. doi:10.3390/cancers12061541
- Zavarella S, Nakada M, Belverud S, et al. Role of Rac1-regulated signaling in medulloblastoma invasion. Laboratory investigation. *J Neurosurg Pediatr*. 2009;4:97-104.
- De P, Aske JC, Dey N. RAC1 takes the Lead in solid tumors. *Cell*. 2019;8:382.
- Grimes MM, Kenney SR, Dominguez DR, et al. The R-enantiomer of ketorolac reduces ovarian cancer tumor burden in vivo. *BMC Cancer*. 2021;21:1-16.
- Ehrhardt M, Craveiro RB, Holst MI, Pietsch T, Dilloo D. The PI3K inhibitor GDC-0941 displays promising in vitro and in vivo efficacy for targeted medulloblastoma therapy. *Oncotarget*. 2015;6:802-813.
- Craveiro RB, Ehrhardt M, Holst MI, Pietsch T, Dilloo D. In comparative analysis of multi-kinase inhibitors for targeted medulloblastoma therapy pazopanib exhibits promising in vitro and in vivo efficacy. *Oncotarget*. 2014;5:7149-7161.
- Sarker D, Ang JE, Baird R, et al. First-in-human phase I study of pictilisib (GDC-0941), a potent pan-class I phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2015;21:77-86.
- le Cesne A, Bauer S, Demetri GD, et al. Safety and efficacy of pazopanib in advanced soft tissue sarcoma: PALETTE (EORTC 62072) subgroup analyses. *BMC Cancer*. 2019;19:794.
- Schmidinger M, Bamias A, Procopio G, et al. Prospective observational study of pazopanib in patients with advanced renal cell carcinoma (PRINCIPAL Study). *Oncologist*. 2019;24(4):491-497. doi:10.1634/theoncologist.2018-0787
- Zhou L, Picard D, Ra YS, et al. Silencing of Thrombospondin-1 is critical for Myc-induced metastatic phenotypes in medulloblastoma. *Cancer Res*. 2010;70:8199-8210.
- Ivanov DP, Coyle B, Walker DA, Grabowska AM. In vitro models of medulloblastoma: choosing the right tool for the job. *J Biotechnol*. 2016;236:10-25. doi:10.1016/j.jbiotec.2016.07.028
- Abouantoun TJ, MacDonald TJ. Imatinib blocks migration and invasion of medulloblastoma cells by concurrently inhibiting activation of platelet-derived growth factor receptor and transactivation of epidermal growth factor receptor. *Mol Cancer Ther*. 2009;8:1137-1147.
- Liang C-C, Park AY, Guan J-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*. 2007;2(2):329-333.
- Tong J, Li L, Ballermann B, Wang Z. Phosphorylation of Rac1 T108 by extracellular signal-regulated kinase in response to epidermal growth factor: a novel mechanism to regulate Rac1 function. *Mol Cell Biol*. 2013;33:4538-4551.
- Payapilly A, Malliri A. Compartmentalisation of RAC1 signalling. *Curr Opin Cell Biol*. 2018;54:50-56. doi:10.1016/j.ceb.2018.04.009
- Chen B, Gao Y, Jiang T, et al. Inhibition of tumor cell migration and invasion through knockdown of Rac1 expression in medulloblastoma cells. *Cell Mol Neurobiol*. 2011;31:251-257.
- Brabletz T, Kalluri R, Nieto MA, Weinberg RA. EMT in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2018;18:128-134. doi:10.1038/nrc.2017.118
- Neve A, Kumar KS, Tripolitioti D, Grotzer MA, Baumgartner M. Investigation of brain tissue infiltration by medulloblastoma cells in an ex vivo model. *Sci Rep*. 2017;7:1-12.
- Zugasti O, Rul W, Roux P, et al. Raf-MEK-Erk Cascade in Anoikis is controlled by Rac1 and Cdc42 via Akt. *Mol Cell Biol*. 2001;21:6706-6717.
- Park AK, Lee JY, Cheong H, et al. Subgroup-specific prognostic signaling and metabolic pathways in pediatric medulloblastoma. *BMC Cancer*. 2019;19:571.
- Vial E, Sahai E, Marshall CJ. ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility. *Cancer Cell*. 2003;4:67-79.

40. Campa CC, Ciraolo E, Ghigo A, Germea G, Hirsch E. Crossroads of PI3K and Rac pathways. *Small GTPases*. 2015;6:71-80.
41. Parri M, Chiarugi P. Rac and rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Commun Signal*. 2010;8:23.
42. Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, et al. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature*. 2010;464:431-435.
43. Poulidakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature*. 2010;464:427-430.
44. Karajannis MA, Legault G, Fisher MJ, et al. Phase II study of sorafenib in children with recurrent or progressive low-grade astrocytomas. *Neuro-Oncology*. 2014;16:1408-1416.
45. Yokoyama N, Matsunobu T, Matsumoto Y, et al. Activation of ERK1/2 causes pazopanib resistance via downregulation of DUSP6 in synovial sarcoma cells. *Sci Rep*. 2017;7:1-12.
46. Liu F, Yang X, Geng M, Huang M. Targeting ERK, an Achilles' heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2018;8:552-562. doi:10.1016/j.apsb.2018.01.008
47. Wu JS, Jiang J, Chen BJ, Wang K, Tang YL, Liang XH. Plasticity of cancer cell invasion: patterns and mechanisms. *Transl Oncol*. 2021;14:100899.
48. Tong J, Li L, Ballermann B, Wang Z. Phosphorylation and activation of RhoA by ERK in response to epidermal growth factor stimulation. *PLoS One*. 2016;11:1-26.
49. Navarro-Lérida I, Pellinen T, Sanchez SA, et al. Rac1 nucleocytoplasmic shuttling drives nuclear shape changes and tumor invasion. *Dev Cell*. 2015;32:318-334.
50. Disanza A, Scita G. Nuclear and cellular plasticity: nuclear RAC1 takes center stage. *Dev Cell*. 2015;32:261-263. doi:10.1016/j.devcel.2015.01.015
51. Wolf K, te Lindert M, Krause M, et al. Physical limits of cell migration: control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force. *J Cell Biol*. 2013;201:1069-1084.
52. Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol*. 2012;123:465-472.
53. Morrissy AS, Garzia L, Shih DJH, et al. Divergent clonal selection dominates medulloblastoma at recurrence. *Nature*. 2016;529:351-357.
54. Craveiro RB, Ehrhardt M, Velz J, et al. The anti-neoplastic activity of Vandetanib against high-risk medulloblastoma variants is profoundly enhanced by additional PI3K inhibition. *Oncotarget*. 2017;8:46915-46927. doi:10.18632/oncotarget.14911
55. Ehrhardt M, Craveiro RB, Velz J, et al. The FDA approved PI3K inhibitor GDC-0941 enhances in vitro the anti-neoplastic efficacy of Axitinib against c-myc-amplified high-risk medulloblastoma. *J Cell Mol Med*. 2018;22:2153-2161.
56. Bellmunt J, Lalani AKA, Jacobus S, et al. Everolimus and pazopanib (E/P) benefit genomically selected patients with metastatic urothelial carcinoma. *Br J Cancer*. 2018;119:707-712.
57. Cao Z, Liao Q, Su M, Huang K, Jin J, Cao D. AKT and ERK dual inhibitors: the way forward? *Cancer Lett*. 2019;459:30-40. doi:10.1016/j.canlet.2019.05.025
58. Nogova L, Mattonet C, Scheffler M, et al. Sorafenib and everolimus in patients with advanced solid tumors and KRAS-mutated NSCLC: a phase I trial with early pharmacodynamic FDG-PET assessment. *Cancer Med*. 2020;9:4991-5007.
59. Holzhauser S, Lukoseviciute M, Andonova T, et al. Targeting fibroblast growth factor receptor (FGFR) and phosphoinositide 3-kinase (PI3K) signaling pathways in medulloblastoma cell lines. *Anticancer Res*. 2020;40:53-66.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Schoen LF, Craveiro RB, Pietsch T, et al. The PI3K inhibitor pictilisib and the multikinase inhibitors pazopanib and sorafenib have an impact on Rac1 level and migration of medulloblastoma in vitro. *J Cell Mol Med*. 2022;26:5832-5845. doi: [10.1111/jcmm.17604](https://doi.org/10.1111/jcmm.17604)

3. Danksagung

Die vorliegende Arbeit ist das Resultat einer arbeitsreichen Zeit und wäre ohne die Unterstützung vieler nicht möglich gewesen.

Ich danke Prof. Dr. med. Dagmar Dilloo für die Möglichkeit mich mit dem spannenden Thema zu befassen und ebenso so sehr für die intensive und bereichernde Zusammenarbeit.

Ich danke außerdem Dr. rer. nat. Rogerio Craveiro für die Einarbeitung und Begleitung der ersten Experimente, sowie Dr. rer. nat. Silvia Jordans für ihre tatkräftige Unterstützung im weiteren Verlauf und der Schlussphase dieser Arbeit. Ebenso bedanke ich mich bei dem gesamten Laborteam und allen, die an der Erstellung der Veröffentlichung mitgewirkt haben.

Ohne die Unterstützung meiner Eltern und insbesondere meines Mannes Lukas Hermann wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.