

**GDC-0941, a clinically available PI3K inhibitor
displays promising *in vitro* and *in vivo* efficacy for
targeted medulloblastoma therapy**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Dr. Michael Ehrhardt

aus Bonn

2022

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: 15.12.2021

Aus der Klinik für Kinderheilkunde

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Johannes Breuer

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	4
1.	Deutsche Zusammenfassung	5
1.	Einleitung	5
2.	Material und Methoden	8
3.	Ergebnisse	9
4.	Diskussion	10
5.	Synopsis	13
6.	Entwicklungen im Bereich der Medulloblastomforschung und Therapie seit Durchführung der Dissertationsarbeit im Jahr 2014	14
7.	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	20
8.	Projektzuständigkeiten	33
2.	Veröffentlichung	34
	Abstract	34
	Introduction	34
	Results	35
	Discussion	38
	Materials and Methods	41
	References	44
	Supplementary Figures	45
3.	Danksagung	47
4.	Publikationsliste	48

Abkürzungsverzeichnis

5-JÜR	5-Jahresüberlebensrate
aCGH	Array-based Comparative Genomic Hybridization
AKT	Proteinkinase B
al	Altera
CD	Cluster of differentiaton
EGFR	Epithelial growth factor receptor
MYC	Myelocytomatosis
NCT	National clinical trial
PDGFR	Platelet-derived-growth-factor
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
SHH	Sonic Hedgehog
STAT	Signal transducer and activator of transcription
Wnt	Wingless

1. Deutsche Zusammenfassung

1. Einleitung

Medulloblastome sind mit einem Anteil von 20 % der häufigste maligne Gehirntumor im pädiatrischen Patientenkollektiv. Die WHO Klassifikation von 2007 unterscheidet fünf histologische Varianten: klassische Medulloblastome, desmoplastisch/noduläre Medulloblastome, Medulloblastome mit starker Nodularität, Grosszellige Medulloblastome und anaplastische Medulloblastome (Louis et al., 2007). Darauf aufbauend zeigten Transkriptionsanalysen aus dem Jahr 2012, dass es auf molekularer Ebene vier Medulloblastomuntergruppen – Sonic Hedgehog (SHH), Wingless (Wnt), Gruppe 3 und Gruppe 4 – gibt, die sich hinsichtlich Demographie, Histologie, Phänotyp, somatischer Mutationen und klinischer Überlebensraten unterscheiden (Kool et al., 2012; Northcott et al., 2011).

Der SHH-Signalweg ist an der normalen Kleinhirnentwicklung beteiligt (Dey et al., 2012). Eine aberrante SHH-Signalgebung kann in 25-30 % der Medulloblastome nachgewiesen werden (Kool et al., 2012). Erste Hinweise auf eine Einbindung des SHH-Signalwegs in die Medulloblastompathogenese lieferten Beobachtungen von Patienten, die am Gorlin-Syndrom leiden. Diese zeigen neben Basalzellkarzinomen auch eine Prädisposition für Medulloblastome. Genetische Analysen der Patienten dokumentierten eine Häufung von Mutationen des SHH-Rezeptors patched (Ptch) und der Mediatoren smooth (SMO) und suppressor of fused homolog (SUFU), die zu einer Hyperaktivierung des Signalwegs führen (Cowan et al., 1997; Evans et al., 1991; Hahn et al., 1996). Diese Beobachtungen werden durch verschiedene Mausmodelle, in denen die oben beschriebenen Signalwegkomponenten manipuliert wurden, unterstützt (Goodrich et al., 1997; Hallahan et al., 2004; Hatton et al., 2008; Lee et al., 2007). Hinsichtlich der Überlebensraten zeigen SHH-Tumoren eine gute Prognose, mit Ausnahme der Tumoren (10 %), die zusätzlich eine Mutation des Tumorsuppressorgens p53 erwerben. Im Vergleich zu nicht p53-mutierten Tumoren (5-JÜR 80 %) zeigen diese Patienten eine um die Hälfte (5-JÜR 40 %) verringerte 5-Jahres-Überlebensrate (Zhukova et al., 2013). Darüber hinaus dokumentiert Northcott et al., dass SHH-Tumoren häufig zusätzlich zur deregulierten

Aktivität des SHH-Signalweges eine Amplifikation der Rezeptortyrosinkinasen Platelet-derived-growth-factor (PDGFR) alpha, Insulin-growth-factor-1 (IGF1R) und c-Kit, sowie des Rezeptortyrosinkinase Downstream-Mediators Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und einen Verlust des PI3K-negativ-Regulators Phosphatase and Tensin homolog (PTEN) aufweisen, welche die Tumorentstehung zu begünstigen scheinen (Northcott et al., 2012).

Die Wnt-Untergruppe enthält 10-15 % der Medulloblastome und zeigt mit Überlebensraten von 90 % die beste Prognose (Ellison et al., 2011; Kool et al., 2012). Frühe „aCGH“- und Mutationsstudien zeigten für diese Gruppe eine Anreicherung von Mutationen in -Genen des Wnt-Signalweges wie Beta-catenin, Adenomatous-polyposis-coli (APC) und Axis inhibition 1/2 (Axin1/2) (Cho et al., 2011; Kool et al., 2008; Robinson et al., 2012; Thompson et al., 2006). Eine deregulierte Signalgebung des WNT-Signalweges führt zu einem erhöhtem Gehalt des Transkriptionsfaktors Beta-Catenin im Nukleus und einer damit einhergehenden Aktivierung von Beta-Catenin-Zielgenen, welche zelluläre Programme wie Zellteilung, Zell-Zell Kontakte und den Abbau der extrazellulären Matrix beeinflussen (MacDonald et al., 2009).

Gruppe 3 und Gruppe 4 Tumore wurden ursprünglich als Nicht-Wnt- und Nicht-SHH-Tumore bezeichnet und machen zusammen 60 % der Medulloblastome aus (Taylor et al., 2012a). Sie zeichnen sich durch eine deregulierte Methylierung als möglichen Driver der Tumorentstehung aus (Jones et al., 2012; Robinson et al., 2012). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in diesen Medulloblastomvarianten ein vermehrtes Vorkommen von Photorezeptorgenen eine Rolle bei der Tumorentstehung spielt und sie hohe Level der Medulloblastomkogene Orthodenticle homeobox 2 (OXT2) und forkhead box G1B (FOXG1B) exprimieren (Cho et al., 2011; Kool et al., 2008; Northcott et al., 2011). Im Gegensatz zu Gruppe 4 Tumoren zeigen Gruppe 3 Tumore eine erhöhte Transkriptionssignatur von Genen, die im Zellzyklus, in der Bioproteinsynthese und bei der Glutamatrezeptor-, p38-Mitogen-Aktivierten-Protein-Kinase sowie PI3K/AKT-Signaltransduktion von Bedeutung sind. Gruppe 4 Tumoren hingegen zeigen eine Überrepräsentation von Genen, die an der Zytoskelettorganisation sowie neuronalen Differenzierung und Entwicklung beteiligt sind (Kool et al., 2008; Northcott et al., 2011). Weiterhin ist die häufigste dokumentierte strukturelle Chromosomenanomalie für Gruppe

3 und 4 Tumoren das Vorliegen eines Isochromosoms 17q (Jones et al., 2012; Kool et al., 2008; Northcott et al., 2011).

Ein Hauptunterschied zwischen Gruppe 3 und 4 Tumoren liegt in der Amplifikation oder Überexpression des Protoonkogenes Myelocytomatosis (MYC). Während Gruppe 3 Tumoren zu 15 % positiv für eine MYC Überrepräsentation getestet wurden, ist diese Anomalie selten in Gruppe 4 Tumoren zu finden (Jones et al., 2012; Northcott et al., 2011; Robinson et al., 2012). Patienten, die an Gruppe 3 Medulloblastomen ohne MYC-Amplifikation oder Überexpression (5-JÜR 75 %) und Gruppe 4 (5-JÜR 75 %) Tumoren leiden haben eine intermediäre Prognose ähnlich der von SHH-Medulloblastomen ohne p53-Mutation. Im Gegensatz dazu zeigen Patienten, welche an Gruppe 3 Tumoren mit MYC-Amplifikation oder Überexpression erkranken die schlechteste Prognose mit 5-Jahres-Überlebensraten von nur 20 % (Cho et al., 2011; Zhukova et al., 2013).

Die heutige Behandlung des Medulloblastoms basiert auf dem Alter und der Risikoeinschätzung des Patienten. Als Hochrisikogruppe gelten Patienten, die älter oder gleich drei Jahre sind und *post operationem* eine Resttumormasse grösser/gleich 1,5 cm² haben. Darüber hinaus gelten alle Patienten, die jünger als drei Jahre sind als Hochrisikopatienten. Im Vergleich zu Standardrisikopatienten bekommen Hochrisikopatienten höhere Dosen einer multimodalen Chemotherapie, die, insofern der Patient älter oder gleich drei Jahre ist, durch eine kraniospinale Strahlentherapie ergänzt wird (Maddrey et al., 2005; Pizer und Clifford, 2009; Taylor et al., 2005; von Hoff et al., 2009; Wilne et al., 2012; Yuh et al., 2004). Neuste Studien, die die Erkenntnisse der molekularen Analyse von Medulloblastomen einschliessen, postulieren vor allem für Nicht-Wnt und Nicht-SHH-Tumore mit MYC-Überexpression und SHH-p53-mutierte Tumore eine Erweiterung des Therapieschemas, um die schlechte Prognose dieser Patienten zu verbessern (Northcott et al., 2011; Zhukova et al., 2013) (DeSouza et al., 2014). Daher ist die Identifikation von neuen zielgerichteten Therapien dieser höchst aggressiven Untergruppen ein zentraler Fokus der Medulloblastomforschung.

Die Hyperaktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs als Driver von Proliferation, Migration und Tumorangiogenese konnte für verschiedene Tumorentitäten authentifiziert werden (Fruman und Rommel, 2014). Im Hinblick auf das Medulloblastom konnte in diesem Zusammenhang dokumentiert werden, dass eine Deregulation des PI3K/AKT-

Signalweges zu einem verstärkten Tumorwachstum, Metastasierung und Therapieresistenz führt (Baryawno et al., 2010; Guerreiro et al., 2008; Hartmann et al., 2006) und Primärtumoren neben einer erhöhten AKT-Phosphorylierung häufig eine Downregulation des PI3K/AKT-Signalweg-negativ-Regulators PTEN durch Promotor-Hypermethylierung oder Allelverlust zeigen (Hartmann et al., 2006). Im Bezug auf eine zielgerichtete Therapie des Medulloblastoms ist der PI3K/AKT-Signalweg von besonderer Bedeutung, da er als Integrationspunkt für Signale von verschiedenen onkogenen Rezeptortyrosinekinasen, deren Hyperaktivierung bei Medulloblastomen festgestellt wurde, fungiert. Von Bedeutung ist in diesem Kontext, dass vor allem die Hyperaktivierung von PDGFR alpha und des Epithelial growth factor receptors (EGFR) mit einer schlechten Überlebensrate von Medulloblastompatienten korrelieren (Blom et al., 2010; Bodey et al., 2005; Liu et al., 2014). Frühere *in vitro* Studien mit PI3K-Inhibitoren wie LY294002 und PIK-75 zeigten anti-neoplastische Aktivität dieser gegen verschiedene Medulloblastomzelllinien. Jedoch demonstrierten die verwendeten PI3K-Inhibitoren der ersten Generation neben einer hohen *in vivo* Toxizität eine breite off-target Aktivität und waren daher nicht zulässig für die Applikation in der Klinik (Bain et al., 2007; Gharbi et al., 2007; Ihle und Powis, 2010; Torbett et al., 2008; Zheng et al., 2011). In der vorliegenden Studie wurde *in vitro* und *in vivo* evaluiert, in wie weit sich der spezifische für die klinische Applikation zugelassene PI3K-Inhibitor GDC-0941 zur Therapie von Nicht-Wnt und Nicht-SHH-Tumoren mit MYC-Amplifikation oder Überexpression und SHH Tumoren mit p53 Mutation eignet (Folkes et al., 2008; Sarker et al., 2015).

1.2 Material und Methoden

Die *in vitro* Evaluation des Kinaseinhibitors GDC-0941 für die zielgerichtete Therapie von Nicht-WNT und Nicht-SHH-Tumoren mit MYC-Amplifikation oder Überexpression und SHH-p53 mutierte Tumoren wurde mittels Zelllinien, die die jeweilige Gruppe modellieren, durchgeführt. Während die Zelllinie Daoy aus einem SHH-Primärtumor mit p53-Mutation gewonnen wurde, zeigen die Zelllinien MEB-Med-8A, D283 Med und D341 Med charakteristische Merkmale wie MYC-Amplifikation oder Überexpression und Vorliegen eines Isochromosom 17q der Nicht-WNT und Nicht-SHH-Tumoren mit schlechter Prognose. Die anti-neoplastische *in vitro* Wirkung des Inhibitors wurde mittels einer Kombination von molekularen Untersuchungsmethoden wie MTS-Assay, kombiniertem

Proliferations- und Apoptose-Assay, Kolonieformations-Assay, Zellmigrations-Assay, Zellzyklus-Assay und Westernblot untersucht. Zur Untersuchung der *in vivo* Aktivität wurde ein orthotopes xenograft Mausmodell für MYC-amplifizierte Tumoren etabliert. Zu diesem Zweck wurden Luziferase-exprimierende MEB-Med-8A-Zellen in das rechte Kleinhirn 1 mm rechts der Mittellinie, 1 mm posterior der coronaren Sutur 3 mm tief injiziert. Nach der Transplantation wurde das Tumorwachstum mittels Biolumineszenzmessung evaluiert.

1.3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit zeigen wir mittels MTS- und Kolonieformations-Assay, dass der klinisch verfügbare PI3K-Inhibitor GDC-0941 die Zellüberlebensrate von Nicht-SHH- und Nicht-WNT-Medulloblastomen mit MYC-Amplifikation oder Überexpression und SHH-Gruppe-Medulloblastomen mit p53-Mutation *in vitro* signifikant verringert. Weiterhin dokumentieren wir, dass die beobachtete anti-neoplastische Wirkung auf eine zytotoxische, sowie eine anti-proliferative Komponente zurückzuführen ist. Hinsichtlich der anti-proliferativen Komponente weisen wir eine Akkumulation von Zellen in der G0/G1-Phase nach. Darüber hinaus zeigen wir, dass GDC-0941 auch CD133-Stammzellmarker-tragende Zellpopulationen angreift und dokumentieren, dass GDC-0941 mit dem in der Medulloblastomtherapie standardmäßig eingesetzten Chemotherapeutikum Etoposide synergistisch wirkt. Über die zytotoxische und anti-proliferative Wirkung hinaus stellt unsere Arbeit dar, dass GDC-0941 auch die Migrationfähigkeit beider Medulloblastomvarianten zu vermindern mag. Korrespondierend zu den beobachteten anti-neoplastischen Effekten, konnten wir in den untersuchten Zelllinien eine Reduktion der Aktivität des PI3K/AKT-Signalweges detektieren. In der sensitivsten Zelllinie wurde darüber hinaus eine Reduktion der Aktivität des Medulloblastomonkoproteins signal transducer and activator of transcription (STAT) nach GDC-0941-Exposition dokumentiert. Im Bezug auf *in vivo* Effektivität des PI3K-Inhibitors konnten wir zeigen, dass die Applikation von GDC-0941 in einem orthotopen xenograft Mausmodell für Tumoren der Nicht-SHH- und Nicht-WNT-Gruppe mit MYC-Überexpression zu einer Reduktion des Tumorwachstums führt und das Überleben der Tumor-tragenden Mäuse signifikant verlängert.

1.4 Diskussion

Am Medulloblastom, dem häufigsten malignen pädiatrischen Gehirntumor, versterben trotz verbesserter Therapieansätze insgesamt ein Drittel der Patienten (Louis et al., 2007). Molekulare Analysen zeigten, dass sich Medulloblastome in vier Untergruppen gliedern (Northcott et al., 2011). Hinsichtlich der 5-Jahres-Überlebensrate zeigten sich erhebliche Differenzen zwischen diesen Untergruppen (Northcott et al., 2012). Für die Niedrigrisikogruppen WNT, SHH ohne p53 Mutation und Nicht-WNT/Nicht-SHH ohne MYC-Amplifikation oder Überexpression wurde eine Überlebensrate von 70-90 % dokumentiert. Im Gegensatz dazu zeigen Patienten der Hochrisikogruppe, die an SHH-Tumoren mit p53-Mutation oder MYC-überexprimierenden Nicht-WNT/Nicht-SHH-Tumoren leiden eine 5-Jahres-Überlebensrate von nur 20-40 % (Cho et al., 2011; Kool et al., 2012; Northcott et al., 2011; Northcott et al., 2012; Zhukova et al., 2013). Daher liegt ein Fokus der heutigen Medulloblastomforschung auf der Entwicklung neuer Therapieansätze zur Behandlung dieser hochaggressiven, der Standardtherapie schlecht zugänglichen, Medulloblastomvarianten.

Kinaseinhibitoren, wie Imatinib, welche zur Tumorentstehung essentielle Signalwege antagonisieren, wurden während der letzten Dekade erfolgreich in das Standardtherapieschema vieler adulter Tumorentitäten integriert (Iqbal, 2014). Vor diesem Hintergrund dokumentieren wir hier, dass der klinisch verfügbare PI3K/AKT-Signalweginhibitor GDC-0941 *in vitro* und *in vivo* anti-neoplastische Aktivität gegen die oben genannten aggressiven Medulloblastomsubtypen zeigt.

In einer detaillierten *in vitro* Studie an einer aus einem SHH-Tumor mit p53-Mutation erzeugten Zelllinie, Daoy, und den Zelllinien, MEB-Med-8A, D283 Med und D341 Med, die von Nicht-WNT/Nicht-SHH-Tumoren mit MYC-Überexpression abstammen, konnten wir zeigen, dass GDC-0941 bei Patientenplasma äquivalenten Konzentrationen die Zellviabilität signifikant einschränkt (Craveiro et al., 2014). In diesem Zusammenhang dokumentieren unsere Experimente, dass die Reduktion in Zellviabilität auf eine dominante zytotoxische Kapazität, welche durch eine geringere anti-proliferative Komponente komplettiert wird, zurückzuführen ist. Diese Beobachtungen konnten durch Kolonieformations-Assays bestätigt werden. Weiterhin sensitivierte GDC-0941 die untersuchten Medulloblastomzelllinien gegenüber dem in der Medulloblastomtherapie

standardmässig eingesetzten Chemotherapeutikum Etoposide, sodass wir für die beiden Medikamente einen synergistischen Effekt hinsichtlich ihrer anti-karzinogenen Wirkung nachweisen konnten (Mallick et al., 2015). Darüber hinaus schränkte GDC-0941 die Migrationsfähigkeit von Medulloblastomzellen beider Untergruppen signifikant ein und führte zu einer Reduktion von CD133-positiven Medulloblastomstammzellen in der Zelllinie Daoy. Zusammenfassend dokumentieren unsere *in vitro* Ergebnisse erstmals die anti-neoplastische Wirkung eines PI3K-Inhibitors gegen hochaggressive MYC-überexprimierende Medulloblastome und unterstützen Studien, die eine anti-neoplastische Wirkung durch Antagonisierung des PI3K/AKT-Signalwegs für SHH-Tumoren mit p53-Mutation in murinen allograft Medulloblastommodellen propagieren (Briggs et al., 2008; Metcalfe et al., 2013). Daher hypothetisieren wir, dass der Verlust von PTEN und/oder eine Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs als potentielle Tumormarker für die Einbindung von GDC-0941 in die Standardtherapie von pädiatrischen Patienten fungieren könnte.

Um die inhibitorische Effektivität des Inhibitors GDC-0941 auf die Signaltransduktion des PI3K/AKT-Signalweges zu evaluieren, wurde der Phosphorylierungsstatus von AKT, der direkten PI3K-downstream-Komponente des Signalweges, evaluiert (Ihle und Powis, 2010). Im Einvernehmen mit vorangegangenen Studien, welche hohe AKT-Aktivität in primären Medulloblastomen dokumentierten, konnten wir zeigen, dass alle untersuchten Zelllinien an den aktivitätsregulierenden Aminosäuren Threonin 308 und Serin 473 Phosphorylierungen des AKT-Proteins vorweisen (Baryawno et al., 2010; Guerreiro et al., 2008; Hartmann et al., 2006). In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass die Phosphorylierung dieser beiden Aminosäuren mit dem onkogenen Potential des AKT-Proteins korreliert (Graupera und Potente, 2013; Hart und Vogt, 2011). Da die vorher beschriebenen anti-neoplastischen Effekte des Inhibitors GDC-0941 mit einer Reduktion der PI3K/AKT-Signalweg-Aktivität assoziiert sind, unterstützen unsere Ergebnisse das Konzept, dass der PI3K/AKT-Signalweg downstream von verschiedenen Rezeptortyrosinekinasen eine Schlüsselrolle bei der Medulloblastomentwicklung und Progression spielt und essentielle Programme wie Proliferation, Überleben und Migration beeinflusst. Eine prolongierte Exposition der Zellen gegenüber dem Inhibitor GDC-0941 zeigte weiterhin, dass es neben posttranslationalen Modifikationen wie Reduktion der AKT-Phosphorylierung, auch zur Reduktion des AKT-Proteins selbst kommt. Diese

Beobachtung konnte für die GDC-0941 hochsensitiven Zelllinien Daoy, MEB-Med-8A und D283 Med gemacht werden, korreliert mit der Funktion von AKT als ein Hauptregulator für Proteinexpression via des mTOR-Signalkomplexes und ist möglicherweise eine Erklärung für die höhere Sensitivität dieser Zelllinien im Gegensatz zu D341 Med (Hay und Sonenberg, 2004; Manning und Cantley, 2007).

In verschiedenen Krebsentitäten einschließlich des Medulloblastoms konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor STAT3 downstream von Rezeptortyrosinkinasen an der Regulierung von zellulären Programmen wie Proliferation, Apoptose und tumorinduzierter Angiogenese involviert ist (Cattaneo et al., 1998; Jackson et al., 2012; Yang et al., 2008; Yu et al., 2009). Im Einvernehmen mit diesen Beobachtungen konnten wir eine starke Expression und Phosphorylierung des STAT3-Proteins in den untersuchten Zelllinien feststellen. In kürzlich durchgeführten Proteomanalysen konnte eine Interaktion zwischen PI3K- und STAT3-Signalweg verifiziert werden, welche STAT3 eine Schlüsselrolle in der PI3K-induzierten onkologischen Transformation zuschreibt (Vogt und Hart, 2011). Da es in der sensitivsten Zelllinie MEB-Med-8A durch PI3K-Inhibition neben einer Einschränkung der PI3K/AKT Aktivität auch zu einer Einschränkung der STAT3-Aktivität kam, legen unsere Ergebnisse nahe, dass zumindest in einem Teil von Medulloblastomen die oben beschriebene PI3K-STAT3-Interaktion von Relevanz sein könnte. Im Hinblick auf zukünftige Therapiemöglichkeiten ist darauf hinzuweisen, dass in drei Medulloblastomzelllinien keine Interaktion der beiden Signalwege dargestellt werden konnte und eine zusätzliche Inhibition des STAT3-Signalwegs zu einer verstärkten anti-neoplastischen Wirkung führen könnte. In welchem Ausmaß eine Interaktion zwischen PI3K- und STAT3-Signalweg in Medulloblastomen von Bedeutung ist, muss in weiterführenden Studien geklärt werden.

Im Weiteren verifizierten wir die *in vitro* dokumentierte anti-neoplastische Aktivität des PI3K-Inhibitors GDC-0941 *in vivo* mittels eines humanen orthotopen Mausmodells der Nicht-WNT/Nicht-SHH-Medulloblastomuntergruppe mit MYC-Überexpression. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die durch orthotope Injektion von MEB-Med-8A-Zellen entstandenen Tumoren ein schnelles invasives Wachstum zeigen und zum Tod der tumortragenden Tiere innerhalb von 2-3 Wochen führen (Calabrese et al., 2007; Calabrese et al., 2005). Es ist anzunehmen dass der schnelle Tod der Tiere durch die

spezielle Lage des Tumors in der räumlich begrenzten Fossa cranii posterior, welche Zerebellum und Gehirnstamm beherbergt zurückzuführen ist. Zur näheren Erläuterung sei an dieser Stelle erwähnt, dass das Zerebellum, beziehungsweise der Gehirnstamm, neben Bewegung, Balance und Gleichgewicht auch kritische Vitalfunktionen wie die Atmung koordinieren. Unsere Ergebnisse zeigen, dass trotz des aggressiven Wachstums und der speziellen Lage der Tumoren eine Reduktion der Tumorstadiumsrate und eine signifikante Verlängerung des Überlebens, durch die Behandlung der Tiere mit einer im Vergleich zu Phase-I-Studien mittleren Konzentration des PI3K-Inhibitors erzielt werden konnte (Besse et al.; Moreno Garcia et al.; Salphati et al., 2012). Humanisierte orthotope Tiermodelle stellen den präklinischen Goldstandard im Hinblick auf die Evaluation von Medikamenten in der Tumorforschung dar. Dies hat insbesondere Gültigkeit bei der Validierung von Medikamenten gegen Gehirntumoren, da hier die Biodistribution aufgrund der Blut-Gehirn-Schranke von expliziter Bedeutung ist. Um nach Inokulation der Tumorzellen eine Restitutio der Blut-Gehirnschranke zu ermöglichen, verzögerten wir die Behandlung der Mäuse um eine Woche. Diese als "Tumor Growth Delay Studies" bezeichneten Studien imitieren die klinische Situation eines prä-etablierten Tumors akkurater und sind von höherer Beweisstärke hinsichtlich der Effizienz eines Medikamentes als sogenannte "Tumor Inhibition Studies", welche durch gleichzeitige Inokulation des Tumors und Beginn der Medikamentengabe gekennzeichnet sind (Teicher, 2006). Hinsichtlich der Evaluation der anti-neoplastischen *in vivo* Effektivität des Medikaments sind weitere Studien nötig, da neben der direkten Aktivität des Medikaments gegen den Tumor auch eine Wirkung auf die Tumorumgebung zu bedenken ist.

1.5 Synopsis

In der vorliegenden Arbeit zeigen wir, dass in Zelllinien, die von Hochrisiko-Medulloblastomen der Nicht-SHH/Nicht-WNT-Gruppe mit MYC-Überexpression und SHH-Gruppe mit p53-Mutation abgeleitet wurden, verstärkte PI3K/AKT-Signalgebung mit erhöhtem Zellüberleben, verstärkter Proliferation und Motilität, sowie einer gesteigerten Resistenz gegen Chemotherapeutika assoziiert ist. Dies macht den PI3K/AKT-Signalweg zu einer vielversprechenden Zielstruktur dieser bisher standardtherapeutisch meist unzugänglichen Medulloblastomuntergruppen.

Wir demonstrieren in diesem Zusammenhang, dass der klinisch erprobte, hoch spezifische Pan-PI3K-Inhibitor GDC-0941 anti-proliferative und pro-apoptotische Aktivität in pädiatrischen Medulloblastomzelllinien dieser aggressiven Untergruppen zeigt. Des Weiteren wird die beobachtete Reduktion der Zellviabilität von einer tiefen Inhibition der AKT-Phosphorylierung einem Downstream-Mediator, der PI3K, begleitet. GDC-0941 verlangsamt darüber hinaus die migratorische Kapazität von Medulloblastomzellen und attackiert CD133-Stammzellmarker-expressierende Subpopulationen von Medulloblastomzellen. Weiterhin synergisiert GDC-0941 hinsichtlich der anti-neoplastischen Effektivität mit dem in der Medulloblastomtherapie standardmäßig eingesetzten Chemotherapeutikum Etoposide. In einem orthotopen xenograft Mausmodell der Nicht-SHH/Nicht-WNT-Medulloblastomvariante mit MYC-Amplifikation verlangsamt GDC-0941 die Tumorzellwachstumsrate und führte zu einer signifikanten Verlängerung des Überlebens der tumortragenden Tiere. Diese Beobachtungen liefern eine Basis, um das Medikament GDC-0941 weiter für die Therapie von Medulloblastomen alleine und in Kombination mit Standardtherapeutika zu evaluieren.

1.6 Entwicklungen im Bereich der Medulloblastomforschung und Therapie seit Durchführung der Dissertationsarbeit im Jahr 2014

Seit Erstellung der Dissertationsarbeit im Jahr 2014 konnte mittels integrativer Genomik ein tieferes Verständnis hinsichtlich der Heterogenität innerhalb der durch Northcott et al. im Jahr 2011 beschriebenen Medulloblastomgruppen gewonnen werden (Northcott et al., 2011). Cavalli et al. zeigten in diesem Zusammenhang, dass die vier Hauptgruppen SHH, Wnt, Gruppe 3 und Gruppe 4 wie im folgenden beschrieben in weitere Untergruppen unterteilt werden können (Cavalli et al., 2017).

Cavalli et al. unterteilt Tumore der SHH-Gruppe in vier weitere Subtypen: SHH- α , SHH- β , SHH- γ und SHH- δ . Die Tumore der SHH- α Subgruppe kommen bei Kindern im Alter von 3-16 Jahren vor und zeigen häufig Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 und Amplifikation der Gene MYCN und Gli2 (Cavalli et al., 2017). Wie oben schon beschrieben, haben SHH-Tumore mit Mutation des Tumorsuppressorgens p53 eine schlechte Prognose (Louis et al., 2016; Ramaswamy et al., 2016; Zhukova et al., 2013). Diese prognostische Aussagekraft hinsichtlich der Überlebenswahrscheinlichkeit bei

Tumoren mit Mutation des Tumorsuppressorgens p53 scheint jedoch nur dann zuzutreffen, wenn es sich um Tumore der SHH- α -Gruppe handelt (Cavalli et al., 2017).

Tumore der SHH- β Subgruppe findet man fast ausschließlich bei Kleinkindern. Bei Diagnosestellung sind diese meist schon metastasiert, was mit einer schlechten Überlebensrate einhergeht. Molekularbiologisch zeigt sich bei Tumoren der SHH- β -Gruppe im Vergleich zu Tumoren der SHH- γ -Gruppe - welche ebenso häufig bei Kleinkindern vorkommen - eine Deletion von PTEN, einem Negativ-Regulator des PI3K-Signalweges. Insgesamt zeigen SHH- γ -Tumore im Vergleich zu SHH- β -Tumoren weniger chromosomale Anomalien und haben eine bessere Prognose. In wie weit die Deregulation des PI3K-Signalweges bei SHH- β -Tumoren sich auf die Überlebenswahrscheinlichkeit auswirkt, ist zu diesem Zeitpunkt noch unklar (Cavalli et al., 2017).

Tumore der SHH- δ Untergruppe kommen im Gegensatz zu den oben beschriebenen SHH-Untergruppen hauptsächlich bei adulten Patienten vor und zeigen auf molekularbiologischer Ebene häufig Mutationen des Telomerasepromotors (Cavalli et al., 2017).

Patienten der Wnt-Gruppe haben eine exzellente Prognose. In der Regel erkranken Kinder älter als vier Jahre und Erwachsene an Tumoren dieser Gruppe (Clifford et al., 2006; Taylor et al., 2012b). Auf chromosomaler Ebene zeigen diese Tumore häufig eine Monosomie des Chromosom 6 und Mutationen von chromatinmodulierenden Enzymen wie SMARCA4 und CREBBP (Clifford et al., 2006; Northcott et al., 2017; Robinson et al., 2012). Letzteres weist, wie es auch für andere Tumorentitäten gezeigt wurde, auf eine epigenetische Komponente in der Medulloblastomentstehung hin. In Übereinstimmung damit konnte für Wnt-Tumoren eine Mutation der DNA-Helikase DDX3X, welche eine Rolle bei der Segregation der Chromosomen, sowie bei der Regulation des Zellzyklus spielt, gezeigt werden (Robinson et al., 2012). Cavalli et al. postulieren für die Wnt-Untergruppe zumindest zwei weitere Subtypen, Wnt- α , und Wnt- β . Während das Patientenkollektiv des Subtyps Wnt- α größtenteils aus Kindern besteht, treten Wnt- β Tumoren hauptsächlich bei Erwachsenen auf. Auf chromosomaler Ebene unterscheiden sich die beiden Untergruppen hinsichtlich der Monosomie des Chromosomens 6, welche fast ausschließlich bei Tumoren der Wnt- α Gruppe vorkommt (Cavalli et al., 2017).

Tumore der Gruppe 3 und 4 werden durch Cavalli et al. in jeweils drei Subgruppen, α , β und γ , eingeteilt. Die Untergruppen α und β der Gruppe-3-Tumore zeigen eine bessere Prognose als Tumore der Gruppe 3γ . Gruppe-3-Tumore mit MYC-Amplifikation, für welche eine schlechte Prognose beschrieben ist, werden der Gruppe 3γ zugeordnet. Darüber hinaus konnten Cavalli et al. zeigen, dass auch Patienten, welche an Tumoren der Gruppe 3γ ohne MYC-Amplifikation leiden, eine schlechte Prognose haben. Daher postulieren Cavalli et al., dass alle Gruppe- 3γ -Tumore Hochrisikotumore sind und nicht nur Gruppe-3-Tumore mit verstärkter MYC-Aktivität (Cavalli et al., 2017).

Hinsichtlich Gruppe-4-Tumore konnte zwischen den Untergruppen α , β und γ Unterschiede auf chromosomaler Ebene, jedoch keine Unterschiede bezüglich der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten, identifiziert werden (Cavalli et al., 2017).

Die Risikostratifizierung von Medulloblastompatienten wurde in einem Konsensustreffen im Jahr 2015 in Heidelberg überarbeitet und ein neues Protokoll etabliert, in welches die Ergebnisse der molekularbiologischen Forschung hinsichtlich der Gruppeneinteilung der Tumore einfließen. Diese unterscheidet sich von der traditionellen Risikostratifizierung insofern, dass hier nicht mehr zwei, sondern vier Patientenrisikogruppen in Abhängigkeit von ihrer Überlebenswahrscheinlichkeit unterschieden werden. Weiterhin werden die Patienten nicht wie bisher nach Alter, Tumorgröße *post operationem* und Metastasierung eingeteilt, sondern anhand ihrer molekulargenetischen Gruppenzugehörigkeit, spezieller genetischer und cytogenetischer Marker, sowie dem Vorliegen von Metastasierung. Das Protokoll unterscheidet Patienten mit "sehr hohem Risiko" (Überlebenswahrscheinlichkeit <50%), Patienten mit "hohem Risiko" (Überlebenswahrscheinlichkeit 50-70%), Patienten mit "Standardrisiko" (Überlebenswahrscheinlichkeit 75-90%) und Patienten mit "geringem Risiko" (Überlebenswahrscheinlichkeit >90%) (Ramaswamy et al., 2016).

Im Detail bedeutet dies, dass Patienten mit metastasierten Gruppe-3-Tumoren mit MYC-Amplifikation, sowie Patienten, welche an einem SHH-Tumor mit Mutation des Tumorsuppressorgens p53 erkrankt sind, zur Risikogruppe mit "sehr hohem Versterberisiko" gezählt werden können (Ramaswamy und Taylor, 2017).

Patienten mit "hohem Versterberisiko" leiden an metastasierten Tumoren der SHH-Gruppe ohne Mutation des Tumorsuppressorgens p53 oder an SHH-Tumoren mit

Amplifikation des MYCN-Gens ohne Metastasierung. Weiterhin zählen alle Patienten zu dieser Kohorte, welche an Gruppe-4-Tumoren mit Metastasierung leiden (Ramaswamy und Taylor, 2017).

Zur Gruppe der Patienten mit "Standardrisiko" zählen alle Patienten, welche an einem nicht metastasierten SHH-Tumor ohne Mutation des Tumorsuppressorproteins p53 oder Amplifikation des MYCN-Gens erkrankt sind. Weiterhin zählen in diese Risikogruppe alle Patienten, welche an Gruppe-3-Tumoren ohne Metastasierung und Amplifikation des MYC-Gens leiden. Ebenfalls zählen in diese Kohorte alle Patienten, die an Gruppe-4-Tumoren ohne Metastasierung leiden und bei denen der Tumor keinen Verlust des Chromosoms 11 zeigt (Ramaswamy und Taylor, 2017).

Tumore des Wnt-Typs, welche nicht metastasiert sind, sowie Gruppe-4-Tumore mit Verlust des Chromosoms 11 zählen zur Gruppe der Tumore mit "geringem Versterberisiko" (Ramaswamy et al., 2016).

Trotz der oben beschriebenen Risikostratifizierung erfolgt die Behandlung von Medulloblastompatienten zur Zeit noch mehrheitlich nach Therapieprotokollen, welchen die traditionelle Risikostratifizierung zu Grunde liegt (Ramaswamy und Taylor, 2017). In Zukunft sollen jedoch Behandlungsregime an eine auf den Tumor zugeschnittene Risikostratifizierung, wie der in Heidelberg erarbeiteten, angepasst werden. So sollen Patienten mit geringem Risikoprofil von Therapien mit geringerer Zytotoxizität profitieren, während Patienten mit hohem bis sehr hohem Risikoprofil, welche trotz Standardtherapie ein schlechte Überlebensrate zeigen, neuen Behandlungsregimen einschließlich zielgerichteten Therapien zugeführt werden. In diesem Zusammenhang werden zur Zeit verschiedene Studien - NCT03434262, NCT04023669, NCT01601184, NCT01878617, NCT02066220, NCT02875314, NCT02724579 und NCT03904862 - durchgeführt, in welchen der molekulare Gruppenstatus des Tumors, sowie die zugehörige Risikostratifizierung die Behandlung beeinflussen (Thompson et al., 2020). An dieser Stelle möchte ich die Studie NCT01878617 hervorheben. Während die meisten der oben genannten Studien entweder an Patienten mit niedrigem Versterberisiko oder an Rezidivpatienten durchgeführt werden, werden in der Studie NCT01878617 Patienten mit neu diagnostizierten Wnt-, SHH- und Nicht-Wnt/SHH-Tumoren unterschiedlichen Therapieregimen zugeführt. Patienten mit Niedrigrisikotumoren der Wnt-Gruppe erhalten

eine intensitätsreduzierte Therapie, während Patienten, welche an SHH-Tumoren erkrankt sind, zusätzlich einer zielgerichtete Therapie mit Vismodegib unterzogen werden. Hochrisikopatienten, welche an Nicht-Wnt/SHH Tumoren leiden, erhalten eine intensivierete Therapie, in welcher die Standardtherapie um Pemetrexed und Gemcitabine ergänzt wird. Abschließende Ergebnisse im Vergleich stehen hier noch aus und werden mit Spannung erwartet.

Im Folgenden erörtern wir, wie die oben beschriebenen Forschungsergebnisse der letzten Jahre sich retrospektiv auf die Ergebnisse der Dissertation auswirken. Die Tumore, aus denen die in unserer Studie verwendeten Zelllinien hervorgegangen sind, gliedern sich auch nach neustem Forschungsstand mit Blick auf die durch Cavalli et al. erarbeitete Untergliederung der von Northcott et. al etablierten molekularbiologischen Gruppeneinteilung in die Kohorte der Tumore mit sehr schlechter Prognose ein (Cavalli et al., 2017; Northcott et al., 2011). Die Zelllinie Daoy ordnet sich aufgrund der Mutation des Tumorsuppressorgens p53 in die Gruppe SHH- α ein, während die Zelllinien MEB-Med-8A, D283 Med und D341 Med aufgrund des Isochromosoms 17q und der MYC-Amplifikation der Untergruppe 3 γ zuzuordnen wären (Cavalli et al., 2017; Craveiro et al., 2014). Patienten dieser Tumorguppe haben das höchste Versterberisiko unter der Standardtherapie nach neuer Risikostratifizierung. Daher sind es gerade diese Patienten, die auch heute noch von neuen Therapieansätzen profitieren würden. Unabhängig von unserer Arbeitsgruppe beobachteten auch andere Arbeitsgruppen, dass die Inhibition der PI3K-Kaskade eine mögliche therapeutische Option für diese Patientenkohorte darstellt (Menyhart et al., 2019; Pei et al., 2012). Hinsichtlich des von uns verwendeten PI3K-Inhibitors GDC-0941 lässt sich in diesem Zusammenhang berichten, dass dieser seither in multiplen klinischen Phase-I- und Phase-II-Studien an verschiedenen Tumorentitäten wie Brust- und Lungenkarzinomen, verwendet wird. Hier zeigte dieser eine gute Verträglichkeit, sowie anti-neoplastische Aktivität in Kombination mit anderen zielgerichteten Therapeutika, sowie der Standardtherapie (Sarker et al., 2015; Schoffski et al., 2018; Shapiro et al., 2020; Soria et al., 2017; Yamamoto et al., 2017). Hervorzuheben wäre an dieser Stelle die Studie von Soria et. al, in welcher GDC-0941 eine gute Verträglichkeit, sowie antikarzinogene Aktivität mit Pemetrexed attestiert wurde. Pemetrexed wird, wie oben beschrieben, zur Zeit in einer klinischen Studie an Patienten mit Gruppe-3-Tumoren evaluiert (Soria et al., 2017). GDC-0941 bietet sich aufgrund

dieser klinischen Ergebnisse zur Erprobung in Kombination mit Standardtherapien als Therapieoption von Hochrisikomedulloblastomen auch heute in klinischen Studien an.

Bezüglich Therapieoptionen von Hochrisikotumoren des Medulloblastoms überzeugten in präklinischen Studien seit Erscheinen der Dissertation, neben Inhibitoren des PI3K-Signalweges, Multikinaseinhibitoren, sowie Inhibitoren von Histondeacetylasen und Bromodomaininhibitoren (Bandopadhyay et al., 2014; Bandopadhyay et al., 2019; Craveiro et al., 2014; Craveiro et al., 2017; Ecker et al., 2015; Ehrhardt et al., 2018).

Die klinisch gut etablierten Multikinaseinhibitoren Sorafenib, Pazopanib, Axitinib und Vandetanib, welche unterschiedliche Kombinationen von Rezeptorkinasen wie PDGFR α/β , Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1-3, c-kit und EGFR hemmen, zeigten bei Hochrisikotumoren der Gruppe 3 mit MYC-Amplifikation eine anti-neoplastische Wirkung. Für Sorafenib und Pazopanib konnte ein gutes Ansprechen auch *in vivo* in einem orthotopen Mausmodell bestätigt werden. Für Axitinib und Vandetanib wurde ein additiver bzw. synergistischer Effekt in Kombination mit GDC-0941 belegt (Craveiro et al., 2014; Craveiro et al., 2017; Ehrhardt et al., 2018).

Der Pan-Histondeacetylasen-Inhibitor LBH-589 zeigte gegenüber Gruppe-3-Tumoren mit MYC-Amplifikation präklinisch eine gute antineoplastische Wirkung (Ecker et al., 2015). Auch hier konnte in Kombination mit der Inhibierung des PI3K-Signalweges ein synergistischer Effekt hinsichtlich der antikarzinogenen Wirkung bei Hochrisikotumoren erzielt werden (Pei et al., 2016). Hinsichtlich seiner klinischen Anwendung zeigte LBH-589 kürzlich in einer klinischen Phase-I-Studie bei pädiatrischen Patienten mit verschiedenen soliden Tumorentitäten inklusive des Medulloblastoms eine gute Verträglichkeit (Wood et al., 2018). Darüber hinaus konnte in zwei präklinischen Studien gezeigt werden, dass auch Tumore der SHH-Gruppe sensitiv auf Inhibitoren von Histondeacetylasen reagieren. Inwieweit dies auch auf Hochrisikotumore der SHH - Gruppe mit Mutation des Tumorsuppressorgens p53 zutrifft, lässt sich aus den vorliegenden Daten nicht entnehmen (Coni et al., 2017; Pak et al., 2019).

Bromodomaininhibitoren wirken der MYC-Transkription durch Inhibition von Bromodomain- und Extra-terminal-motif-Proteinen, welche durch epigenetische Interaktionen zwischen Bromodomain und acetylierten Histonen an der Transkription

verschiedener Proteine mitwirken, entgegen (Delmore et al., 2011). In präklinischen Studien zeigte sich im Einvernehmen mit dem Wirkmechanismus dieser Inhibitoren eine gute antineoplastische Wirkung gegenüber Gruppe-3-Tumoren mit MYC-Amplifikation. (Bandopadhyay et al., 2014; Bandopadhyay et al., 2019). Diesbezüglich demonstrierten Bolin et al., dass die Kombination dieser mit Inhibitoren von cyclinabhängigen Kinasen zu einer Verstärkung des antikarzinogenen Effektes bei Hochrisikotumoren der Gruppe 3 mit MYC-Amplifikation führt (Bolin et al., 2018).

Zusammenfassend ist hier zu sagen, dass seit dem Erscheinen der Dissertation die durch Northcott et al. etablierte Gruppeneinteilung weiter heterogenisiert wurde und eine auf den molekularen Erkenntnissen aufbauende Risikostratifizierung erarbeitet wurde.

Obwohl in präklinischen Studien vielversprechende Therapieansätze von Hochrisikotumoren des Medulloblastoms erarbeitet wurden, erscheint die klinische Umsetzung dieser protrahiert. Zurzeit werden die meisten klinischen Studien an Patienten mit Wnt- oder SHH-Tumoren mit niedrigem Versterberisiko durchgeführt, während Studien, welche gezielt an der Therapie von Hochrisikopatienten arbeiten, rar sind. In diesem Zusammenhang stellt die Inhibition des PI3K-Signalweges in Kombination mit der Standard- oder anderen zielgerichteten Therapien auch heute noch eine vielversprechende Option dar. Der von uns verwendete Inhibitor GDC-0941 wurde zudem seit Erscheinen unserer Arbeit im Jahr 2014 in multiplen klinischen Studien validiert. Daher erscheint die Translation unserer präklinischen Daten in klinische Studien an Patienten mit Hochrisikotumoren auch heute noch erfolgsversprechend.

1.7 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, Klevernic I, Arthur JS, Alessi DR, Cohen P. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J.* 2007; 408: 297-315

Bandopadhyay P, Bergthold G, Nguyen B, Schubert S, Gholamin S, Tang Y, Bolin S, Schumacher SE, Zeid R, Masoud S, Yu F, Vue N, Gibson WJ, Paoletta BR, Mitra SS, Cheshier SH, Qi J, Liu KW, Wechsler-Reya R, Weiss WA, Swartling FJ, Kieran MW,

- Bradner JE, Beroukhim R, Cho YJ. BET bromodomain inhibition of MYC-amplified medulloblastoma. *Clin Cancer Res.* 2014; 20: 912-925
- Bandopadhyay P, Piccioni F, O'Rourke R, Ho P, Gonzalez EM, Buchan G, Qian K, Gionet G, Girard E, Coxon M, Rees MG, Brenan L, Dubois F, Shapira O, Greenwald NF, Pages M, Balboni Iniguez A, Paoletta BR, Meng A, Sinai C, Roti G, Dharia NV, Creech A, Tanenbaum B, Khadka P, Tracy A, Tiv HL, Hong AL, Coy S, Rashid R, Lin JR, Cowley GS, Lam FC, Goodale A, Lee Y, Schoolcraft K, Vazquez F, Hahn WC, Tsherniak A, Bradner JE, Yaffe MB, Milde T, Pfister SM, Qi J, Schenone M, Carr SA, Ligon KL, Kieran MW, Santagata S, Olson JM, Gokhale PC, Jaffe JD, Root DE, Stegmaier K, Johannessen CM, Beroukhim R. Neuronal differentiation and cell-cycle programs mediate response to BET-bromodomain inhibition in MYC-driven medulloblastoma. *Nat Commun.* 2019; 10: 2400
- Baryawno N, Sveinbjornsson B, Eksborg S, Chen CS, Kogner P, Johnsen JI. Small-molecule inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling inhibit Wnt/beta-catenin pathway cross-talk and suppress medulloblastoma growth. *Cancer Res.* 2010; 70: 266-276
- Besse B, Soria J, Gomez-Roca C, Ware JA, Adjei AA, Dy GK, Shankar GR, Brachmann K, Groen HJ. A phase Ib study to evaluate the PI3-kinase inhibitor GDC-0941 with paclitaxel (P) and carboplatin (C), with and without bevacizumab (BEV), in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 29: 2011:3044.
- Blom T, Roselli A, Hayry V, Tynninen O, Wartiovaara K, Korja M, Nordfors K, Haapasalo H, Nupponen NN. Amplification and overexpression of KIT, PDGFRA, and 2 in medulloblastomas and primitive neuroectodermal tumors. *J Neurooncol.* 2010; 97: 217-224
- Bodey B, Kaiser HE, Siegel SE. Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in childhood brain tumors. *In Vivo.* 2005; 19: 931-941
- Bolin S, Borgenvik A, Persson CU, Sundstrom A, Qi J, Bradner JE, Weiss WA, Cho YJ, Weishaupt H, Swartling FJ. Combined BET bromodomain and CDK2 inhibition in MYC-driven medulloblastoma. *Oncogene.* 2018; 37: 2850-2862
- Briggs KJ, Corcoran-Schwartz IM, Zhang W, Harcke T, Devereux WL, Baylin SB, Eberhart CG, Watkins DN. Cooperation between the Hic1 and Ptch1 tumor suppressors in medulloblastoma. *Genes Dev.* 2008; 22: 770-785

Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, Oh EY, Gaber MW, Finklestein D, Allen M, Frank A, Bayazitov IT, Zakharenko SS, Gajjar A, Davidoff A, Gilbertson RJ. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell*. 2007; 11: 69-82

Calabrese CM, Gaber WM, Kilmar J, Fuller C, Allen M, Gilbertson RJ. Autofluorescent mouse models of human medulloblastoma. *AACR Meeting*. Anaheim, California: Proc Amer Assoc Cancer Res, 2005, 903-c-904

Cattaneo E, Magrassi L, De-Fraja C, Conti L, Di Gennaro I, Butti G, Govoni S. Variations in the levels of the JAK/STAT and ShcA proteins in human brain tumors. *Anticancer Res*. 1998; 18: 2381-2387

Cavalli FMG, Remke M, Rampasek L, Peacock J, Shih DJH, Luu B, Garzia L, Torchia J, Nor C, Morrissy AS, Agnihotri S, Thompson YY, Kuzan-Fischer CM, Farooq H, Isaev K, Daniels C, Cho BK, Kim SK, Wang KC, Lee JY, Grajkowska WA, Perek-Polnik M, Vasiljevic A, Faure-Contier C, Jouvet A, Giannini C, Nageswara Rao AA, Li KKW, Ng HK, Eberhart CG, Pollack IF, Hamilton RL, Gillespie GY, Olson JM, Leary S, Weiss WA, Lach B, Chambless LB, Thompson RC, Cooper MK, Vibhakar R, Hauser P, van Veelen MC, Kros JM, French PJ, Ra YS, Kumabe T, Lopez-Aguilar E, Zitterbart K, Sterba J, Finocchiaro G, Massimino M, Van Meir EG, Osuka S, Shofuda T, Klekner A, Zollo M, Leonard JR, Rubin JB, Jabado N, Albrecht S, Mora J, Van Meter TE, Jung S, Moore AS, Hallahan AR, Chan JA, Tirapelli DPC, Carlotti CG, Fouladi M, Pimentel J, Faria CC, Saad AG, Massimi L, Liao LM, Wheeler H, Nakamura H, Elbabaa SK, Perezpena-Diazconti M, Chico Ponce de Leon F, Robinson S, Zapotocky M, Lassaletta A, Huang A, Hawkins CE, Tabori U, Bouffet E, Bartels U, Dirks PB, Rutka JT, Bader GD, Reimand J, Goldenberg A, Ramaswamy V, Taylor MD. Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups. *Cancer Cell*. 2017; 31: 737-754 e736

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: 1424-1430

Clifford SC, Lusher ME, Lindsey JC, Langdon JA, Gilbertson RJ, Straughton D, Ellison DW. Wnt/Wingless pathway activation and chromosome 6 loss characterize a distinct

molecular sub-group of medulloblastomas associated with a favorable prognosis. *Cell Cycle*. 2006; 5: 2666-2670

Coni S, Mancuso AB, Di Magno L, Sdruscia G, Manni S, Serrao SM, Rotili D, Spiombi E, Bufalieri F, Petroni M, Kusio-Kobialka M, De Smaele E, Ferretti E, Capalbo C, Mai A, Niewiadomski P, Screpanti I, Di Marcotullio L, Canettieri G. Corrigendum: Selective targeting of HDAC1/2 elicits anticancer effects through Gli1 acetylation in preclinical models of SHH Medulloblastoma. *Sci Rep*. 2017; 7: 46645

Cowan R, Hoban P, Kelsey A, Birch JM, Gattamaneni R, Evans DG. The gene for the naevoid basal cell carcinoma syndrome acts as a tumour-suppressor gene in medulloblastoma. *Br J Cancer*. 1997; 76: 141-145

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

Craveiro RB, Ehrhardt M, Velz J, Olschewski M, Goetz B, Pietsch T, Dilloo D. The anti-neoplastic activity of Vandetanib against high-risk medulloblastoma variants is profoundly enhanced by additional PI3K inhibition. *Oncotarget*. 2017:

Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, Rahl PB, Shi J, Jacobs HM, Kastiris E, Gilpatrick T, Paranal RM, Qi J, Chesi M, Schinzel AC, McKeown MR, Heffernan TP, Vakoc CR, Bergsagel PL, Ghobrial IM, Richardson PG, Young RA, Hahn WC, Anderson KC, Kung AL, Bradner JE, Mitsiades CS. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell*. 2011; 146: 904-917

DeSouza RM, Jones BR, Lewis SP, Kurian KM. Pediatric medulloblastoma - update on molecular classification driving targeted therapies. *Front Oncol*. 2014; 4: 176

Dey J, Ditzler S, Knoblauch SE, Hatton BA, Schelter JM, Cleary MA, Mecham B, Rorke-Adams LB, Olson JM. A distinct Smoothed mutation causes severe cerebellar developmental defects and medulloblastoma in a novel transgenic mouse model. *Mol Cell Biol*. 2012; 32: 4104-4115

Ecker J, Oehme I, Mazitschek R, Korshunov A, Kool M, Hielscher T, Kiss J, Selt F, Konrad C, Lodrini M, Deubzer HE, von Deimling A, Kulozik AE, Pfister SM, Witt O, Milde T. Targeting class I histone deacetylase 2 in MYC amplified group 3 medulloblastoma. *Acta Neuropathol Commun*. 2015; 3: 22

- Ehrhardt M, Craveiro RB, Velz J, Olschewski M, Casati A, Schonberger 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
- Ellison DW, Dalton J, Kocak M, Nicholson SL, Fraga C, Neale G, Kenney AM, Brat DJ, Perry A, Yong WH, Taylor RE, Bailey S, Clifford SC, Gilbertson RJ. Medulloblastoma: clinicopathological correlates of SHH, WNT, and non-SHH/WNT molecular subgroups. *Acta Neuropathol*. 2011; 121: 381-396
- Evans DG, Farndon PA, Burnell LD, Gattamaneni HR, Birch JM. The incidence of Gorlin syndrome in 173 consecutive cases of medulloblastoma. *Br J Cancer*. 1991; 64: 959-961
- Folkes AJ, Ahmadi K, Alderton WK, Alix S, Baker SJ, Box G, Chuckowree IS, Clarke PA, Depledge P, Eccles SA, Friedman LS, Hayes A, Hancox TC, Kugendradas A, Lensun L, Moore P, Olivero AG, Pang J, Patel S, Pergl-Wilson GH, Raynaud FI, Robson A, Saghir N, Salphati L, Sohal S, Ultsch MH, Valenti M, Wallweber HJ, Wan NC, Wiesmann C, Workman P, Zhyvoloup A, Zvelebil MJ, Shuttleworth SJ. The identification of 2-(1H-indazol-4-yl)-6-(4-methanesulfonyl-piperazin-1-ylmethyl)-4-morpholin-4-yl-t hieno[3,2-d]pyrimidine (GDC-0941) as a potent, selective, orally bioavailable inhibitor of class I PI3 kinase for the treatment of cancer. *J Med Chem*. 2008; 51: 5522-5532
- Fruman DA, Rommel C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2014; 13: 140-156
- Gharbi SI, Zvelebil MJ, Shuttleworth SJ, Hancox T, Saghir N, Timms JF, Waterfield MD. Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. *Biochem J*. 2007; 404: 15-21
- Goodrich LV, Milenkovic L, Higgins KM, Scott MP. Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science*. 1997; 277: 1109-1113
- Graupera M, Potente M. Regulation of angiogenesis by PI3K signaling networks. *Exp Cell Res*. 2013; 319: 1348-1355
- Guerreiro AS, Fattet S, Fischer B, Shalaby T, Jackson SP, Schoenwaelder SM, Grotzer MA, Delattre O, Arcaro A. Targeting the PI3K p110alpha isoform inhibits medulloblastoma proliferation, chemoresistance, and migration. *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 6761-6769
- Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulous PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, Vorechovsky I, Holmberg E, Uden AB, Gillies S, Negus K, Smyth I, Pressman C, Leffell

- DJ, Gerrard B, Goldstein AM, Dean M, Toftgard R, Chenevix-Trench G, Wainwright B, Bale AE. Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell*. 1996; 85: 841-851
- Hallahan AR, Pritchard JI, Hansen S, Benson M, Stoeck J, Hatton BA, Russell TL, Ellenbogen RG, Bernstein ID, Beachy PA, Olson JM. The SmoA1 mouse model reveals that notch signaling is critical for the growth and survival of sonic hedgehog-induced medulloblastomas. *Cancer Res*. 2004; 64: 7794-7800
- Hart JR, Vogt PK. Phosphorylation of AKT: a mutational analysis. *Oncotarget*. 2011; 2: 467-476
- Hartmann W, Digon-Sontgerath B, Koch A, Waha A, Endl E, Dani I, Denkhaus D, Goodyer CG, Sorensen 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
- Hatton BA, Villavicencio EH, Tsuchiya KD, Pritchard JI, Ditzler S, Pullar B, Hansen S, Knoblauch SE, Lee D, Eberhart CG, Hallahan AR, Olson JM. The Smo/Smo model: hedgehog-induced medulloblastoma with 90% incidence and leptomeningeal spread. *Cancer Res*. 2008; 68: 1768-1776
- Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*. 2004; 18: 1926-1945
- Ihle NT, Powis G. Inhibitors of phosphatidylinositol-3-kinase in cancer therapy. *Mol Aspects Med*. 2010; 31: 135-144
- Iqbal N. Imatinib: a breakthrough of targeted therapy in cancer. *Chemother Res Pract*. 2014; 2014: 357027
- Jackson C, Ruzevick J, Amin AG, Lim M. Potential role for STAT3 inhibitors in glioblastoma. *Neurosurg Clin N Am*. 2012; 23: 379-389
- Jones DT, Jager N, Kool M, Zichner T, Hutter B, Sultan M, Cho YJ, Pugh TJ, Hovestadt V, Stutz AM, Rausch T, Warnatz HJ, Ryzhova M, Bender S, Sturm D, Pleier S, Cin H, Pfaff E, Sieber L, Wittmann A, Remke M, Witt H, Hutter S, Tzaridis T, Weischenfeldt J, Raeder B, Avci M, Amstislavskiy V, Zapatka M, Weber UD, Wang Q, Lasitschka B, Bartholomae CC, Schmidt M, von Kalle C, Ast V, Lawerenz C, Eils J, Kabbe R, Benes V, van Sluis P, Koster J, Volckmann R, Shih D, Betts MJ, Russell RB, Coco S, Tonini GP, Schuller U, Hans V, Graf N, Kim YJ, Monoranu C, Raggendorf W, Unterberg A, Herold-

- Mende C, Milde T, Kulozik AE, von Deimling A, Witt O, Maass E, Rossler J, Ebinger M, Schuhmann MU, Fruhwald MC, Hasselblatt M, Jabado N, Rutkowski S, von Bueren AO, Williamson D, Clifford SC, McCabe MG, Collins VP, Wolf S, Wiemann S, Lehrach H, Brors B, Scheurlen W, Felsberg J, Reifenberger G, Northcott PA, Taylor MD, Meyerson M, Pomeroy SL, Yaspo ML, Korbel JO, Korshunov A, Eils R, Pfister SM, Lichter P. Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma. *Nature*. 2012; 488: 100-105
- 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, Backlund 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
- Kool M, Koster J, Bunt J, Hasselt NE, Lakeman A, van Sluis P, Troost D, Meeteren NS, Caron HN, Cloos J, Mrcic A, Ylstra B, Grajkowska W, Hartmann W, Pietsch T, Ellison D, Clifford SC, Versteeg R. Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. *PLoS One*. 2008; 3: e3088
- Lee Y, Kawagoe R, Sasai K, Li Y, Russell HR, Curran T, McKinnon PJ. Loss of suppressor-of-fused function promotes tumorigenesis. *Oncogene*. 2007; 26: 6442-6447
- Liu W, Zhang S, Zhang L, Cui Q, Wang J, Gui T, Pang Q. A prognostic analysis of pediatrics central nervous system small cell tumors: evaluation of EGFR family gene amplification and overexpression. *Diagn Pathol*. 2014; 9: 132
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007; 114: 97-109
- 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
- MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*. 2009; 17: 9-26

- Maddrey AM, Bergeron JA, Lombardo ER, McDonald NK, Mulne AF, Barenberg PD, Bowers DC. Neuropsychological performance and quality of life of 10 year survivors of childhood medulloblastoma. *J Neurooncol.* 2005; 72: 245-253
- Mallick S, Gandhi AK, Benson R, Sharma DN, Haresh KP, Gupta S, Julka PK, Rath GK. Outcomes of adult medulloblastoma treated with a multimodality approach: A tertiary cancer center experience. *South Asian J Cancer.* 2015; 4: 174-178
- Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007; 129: 1261-1274
- Menyhart O, Giangaspero F, Gyorffy B. Molecular markers and potential therapeutic targets in non-WNT/non-SHH (group 3 and group 4) medulloblastomas. *J Hematol Oncol.* 2019; 12: 29
- Metcalfe C, Aliche B, Crow A, Lamoureux M, Dijkgraaf GJ, Peale F, Gould SE, de Sauvage FJ. PTEN loss mitigates the response of medulloblastoma to Hedgehog pathway inhibition. *Cancer Res.* 2013; 73: 7034-7042
- Moreno Garcia, Baird RD, K. S, Basu JB, Tunariu N, Blanco M, Cassier PA, Pedersen JV, Puglisi M, Sarker D, Papadatos-Pastos DA, Omlin G, Biondo A, Ware JA, Koeppen H, Levy GG, Mazina KE, De Bono JS. A phase I study evaluating GDC-0941, an oral phosphoinositide-3 kinase (PI3K) inhibitor, in patients with advanced solid tumors or multiple myeloma. *J Clin Oncol* 29: 2011: 3021.
- Northcott PA, Buchhalter I, Morrissy AS, Hovestadt V, Weischenfeldt J, Ehrenberger T, Grobner 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, Jager N, Chavez L, Hutter B, Bieg M, Paramasivam N, Heinold M, Gu Z, Ishaque N, Jager-Schmidt C, Imbusch CD, Jugold A, Hubschmann 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, Beroukhi 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; 547: 311-317

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, Stutz 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 LA, 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, Scheurlen W, Eberhart CG, Fevre-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, Bogner L, Klekner A, Van Meter TE, Kumabe T, Tominaga T, Elbabaa SK, Leonard JR, Rubin JB, Liau 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

Pak E, MacKenzie EL, Zhao X, Pazyra-Murphy MF, Park PMC, Wu L, Shaw DL, Addleson EC, Cayer SS, Lopez BG, Agar NYR, Rubin LL, Qi J, Merk DJ, Segal RA. A large-scale drug screen identifies selective inhibitors of class I HDACs as a potential therapeutic option for SHH medulloblastoma. *Neuro Oncol.* 2019:

Pei Y, Liu KW, Wang J, Garancher A, Tao R, Esparza LA, Maier DL, Udaka YT, Murad N, Morrissy S, Seker-Cin H, Brabetz S, Qi L, Kogiso M, Schubert S, Olson JM, Cho YJ, Li XN, Crawford JR, Levy ML, Kool M, Pfister SM, Taylor MD, Wechsler-Reya RJ. HDAC and PI3K Antagonists Cooperate to Inhibit Growth of MYC-Driven Medulloblastoma. *Cancer Cell.* 2016; 29: 311-323

- Pei Y, Moore CE, Wang J, Tewari AK, Eroshkin A, Cho YJ, Witt H, Korshunov A, Read TA, Sun JL, Schmitt EM, Miller CR, Buckley AF, McLendon RE, Westbrook TF, Northcott PA, Taylor MD, Pfister SM, Febbo PG, Wechsler-Reya RJ. An animal model of MYC-driven medulloblastoma. *Cancer Cell*. 2012; 21: 155-167
- Pizer BL, Clifford SC. The potential impact of tumour biology on improved clinical practice for medulloblastoma: progress towards biologically driven clinical trials. *Br J Neurosurg*. 2009; 23: 364-375
- 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, Andre 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, Taylor MD. Medulloblastoma: From Myth to Molecular. *J Clin Oncol*. 2017; 35: 2355-2363
- Robinson G, Parker M, Kranenburg TA, Lu C, Chen X, Ding L, Phoenix TN, Hedlund E, Wei L, Zhu X, Chalhoub N, Baker SJ, Huether R, Kriwacki R, Curley N, Thiruvengadam R, Wang J, Wu G, Rusch M, Hong X, Becksfort J, Gupta P, Ma J, Easton J, Vadodaria B, Onar-Thomas A, Lin T, Li S, Pounds S, Paugh S, Zhao D, Kawauchi D, Roussel MF, Finkelstein D, Ellison DW, Lau CC, Bouffet E, Hassall T, Gururangan S, Cohn R, Fulton RS, Fulton LL, Dooling DJ, Ochoa K, Gajjar A, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR, Zhang J, Gilbertson RJ. Novel mutations target distinct subgroups of medulloblastoma. *Nature*. 2012; 488: 43-48
- Salphati L, Heffron TP, Alicke B, Nishimura M, Barck K, Carano RA, Cheong J, Edgar KA, Greve J, Kharbanda S, Koeppen H, Lau S, Lee LB, Pang J, Plise EG, Pokorny JL, Reslan HB, Sarkaria JN, Wallin JJ, Zhang X, Gould SE, Olivero AG, Phillips HS. Targeting the PI3K pathway in the brain--efficacy of a PI3K inhibitor optimized to cross the blood-brain barrier. *Clin Cancer Res*. 2012; 18: 6239-6248
- Sarker D, Ang JE, Baird R, Kristeleit R, Shah K, Moreno V, Clarke PA, Raynaud FI, Levy G, Ware JA, Mazina K, Lin R, Wu J, Fredrickson J, Spoerke JM, Lackner MR, Yan Y, Friedman LS, Kaye SB, Derynck MK, Workman P, de Bono JS. 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

Schoffski P, Cresta S, Mayer IA, Wildiers H, Damian S, Gendreau S, Rooney I, Morrissey KM, Spoerke JM, Ng VW, Singel SM, Winer E. A phase Ib study of pictilisib (GDC-0941) in combination with paclitaxel, with and without bevacizumab or trastuzumab, and with letrozole in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2018; 20: 109

Shapiro GI, LoRusso P, Kwak E, Pandya S, Rudin CM, Kurkjian C, Cleary JM, Pilat MJ, Jones S, de Crespigny A, Fredrickson J, Musib L, Yan Y, Wongchenko M, Hsieh HJ, Gates MR, Chan IT, Bendell J. Phase Ib study of the MEK inhibitor cobimetinib (GDC-0973) in combination with the PI3K inhibitor pictilisib (GDC-0941) in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs.* 2020; 38: 419-432

Soria JC, Adjei AA, Bahleda R, Besse B, Ferte C, Planchard D, Zhou J, Ware J, Morrissey K, Shankar G, Lin W, Schutzman JL, Dy GK, Groen HJM. A phase IB dose-escalation study of the safety and pharmacokinetics of pictilisib in combination with either paclitaxel and carboplatin (with or without bevacizumab) or pemetrexed and cisplatin (with or without bevacizumab) in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer.* 2017; 86: 186-196

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.* 2012a; 123: 465-472

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 Neuropathologica.* 2012b; 123: 465-472

Taylor RE, Bailey CC, Robinson KJ, Weston CL, Walker DA, Ellison D, Ironside J, Pizer BL, Lashford LS. Outcome for patients with metastatic (M2-3) medulloblastoma treated with SIOP/UKCCSG PNET-3 chemotherapy. *Eur J Cancer.* 2005; 41: 727-734

Teicher BA. Tumor models for efficacy determination. *Mol Cancer Ther.* 2006; 5: 2435-2443

Thompson EM, Ashley D, Landi D. Current medulloblastoma subgroup specific clinical trials. *Transl Pediatr.* 2020; 9: 157-162

Thompson MC, Fuller C, Hogg TL, Dalton J, Finkelstein D, Lau CC, Chintagumpala M, Adesina A, Ashley DM, Kellie SJ, Taylor MD, Curran T, Gajjar A, Gilbertson RJ. Genomics

identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. *J Clin Oncol*. 2006; 24: 1924-1931

Torbett NE, Luna-Moran A, Knight ZA, Houk A, Moasser M, Weiss W, Shokat KM, Stokoe D. A chemical screen in diverse breast cancer cell lines reveals genetic enhancers and suppressors of sensitivity to PI3K isoform-selective inhibition. *Biochem J*. 2008; 415: 97-110

Vogt PK, Hart JR. PI3K and STAT3: a new alliance. *Cancer Discov*. 2011; 1: 481-486

von Hoff K, Hinkes B, Gerber NU, Deinlein F, Mittler U, Urban C, Benesch M, Warmuth-Metz M, Soerensen N, Zwiener I, Goette H, Schlegel PG, Pietsch T, Kortmann RD, Kuehl J, Rutkowski S. Long-term outcome and clinical prognostic factors in children with medulloblastoma treated in the prospective randomised multicentre trial HIT'91. *Eur J Cancer*. 2009; 45: 1209-1217

Wilne S, Collier J, Kennedy C, Jenkins A, Grout J, Mackie S, Koller K, Grundy R, Walker D. Progression from first symptom to diagnosis in childhood brain tumours. *Eur J Pediatr*. 2012; 171: 87-93

Wood PJ, Strong R, McArthur GA, Michael M, Algar E, Muscat A, Rigby L, Ferguson M, Ashley DM. A phase I study of panobinostat in pediatric patients with refractory solid tumors, including CNS tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2018; 82: 493-503

Yamamoto N, Fujiwara Y, Tamura K, Kondo S, Iwasa S, Tanabe Y, Horiike A, Yanagitani N, Kitazono S, Inatani M, Tanaka J, Nishio M. Phase Ia/Ib study of the pan-class I PI3K inhibitor pictilisib (GDC-0941) administered as a single agent in Japanese patients with solid tumors and in combination in Japanese patients with non-squamous non-small cell lung cancer. *Invest New Drugs*. 2017; 35: 37-46

Yang F, Van Meter TE, Buettner R, Hedvat M, Liang W, Kowolik CM, Mepani N, Mirosevich J, Nam S, Chen MY, Tye G, Kirschbaum M, Jove R. Sorafenib inhibits signal transducer and activator of transcription 3 signaling associated with growth arrest and apoptosis of medulloblastomas. *Mol Cancer Ther*. 2008; 7: 3519-3526

Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9: 798-809

Yuh GE, Loredano LN, Yonemoto LT, Bush DA, Shahnazi K, Preston W, Slater JM, Slater JD. Reducing toxicity from craniospinal irradiation: using proton beams to treat medulloblastoma in young children. *Cancer J*. 2004; 10: 386-390

Zheng Z, Amran SI, Thompson PE, Jennings IG. Isoform-selective inhibition of phosphoinositide 3-kinase: identification of a new region of nonconserved amino acids critical for p110alpha inhibition. *Mol Pharmacol*. 2011; 80: 657-664

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, Bognar 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, Liau LM, Massimi L, Pollack IF, Shin Ra Y, Van Meir EG, Zitterbart K, Schuller 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

Projekt: The PI3K inhibitor GDC-0941 displays promising in vitro and in vivo efficacy for targeted medulloblastoma therapy

Vorarbeiten:

Planung des Projektes: Dr. rer. nat. Ehrhardt

Experimentelle Durchführung gegliedert nach Experimenten

Experiment 1: GDC-0941 treatment leads to profound reduction of cell viability

Durchführung: Dr. rer. nat. Ehrhardt

Experiment 2: GDC-0941 displays anti-proliferative and pro-apoptotic effects in medulloblastoma cells

Durchführung: Dr. rer. nat. Craveiro und Dr. rer. nat. Ehrhardt

Experiment 3: Treatment of medulloblastoma with GDC-0941 induces G0/G1-phase cell cycle arrest

Durchführung: Dr. rer. nat. Ehrhardt

Experiment 4: The anti-proliferative and pro-apoptotic effects of GDC-0941 are associated with inhibition of the PI3K/AKT pathway

Durchführung: Dr. rer. nat. Craveiro

Experiment 5: GDC-0941 reduces the clonogenicity of medulloblastoma cell lines

Durchführung: Dr. rer. nat. Ehrhardt

Experiment 6: GDC-0941 delays medulloblastoma growth and prolongs survival in an orthotopic medulloblastoma xenograft mod

Durchführung: Dr. rer. nat. Craveiro

Experiment 7: GDC-0941 synergizes with etoposide a standard chemotherapeutic in pediatric medulloblastoma treatment.

Durchführung: Dr. rer. nat. Craveiro

Experiment 8: GDC-0941 inhibits the proliferation of CD133-positive MB cells.

Durchführung: Dr. rer. nat. Craveiro

Erstellung des Manuskriptes

Schreiben des Manuskriptes

Durchführung: Dr. rer. nat. Ehrhardt, Frau Professor Dilloo, Dr. rer. nat. Craveiro und Professor Pietsch

Anfertigung der Abbildungen

Durchführung: Dr. rer. nat. Craveiro

Kontribution Anteilig in Reihenfolge der Namen.

Unterschrift: Dr. rer. nat. Craveiro

Unterschrift: Dr. rer.nat. Ehrhardt

The PI3K inhibitor GDC-0941 displays promising *in vitro* and *in vivo* efficacy for targeted medulloblastoma therapy

Michael Ehrhardt^{1,*}, Rogerio B. Craveiro^{1,*}, Martin I. Holst², Torsten Pietsch², Dagmar Dilloo¹

¹Department of Pediatric Hematology and Oncology, Center for Pediatrics, University of Bonn Medical Center, D-53113 Bonn, Germany

²Department of Neuropathology, University of Bonn, 53105 Bonn, Germany

*These authors have contributed equally to this work

Correspondence to:

Rogério B. Craveiro, e-mail: Rogerio.craveiro@ukb.uni-bonn.de

Keywords: medulloblastoma, GDC-0941, PI3K inhibitor, targeted therapy, c-myc

Received: August 13, 2014

Accepted: November 08, 2014

Published: December 06, 2014

ABSTRACT

Deregulation of the Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT signalling network is a hallmark of oncogenesis. Also medulloblastoma, the most common malignant brain tumor in children, is characterized by high levels of AKT phosphorylation and activated PI3K signalling in medulloblastoma is associated with enhanced cellular motility, survival and chemoresistency underscoring its role of as a potential therapeutic target. Here we demonstrate that GDC-0941, a highly specific PI3K inhibitor with good clinical tolerability and promising anti-neoplastic activity in adult cancer, also displays anti-proliferative and pro-apoptotic effects in pediatric human medulloblastoma cell lines. Loss in cell viability is accompanied by reduced phosphorylation of AKT, a downstream target of PI3K. Furthermore, we show that GDC-0941 attenuates the migratory capacity of medulloblastoma cells and targets subpopulations expressing the stem cell marker CD133. GDC-0941 also synergizes with the standard medulloblastoma chemotherapeutic etoposide. In an orthotopic xenograft model of the most aggressive human medulloblastoma variant we document that oral administration of GDC-0941 impairs tumor growth and significantly prolongs survival. These findings provide a rationale to further investigate GDC-0941 alone and in combination with standard chemotherapeutics for medulloblastoma treatment.

INTRODUCTION

Medulloblastoma is the most common malignant brain tumor in children. Current medulloblastoma therapy comprises surgery, chemotherapy and radiotherapy in older children. Despite remarkably advances over the past decades, long-term survival still range from 40% to 70% [1]. Moreover, survivors often suffer from long-term treatment related neurological sequelae [2]. Thus novel more specific therapies are urgently needed.

Medulloblastoma can be divided into 5 histological and at least four biological subgroups – WNT, SHH, group 3 and group 4 - with distinct cellular origins, genetic changes, gene-expression -methylation profiles as well as clinical

course [3, 4]. In cancerogenesis the Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT signalling pathway has been identified as a key driver of cellular proliferation, migration and angiogenesis. This also pertains to human medulloblastoma in which activation of PI3K/AKT signaling has been linked to enhanced tumor growth, metastasis and chemoresistance [5–7]. Indeed, we and others have previously shown that primary medulloblastoma of different genetic variants display high levels of AKT phosphorylation [5–7]. Also PTEN, a negative regulator of the PI3K/AKT pathway, is frequently downregulated by promoter hypermethylation and/or allelic losses of the chromosomal region 10q23 [5]. As a target for cancer therapy PI3K/AKT is of particular interest as it serves as an integration node in a network of tumor-promoting signalling pathways including receptor tyrosine kinases.

In medulloblastoma, increased copy number of the platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFR α) and overexpression of the epidermal growth factor receptor (EGFR) are associated with poor outcome [8] [9]. Also, inhibition of tyrosine receptor-activation suppresses cancer-promoting functions *in vitro* and *in vivo* [10] [11].

In spite of the pivotal role of PI3K/AKT in human medulloblastoma, a xenograft model delineating *in vivo* the anti-proliferative and pro-apoptotic effects of PI3K inhibition is currently lacking. This is in part due to the fact that first generation PI3K inhibitors such as wortmannin, LY294002 and PIK-75 are encumbered by high *in vivo* toxicity, and broad off-target activity. [12–17]. Thus until recently, efforts to further validate PI3K inhibition for treatment of medulloblastoma have been thwarted by lack of pharmaceutical inhibitors suitable for patient use. Taking advantage of the novel, highly specific, clinical grade Pan-PI3K inhibitor GDC-0941 [18], we confirm that PI3K/AKT signalling is indeed a critical target for anti-cancer therapy in human medulloblastoma. In adult cancer GDC-0941 has been well-tolerated and exhibited promising anti-neoplastic activity in phase I/Ib trials of ovarian breast, non small cell lung cancer and multiple myeloma [19–22].

Here we present first evidence that in human medulloblastoma, GDC-0941 inhibits proliferation, induces apoptosis and acts synergistic with etoposide in suppressing medulloblastoma cell viability. Moreover, GDC-0941-mediated PI3K-inhibition reduces the clonogenicity of medulloblastoma cells and leads to significant reduction of CD133 expressing stem cell-like

medulloblastoma subpopulations. Most importantly we demonstrate that in an orthotopic xenograft model of the most aggressive *c-myc*-amplified human medulloblastoma variant GDC-0941 administration result in tumor growth delay and survival benefit underscoring the potential of PI3K-inhibition for medulloblastoma therapy.

RESULTS

To analyse the potential of GDC-0941 in pediatric medulloblastoma cell lines we have used a panel of human medulloblastoma cell lines of which MEB-Med-8A, D283 Med, D341 exhibit distinct characteristics of the clinically most aggressive genetic group 3 variant. The fourth cell line Daoy is derived from TP53-mutated desmoplastic medulloblastoma and displaying markers of SHH-group tumors [23–30].

GDC-0941 treatment leads to profound reduction of cell viability

In a dose-response study the cytotoxic capacity of the PI3K inhibitor GDC-0941 was evaluated in the medulloblastoma cell lines by MTS assay at 48 h under standard growth conditions (Figure 1). The vehicle DMSO served as control. The dose range chosen for *in vitro* and *in vivo* studies was based on pharmacokinetic data available from phase I/II studies as detailed in the discussion. At GDC-concentrations corresponding to patient plasma levels (1–2 μ M) cell viability was substantially reduced in

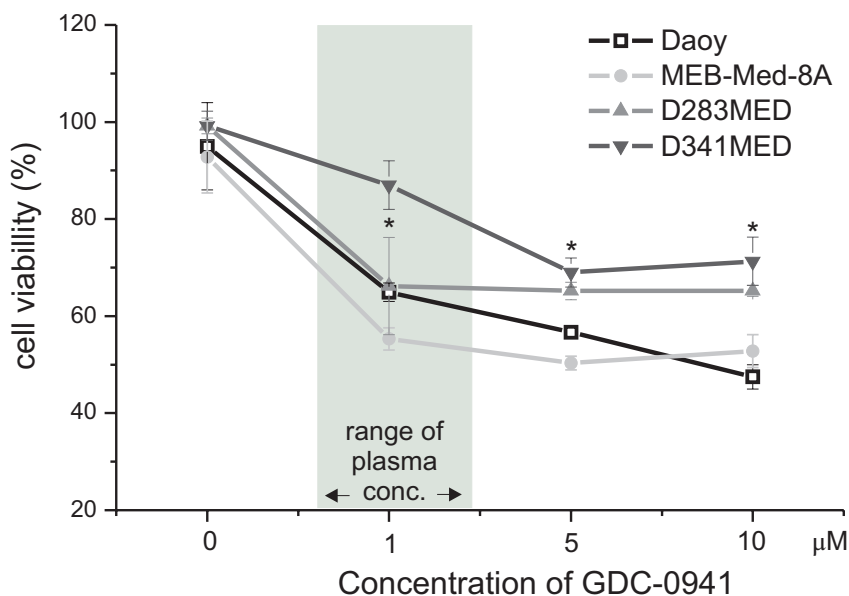


Figure 1: GDC-0941 treatment leads to a dose-dependent reduction of medulloblastoma cell viability. GDC-0941 decreased the cell viability of the established medulloblastoma cell lines MEB-Med-8A, D283 Med, Daoy and D341 Med. The cell lines were treated with increasing concentrations of GDC-0941. Area shaded in gray indicates the range of GDC-0941 concentration detected in patient's levels. The vehicle DMSO served as control. After 48 h of drug exposure the cell viability was assessed by means of the MTS assay. Data points below asterisks differ significantly ($*p < 0.05$) from the control. Each experiment was performed in triplicates and repeated four times.

three of four medulloblastoma cell lines, namely to $64.9\% \pm 1.9\%$ in Daoy, $55.3 \pm 2.3\%$ in MEB-Med-8A and $66.2\% \pm 10\%$ D283 Med with a negligible accentuation of the observed inhibitory effect in the presence of a ten fold higher GDC-0941 dose. In contrast at $1 \mu\text{M}$ GDC-0941, D341 Med was largely unaffected with cell viability maintained as high as $89.9 \pm 4.5\%$. Yet, when escalating the drug dose by a log, a decrease in cell viability to $71.3 \pm 5.0\%$ was achieved.

GDC-0941 displays anti-proliferative and pro-apoptotic effects in medulloblastoma cells

With the intent to further dissect the observed loss in cell viability into anti-proliferative and pro-apoptotic effects, we performed a flow cytometry-based combined

CFSE-7AAD-Annexin-V assay (Figure 2). After 48 h of culture at the clinically relevant concentration of $1 \mu\text{M}$ GDC-0941, cellular growth of MEB-Med-8A and D283 Med cells was significantly reduced with $51.1 \pm 10.4\%$ and $35.6 \pm 5.8\%$ inhibition of proliferation respectively. Daoy cells proved themselves more GDC-resistant with $13.0 \pm 1.47\%$ inhibition of proliferation, while D341 Med cells were essentially unaffected. Escalating the GDC-dose to $10 \mu\text{M}$ enhanced the attenuating effect on proliferation to $34.3 \pm 2.9\%$ in Daoy and $15.7 \pm 9.4\%$ in D341 Med cells. GDC-0941 also induced apoptosis in all four medulloblastoma cell lines at a concentration corresponding to patient plasma levels (Figure 2B). Thus after 48 h at $1 \mu\text{M}$ GDC-0941, $35.5 \pm 9\%$ of MEB-Med-8A and $37.2 \pm 10\%$ of D283 Med cells were apoptotic. In Daoy and D341 cells

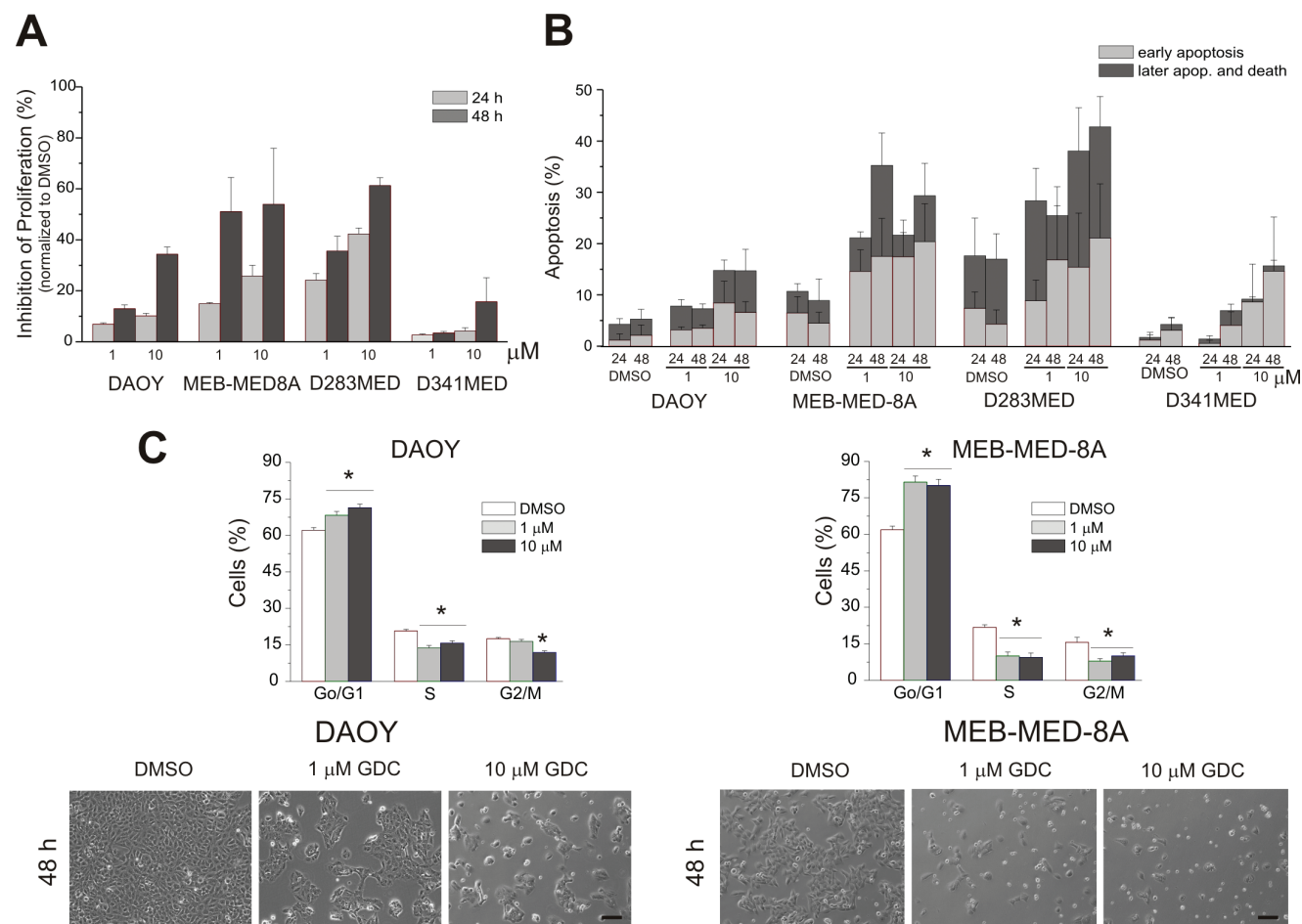


Figure 2: Determination of anti-proliferative and pro-apoptotic effects of GDC-0941 in medulloblastoma cells. In a combined proliferation-apoptosis assay based on a CFSE-7AAD-Annexin-V staining the capacity of GDC-0941 to inhibit proliferation (A) and induce apoptosis (B) in the stated medulloblastoma cell lines was determined. The cells were treated with $1 \mu\text{M}$ and $10 \mu\text{M}$ of GDC-0941 for 24 and 48 h respectively. The vehicle DMSO served as control. In contrast to apoptosis, proliferation inhibition was normalized to the control DMSO. All stated average values for proliferation inhibition and apoptosis induction differed significantly ($p < 0.05$) from the DMSO control except the value for induction of apoptosis at $1 \mu\text{M}$ for the cell line D341 Med. The data represents four independent experiments. (C) upper panel - GDC-0941 induces a G1-phase cell cycle arrest. Daoy and MEB-Med8A cells were exposed to 1 and $10 \mu\text{M}$ of GDC-0941 for 48 h. Subsequently the cell cycle distribution was determined by Hoechst 33342 staining. The vehicle DMSO served as control. The lower panel in Figure 2C visualizes the effect of GDC-0941 on the adherent cell lines Daoy and MEB-Med-8A. Statistically significant differences are marked by an asterisk ($*p < 0.05$). The data shown represents four independent experiments. The reduction in cell density and change in cell morphology is depicted. Scale bar $100 \mu\text{m}$.

apoptosis rates were below 5%, which could be enhanced to $16.7 \pm 9\%$ for Daoy when escalating the drug dose by a log.

Treatment of medulloblastoma with GDC-0941 induces G0/G1-phase cell cycle arrest

PI3K activity is known to be involved in cell cycle progression [31, 32]. Because of their differential response profile to GDC-0941 treatment, MEB-Med-8A and Daoy were chosen to assess cell cycle distribution after 48 h of drug treatment (Figure 2C, upper panel). Here we demonstrate that PI3K inhibition arrests medulloblastoma cells at the G0/G1-Phase checkpoint. (MEB-Med-8A G0/G1-Phase: DMSO $65.7\% \pm 1.9\%$, GDC-0941 $1 \mu\text{M}$ $86.2\% \pm 1.1\%$; Daoy G0/G1-Phase: DMSO $64.4\% \pm 0.9\%$, $1 \mu\text{M}$ $73.8\% \pm 1.4\%$).

The anti-proliferative and pro-apoptotic effects of GDC-0941 are associated with inhibition of the PI3K/AKT pathway

Expression and constitutive activation of AKT, a downstream target of the PI3K has been delineated in primary medulloblastoma tumour samples [5–7]. In accordance with these findings, we show that the four investigated medulloblastoma cell lines were phosphorylated at the catalytic sites T308 and S473 of AKT (Figure 3). Of note, treatment with $1 \mu\text{M}$ GDC-0941 led to marked reduction of AKT^{T308/S473} phosphorylation in all four medulloblastoma cell lines as early as 1 hour after drug exposure. Indeed AKT-phosphorylation was even completely abrogated in D341 Med cells. Yet, only in the three medulloblastoma lines MEB-Med-8A and D283 Med and Daoy most responsive to GDC-mediated cytotoxic effects, AKT protein synthesis itself was compromised in addition to impaired phosphorylation.

Aberrant activation of the transcription factor STAT3 is considered critical for medulloblastoma pathogenesis. In keeping with these findings the four investigated medulloblastoma cell lines display phosphorylation of Tyr705 of STAT3 (Figure 3). A crosstalk between the PI3K/AKT pathway and STAT3 signaling network has recently been suggested [33] and indeed MEB-Med-8A exhibit a reduction of STAT3 phosphorylation and STAT3 protein levels upon GDC-0941 treatment, while in the other medulloblastoma cell lines this interaction was not observed.

GDC-0941 treatment inhibits medulloblastoma cell migration

Next we determined the potential of GDC-0941 to inhibit tumour cell mobility in a standard scratch wound assay (Figure 4). We chose the cell lines Daoy and MEB-Med-8A because of their known migratory properties. At $1 \mu\text{M}$ GDC-0941 inhibited cellular migration with $137 \pm 63 \mu\text{m}$ in comparison to $456 \pm 100 \mu\text{m}$ in the Daoy control. MEB-Med-8A although characterized by slower migratory capacity still exhibits a significant difference in migration of $11 \pm 4 \mu\text{m}$ at 24 h of drug exposure in comparison to $75 \pm 1 \mu\text{m}$ in the respective control. Escalating the dose 10 times did not lead to a further reduction of the migratory potential neither in Daoy nor in MEB-Med-8A cells.

GDC-0941 reduces the clonogenicity of medulloblastoma cell lines

We also analyzed the capability of GDC-0941 to interfere with clonogenicity of the adherent medulloblastoma cell lines MEB-Med-8A and Daoy (Figure 5). Treatment of MEB-Med-8A with $1 \mu\text{M}$

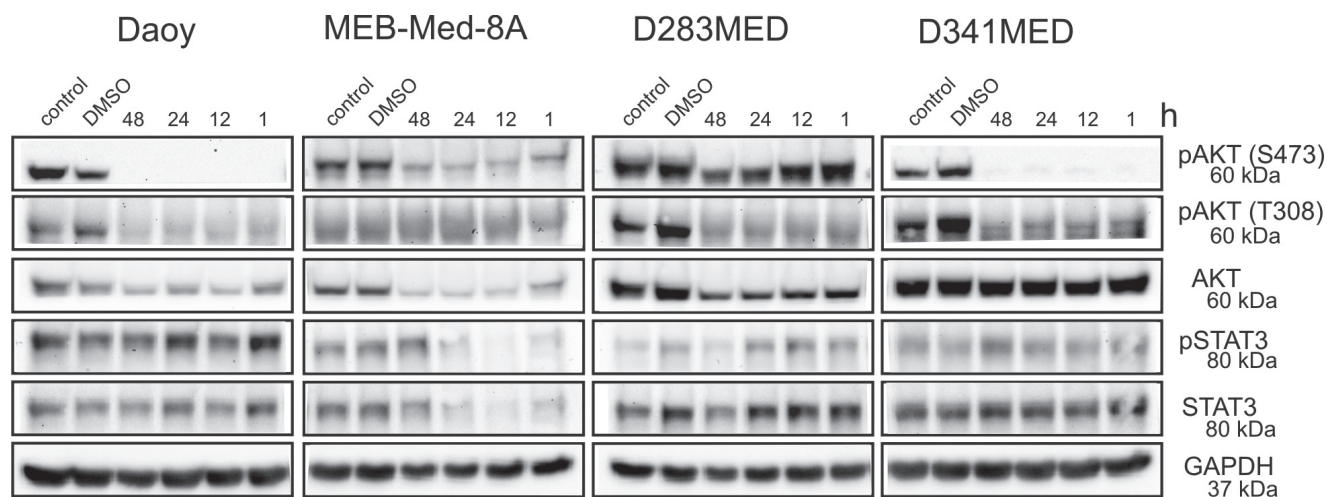


Figure 3: The anti-proliferative and pro-apoptotic effects of GDC-0941 are associated with a reduction of AKT phosphorylation. Daoy, MEB-Med-8A, D283 Med and D341 Med cells were treated with $1 \mu\text{M}$ of GDC-0941 for 1, 12, 24 and 48 h. Total protein levels and the phosphorylation status of AKT^{T308/S473} and STAT3^{Y705} were determined by Western blot. GAPDH served as loading control.

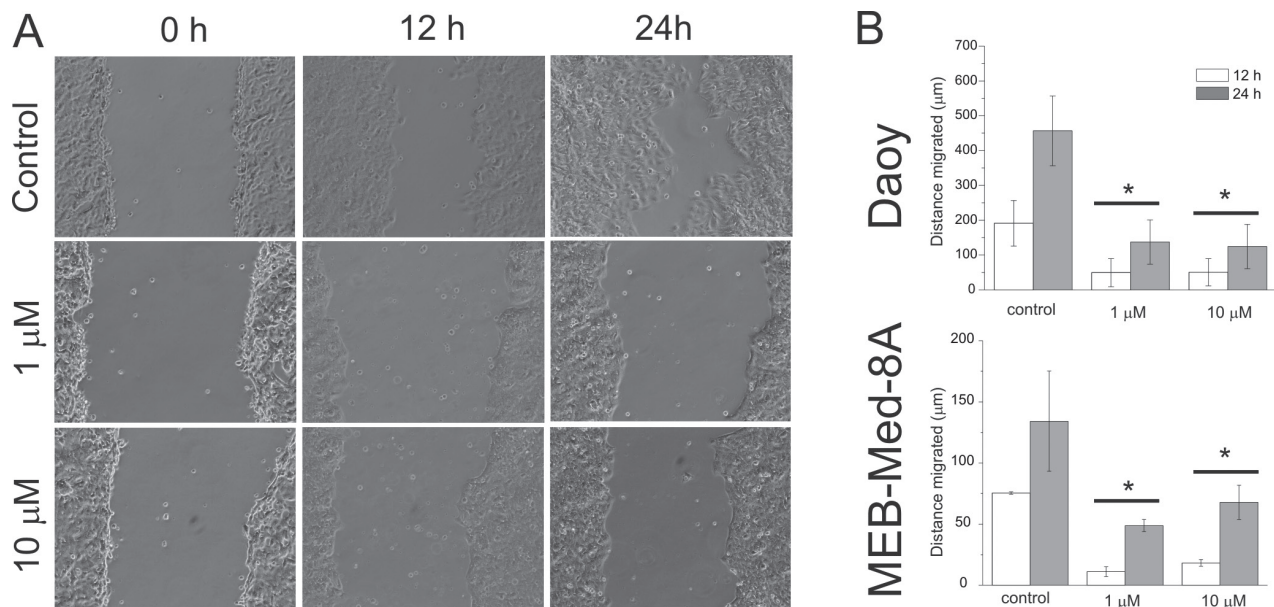


Figure 4: GDC-0941 inhibits medulloblastoma cell migration. After a single scratch was made in a confluent monolayer of Daoy and MEB-Med-8A cells, these were exposed to 1 and 10 μM of GDC-0941. Each scratch was photographed after 12 and 24 h and the width of the scratch was determined. (A) schematic representation of Daoy cells (B) analysis of both cell lines. Statistically significant differences are marked by an asterisk ($*p < 0.05$). The data shown represent five independent experiments.

GDC-0941 resulted in a reduction of colony numbers (NC: 41 ± 10) and colony size (ACS: $61 \pm 9p^2$) in comparison to control (NC: 60 ± 5 ; ACS: $104 \pm 12p^2$). Also in Daoy, the colony size ($155 \pm 27p^2$) was significantly smaller than in the control ($358 \pm 55p^2$) whilst colony numbers were maintained (113 ± 6 vs 126 ± 10). Escalating the concentration of GDC-0941 to 10 μM enhanced the described effects on colony number and size in both cell lines (MEB-Med-8A: NC: 18 ± 4 , ACS: $52 \pm 8p^2$; Daoy: NC: 42 ± 4 , ACS: $40 \pm 5p^2$).

GDC-0941 delays medulloblastoma growth and prolongs survival in an orthotopic medulloblastoma xenograft model

To assess *in vivo* efficacy of GDC-0941, an orthotopic medulloblastoma model was established (Figure 6). To this end 2×10^4 lentivirally transduced MEB-Med-8A cells stably expressing luciferase were injected into the cerebellum of immunocompromised mice resulting in reliable tumor formation as early as one week post transplantation. Animals with established tumors received 100 mg/kg GDC-0941 or the pharmaceutical vehicle once daily. Tumor growth was monitored by bioluminescence, and mice were taken from the experiment when clinical impairment due to tumor progression was observed. Animals treated with GDC-0941 displayed delayed tumor growth that resulted in significantly longer survival (26.5 days; median) compared to control animals (23.5 days).

DISCUSSION

Medulloblastoma is the most common malignant pediatric brain tumor that is often resistant to standard therapy. Therefore novel treatment approaches intercepting critical regulatory pathways in cancer development and progression are warranted. Here we present first *in vitro* and *in vivo* evidence that the clinically available pan-PI3K inhibitor GDC-0941 displays potent anti-neoplastic activity in medulloblastoma and commends itself as a possible adjunct to current medulloblastoma treatment.

Indeed in an orthotopic murine model of pre-established human medulloblastoma, treatment with GDC-0941 results in significant survival benefit. Humanized orthotopic models are key to evaluate tumor growth and drug efficacy in the context of a tumor-specific micro-environment. This is particularly true in brain tumors in which biodistribution of the drug is of additional interest. Thus to allow for recovery of the blood barrier, we delayed GDC-treatment for 1 week after medulloblastoma-installation. Such “tumor growth delay” studies also mimic the clinical situation of pre-established tumors more adequately and are of stronger evidence in drug testing than less stringent “tumor inhibition” studies based on concomitant tumor and drug inoculation. [34]. Still we observed significant impairment of tumor-growth after two weeks of GDC-therapy and provide first proof that treatment with the pan PI3K-inhibitor GDC-0941 shows anti-neoplastic efficacy in an orthotopic humanized medulloblastoma model even at a relatively low GDC-dose compared to reports in other tumors [35]. For *in vivo*

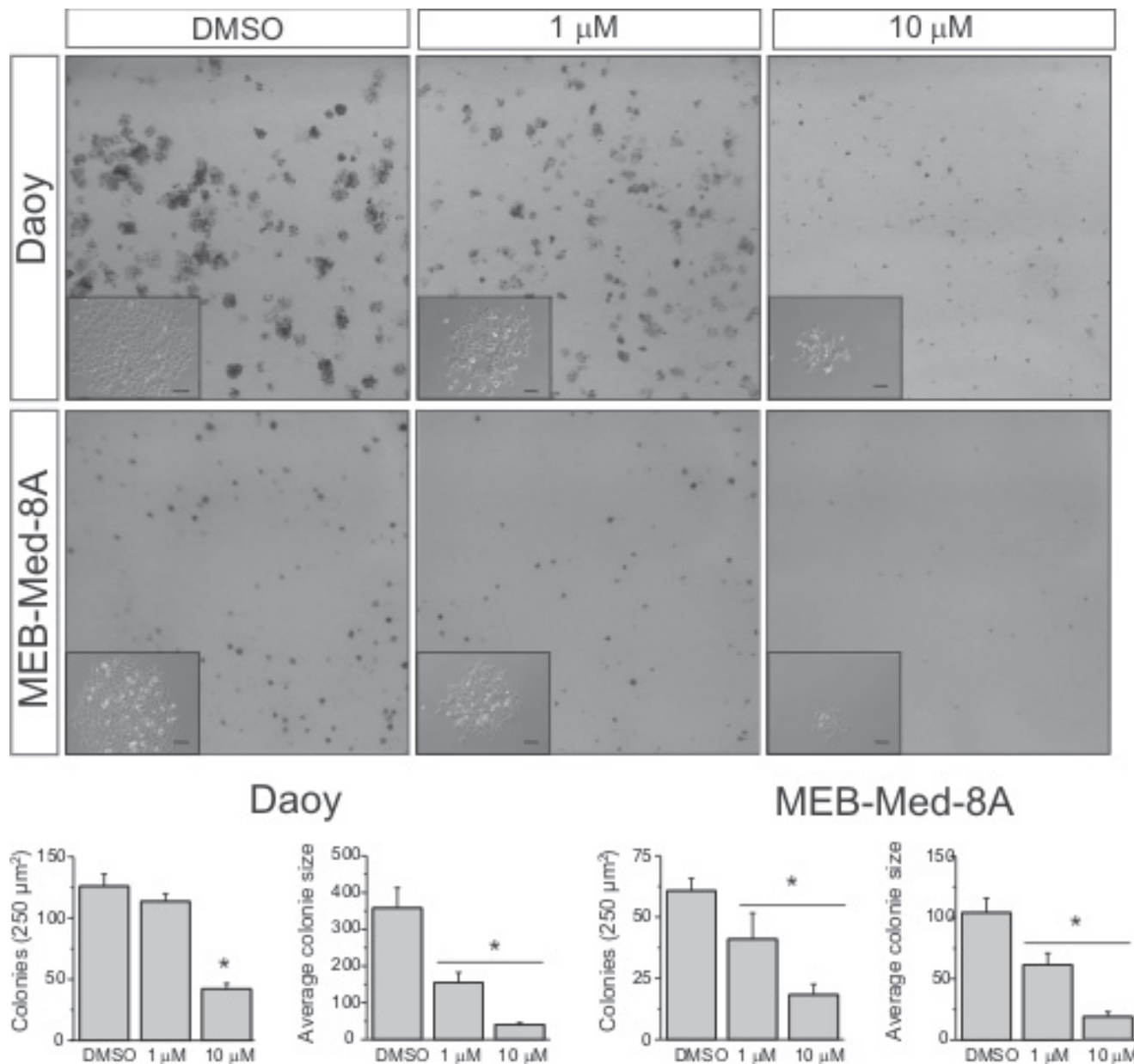


Figure 5: GDC-0941 impairs colony formation of medulloblastoma cells. Daoy and MEB-Med-8A cells were exposed to 1 and 10 μM of GDC-0941 for 48 h. Subsequently the cells were maintained in standard growth medium for 6 days, colony formation and colony size were assessed. Statistically significant differences are marked by an asterisk ($*p < 0.05$). The data shown represent five independent experiments.

assessment of GDC-0941 efficacy we chose MEB-Med-8A, a patient-derived human medulloblastoma line that based on its molecular and genetic characteristics corresponds to the most aggressive medulloblastoma group 3, which is characterized by *c-myc* amplification and isochromosome 17. MEB-Med-8A derived tumors also mimic the clinical presentation of this medulloblastoma variant by rapid and invasive growth that leads to animal death within 2–3 weeks [23, 30]. Despite aggressive tumor growth inside the spatially confined fossa cranii posterior housing cerebellum and brainstem, which control coordination of movement, balance, equilibrium and critical vital

functions, oral administration of 100 mg/kg GDC-0941 corresponding to intermediate doses applied to patients in phase Ib studies [19, 20] resulted in suppressed medulloblastoma growth and significantly prolonged the survival of treated animals. Yet, for critical appraisal of delayed tumor progression after oral application of PI3K inhibitors, one also needs to consider anti-angiogenic activity as one of the potential underlying mechanisms. Further studies are clearly warranted to dissect the *in vivo* effects of GDC-0941 treatment on PI3K-activity or its downstream elements in the tumormass itself versus the microtumorenvironment.

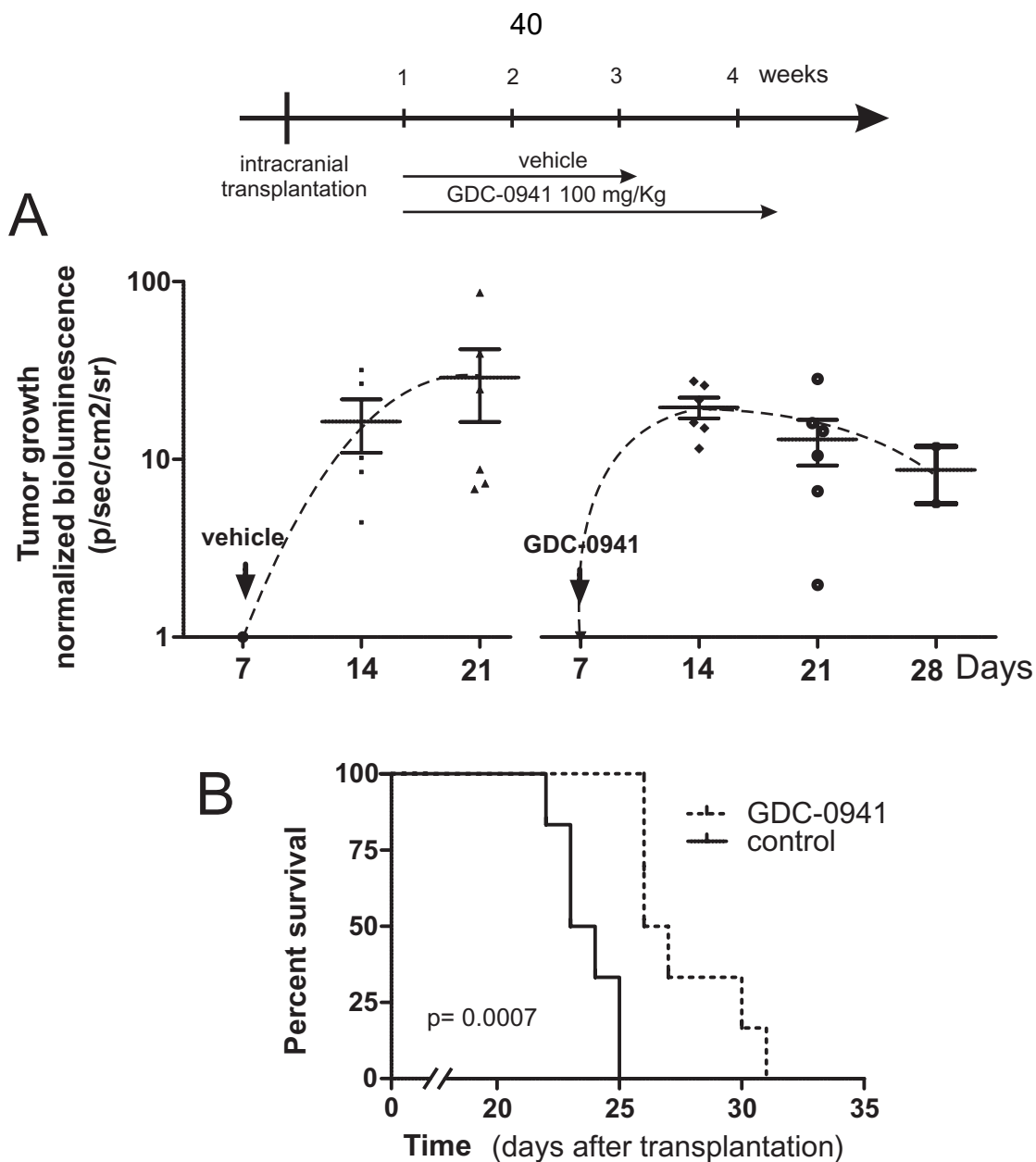


Figure 6: GDC-0941 inhibits tumour growth *in vivo* and prolongs the event-free survival of mice bearing intracranial medulloblastomas. In an orthotopic xenograft mouse model we analyzed whether GDC-0941 could inhibit medulloblastoma growth *in vivo*. For this purpose 2×10^4 MEB-Med-8A cells were transplanted into the cerebellum. The mice analyzed for tumor growth by bioluminescent imaging at 1, 2, 3 and 4 weeks. One week after transplantation mice were treated with 100mg/kg of GDC-0941 once daily until symptoms occurred. (A) depicts the normalized tumor growth delay while (B) shows the survival of treated and untreated animals via Kaplan-Meier plot. GDC-0941 treatment prolonged the symptom-free survival of medulloblastoma bearing mice significantly. The data shown represent six independent experiments.

Nonetheless, in our extensive *in vitro* analysis we authenticate that exposure to $1 \mu\text{M}$ GDC-0941 corresponding to patient plasma levels significantly diminishes viable cell numbers in three of four medulloblastoma lines to 50–65%. Only in D341 previously shown to be resistant to selected cytotoxic drugs $5 \mu\text{M}$ GDC-0941 were required to achieve this level of suppression [36, 37]. We based our choice of *in vitro* drug concentrations on the original publication characterizing GDC-0941 as a potent and selective inhibitor of class I PI3K kinase. In solid tumor

cell lines including glioblastoma, cell proliferation was inhibited at IC₅₀s of 0.28–0.95 μM [18] which corresponds to the reported GDC-0941 plasma levels in clinical phase I studies [19, 20]. In these dose escalation trials in patients with solid tumors, single doses of 15 to 600 mg GDC-0941 were applied. Plasma levels at doses not associated with grade 3/4 toxicities ranged from 1–10 μM during the first 12 h. Our *in vitro* assessment reveals that GDC-0941 exerts its profound cytotoxic activity against medulloblastoma at concentrations within the reported patients' plasma

range with little additional efficacy upon dose increase even by a log.

Of note, at these dose levels GDC-0941 also sensitizes medulloblastoma lines to etoposide resulting in synergistic impairment of cell viability (Supplementary Figure 1). Moreover, GDC-0941 also compromises the clonogenicity of medulloblastoma cells and targets CD133-positive stem cell-like medulloblastoma subpopulations (Supplementary Figure 2). Further dissection of the anti-neoplastic activity revealed that GDC-0941 not only arrests the proliferation of medulloblastoma cell lines in G0/G1 phase but also induces marked cell death. Beyond these anti-proliferative and pro-apoptotic effects GDC-0941 inhibits medulloblastoma cell migration a pre-requirement for invasion and metastasis. Our results corroborate most recent findings indicating that beyond *c-myc*-amplified medulloblastoma, PI3K inhibition also synergizes with hedgehog pathway inhibition and restrains the growth of SHH-group tumors in a murine allograft medulloblastoma model [27, 38]. Therefore we hypothesize that loss of PTEN or activation of AKT could potentially serve as a future biomarker for the incorporation of GDC-0941 into the standard treatment regimes for pediatric medulloblastoma.

For validation of GDC-capacity to inhibit the PI3K/AKT signaling pathway, the phosphorylation status of the most prominent PI3K downstream signaling molecule, AKT, was selected as a valid marker for PI3K activity [14]. In line with previous reports documenting high activity of the PI3K/AKT pathway in primary medulloblastoma, our data document AKT expression and phosphorylation of the sites T308 and S473 respectively in all four medulloblastoma cell lines analyzed [5–7]. Phosphorylation of these two sites regulates AKT activity and is critical for the oncogenic potency of the protein [39, 40]. In our experiments GDC-mediated anti-neoplastic effects were associated with a reduction in AKT phosphorylation in all investigated cell lines. Thus, in medulloblastoma we delineate the capacity of GDC-0941 to inhibit intracellular signal transduction cascades and underscore the current concept that PI3K/AKT signaling plays a key role in medulloblastoma proliferation, survival and migration [5–7]. Furthermore, prolonged exposure to the PI3K-inhibitor revealed that apart from posttranslational modifications such as reduced AKT phosphorylation, AKT protein levels were suppressed in the highly GDC-0941-sensitive cell lines, Daoy, MEB-Med-8A and D283 Med. This observation is in line with the role of AKT as a main regulator of protein expression via the mTOR signaling complex and might explain the higher susceptibility of these cell lines compared to D341 Med [41, 42].

In various cancer entities including medulloblastoma, the transcription factor STAT3 as downstream target of various receptor tyrosine kinases has been implicated in the regulation of cellular programs including cell-cycle progression, apoptosis, tumour angiogenesis and tumour-

cell evasion of the immune system [43–47]. In accordance with these findings the four tested medulloblastoma cell lines are characterized by high STAT3 protein expression and marked phosphorylation of tyrosine 705. Recent proteomic data uncovered a crosstalk of the PI3K pathway and the STAT3 signalling network and ascribed STAT3 a key role in PI3K-driven oncogenic transformation [33]. Here we show that this interaction might also be of relevance in some medulloblastoma. Indeed in MEB-Meb-8A, the most susceptible cell line to GDC-0941-mediated cytotoxicity, PI3K-inhibition led to concomitant loss of STAT3 expression and phosphorylation. In view of future clinical application however, it is noteworthy that in the three other cell lines, STAT3 phosphorylation seems to be independent of PI3K signalling. Thus, targeting PI3K in combination with pathways signalling via STAT3 might enhance the anti-neoplastic activity and prove therapeutical interest. Yet, whether PI3K/STAT3 crosstalk is a common event in medulloblastoma needs to be further elucidated.

In summary, we showed that inhibition of the PI3K signaling cascade by GDC-0941 inhibits medulloblastoma proliferation profoundly, induces significant cell death at concentrations corresponding to patient plasma levels and synergizes with a standard chemotherapeutic applied in pediatric medulloblastoma. Moreover, GDC-0941 reduces CD133-positive stem cell-like subpopulations and compromises the clonogenicity of medulloblastoma cells. Beyond the anti-proliferative and pro-apoptotic effects, GDC-0941 displays marked inhibition of medulloblastoma cell migration, a pre-requisite for tumor invasion. Most importantly, oral administration of GDC-0941 delays tumor growth and promotes survival in an orthotopic model of the most aggressive human medulloblastoma variant characterized by *c-myc* amplification. Yet, we hypothesize that benefit of PI3K-inhibitor treatment is not restricted to *c-myc*-amplified medulloblastoma. WNT-, SHH- or group 4 tumors that lack *c-myc* amplification but display PI3K/AKT pathway activation might as well benefit from PI3K inhibition. Thus our data provide a rationale to further evaluate GDC-0941 in combination with standard chemotherapy for the treatment of medulloblastoma.

MATERIAL AND METHODS

Reagents and antibodies

GDC-0941 was obtained from LC Laboratories, while etoposide (VP16) and Hoechst were provided by Sigma. Primary antibodies - pSTAT3 (Tyr705, D3A7), STAT3 (124H6), pAKT (Thr308, 244F9), pAKT (Ser473), AKT (11E7) and GAPDH were purchased from Cell Signalling while secondary antibodies were purchased from Dianova. Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE) was obtained from Invitrogen, D-Luciferin sodium salt was purchased from PJK.

Animals

Immunocompromised (NOD/SCID IL2R γ ^{Null} (NSG) mice were obtained from Charles Rivers.

Cell culture

The human medulloblastoma cell lines Daoy (HTB 186), D283 Med (HTB185) and D341 Med (HTB-187) were obtained from American Type Culture Collection. The medulloblastoma cell line MEB-Med-8A was generated by us from a large cell medulloblastoma (TP). The medulloblastoma cell lines Daoy, D283 Med and MEB-Med-8A were maintained in complete medium, namely Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen) with L-glutamine supplemented with 1 mM sodium pyruvate (PAA), 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen) and 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen). The medulloblastoma cell line D341 Med was maintained in DMEM with L-glutamine supplemented with 1mM sodium pyruvate, 1% penicillin/streptomycin and 10% human serum (PAA).

Cell viability assay

Cell viability was assessed with CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell proliferation Assay (Promega) which contains 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS). To ensure a linear growth curve over 48 h for assessment of GDC-0941 inhibitor mediated effects, each well of 96-well plates was seeded with 2.5x10³ Daoy, 6x10³ MEB-Med-8A, 10⁴ D283 Med and 10⁴ D341 Med cells, respectively. After overnight culture in complete medium, the cells were treated with increasing GDC-0941 concentrations. The vehicle dimethylsulfoxide (DMSO) served as control. After 48 h MTS was added according to the supplier's protocol and the absorbance was measured at 490 nm using an ELISA plate reader (Victor² Wallac, Perkin Elmer). Cell viability was calculated in percent of control.

Combined cell proliferation and apoptosis assay

Medulloblastoma cells were stained with CFSE according to the supplier's instructions. Daoy (3x10⁵/6 well), MEB-Med-8A (5x10⁵/well), D283 Med (5x10⁵/well) and D341 Med (5x10⁵/well) cells were seeded in 6-well cell culture dishes in complete medium. After overnight culture, the cells were treated with different concentrations of GDC-0941 for a 24 and 48 h period. Thereafter floating and attached cells were collected and stained with 7-AAD and Annexin V antibodies (Annexin V-PE detection kit I, BD Bioscience) and analysed by flow cytometry (Navios, Beckman Coulter). Proliferation was traced by CFSE staining and apoptosis was detected by combined 7AAD/Annexin V staining and calculated in percent of control.

Cell migration assay

The *in vitro* scratch assay was performed as described by Liang et al. [48]. Briefly, Daoy (5x10⁵/6 well) cells were plated in 12-well cell culture dishes. The cells were 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. The debris was removed and the cells were then incubated with different concentrations of GDC-0941. The vehicle DMSO served as control. After 12 and 24 h of treatment, migration of cells into the scratch was photographed at 10x magnification (Eclipse TiS inverted microscope attached to a CCD monochrome camera DS 2M, Nikon). The distance of migration was analyzed by means of NIS-Elements Imaging Software (Nikon).

Cell cycle assay

Daoy (2x10⁵/6 well) and MEB-Med-8A (3x10⁵ / well) cells respectively were plated in 6-well cell culture dishes. After 48 h of treatment with GDC-0941 the cells were exposed to 16 nM Hoechst 33342 and incubated for 45min at 37°C. Both floating and attached cells were harvested and analyzed by flow cytometry (Navios, Beckman Coulter). Dead cells were stained by propidium iodide. After gating on live cells, single cells were gated using width and area parameters from Hoechst 33342. The area parameter histogram was used to determine the percentage of cells in G₁, S and G₂M phases.

Immunoblotting analysis

Medulloblastoma cell lines were lysed in RIPA buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Roche). Subsequently 25 μ g of protein were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes (BioRad). The membranes were blocked for 1 h at RT in Tris-buffered saline containing 0.1% tween-20 (TBST) supplemented with 5% BSA. Thereafter, the membranes were incubated with the primary antibodies (1/1000) overnight at 4°C and subsequently with the respective secondary antibody (1/10000) for 1 h at room temperature. Immunoreactivity was detected by chemiluminescence and quantified by means of a ChemiDoc XRS Imaging System (Bio-Rad).

Colony formation assay

The cell lines Daoy (200 cells/6 well) and MEB-Med-8A (1000 cells/6 well) were plated in six well cell culture dishes. The cells were allowed to adhere and were incubated for 12 h at 37°C. Thereafter the cells were exposed to 1 and 10 μ M of GDC-0941 respectively. After 48 h the cells were washed with standard medium to remove the inhibitor and cultured for another week. Colony numbers and colony size were assessed by

IMAGEJ. Particles smaller than 20 pixel² were excluded from the analysis since these represented mainly staining artefacts, cell detritus or non-proliferating single cells.

Lentiviral particles and stable cell lines

Lentiviral particles were generated by co-transfection of HEK293T Lenti-X cells (Clontech) with packaging plasmids (pMD2.G, pMDLg/pRRE, pRSV-REV, Addgen) and the lentiviral transfer vector (pLenti-III-UbC-Luc2, Applied Biological Materials Inc.) expressing Luciferase 2. After 48 and 72 hours the supernatants were pooled, filtered through a 45 µm filter and ultracentrifuged at 87076 g 4°C for 2 h. The virus titers were determined by HIV p24 antigen test (Elecsys, Roche Diagnostics). MEB-Med-8A cells were transduced with virus particles (MOI 5) and thereafter selected with puromycin and validated for homogenous luciferase activity (Invitrogen).

Orthotopic transplantation and tumor formation

Immunocompromised NSG mice were used for transplantation. The animals were bred and housed in a specific pathogen-free animal facility at the house for experimental therapy of the University of Bonn. All experiments were conducted according to protocols approved by the institutional animal use and care committee of Northrhine Westphalia (Germany). To establish intracranial tumors, medulloblastoma cells were resuspended in PBS and injected perpendicular to the cranial surface via 5 µL pst2 Hamilton 7105N syringe into the right cerebellar hemisphere (1 mm to the right of the midline, 1 mm posterior to the coronal suture, and 3 mm deep) of 5–9 week old anesthetized NSG mice. fixed in a stereotaxic frame. After transplantation the animals were monitored daily and sacrificed when symptoms of tumor growth occurred. All procedures were in strict accordance with the University of Bonn Medical Center Policy on the Use and Care of Laboratory Animals (University of Bonn Medical Center Policy and Welfare Committee, Document ID: 87-51.04.2011.A033).

In vivo bioluminescent imaging

For the bioluminescent imaging the mice were anesthetized by ketamine/xylazine. injected intraperitoneally with 125 mg/kg D-luciferin. 15 min after injection the animals were imaged using a IVIS 200 imaging station (Caliper Life Sciences). Regions of interest were defined using living image software, and the total photons/s/sr/cm² (photons per second per steradian per square cm) were recorded weekly to monitor tumor growth and therapy response. To determine the growth rate of the tumor the gain in bioluminescence per week was calculated.

In vivo inhibitor treatment

To study effects of the PI3K inhibitor GDC-0941 on tumor growth *in vivo* we transplanted 2 x 10⁴ MEB-Med-8A cells into the cerebellum of NSG mice. Seven days after transplantation the mice were randomly separated into two groups. Group 1 was given the vehicle EL-ethanol (60:40; cremophor EL, 95% ethyl alcohol, Sigma) while group 2 was exposed to 100 mg/kg GDC-0941. The drug was administered once daily by oral gauge. Event-free survival was defined as the time from transplantation until symptom onset.

Statistical analysis

The two-sided Student's *t* test was applied to determine statistically significant differences between two groups. For *in vivo* tumor growth and survival the log-rank Test (Mantel-Cox) and Wilcoxon signed rank test respectively were applied to determine statistically significant differences. *p* < 0.05 (*) was considered as statistically significant. The values stated within text and figures are mean ± standard deviation.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the expert technical support of Anne Petruschke and Barbara Goetz. This work was funded by the Medical Center of the University of Bonn.

Ethical standards

The authors declare that the experiments of the present study comply with the current laws of Germany.

Conflict of interest

We certify that there is no conflict of interest with any financial organization regarding the material discussed in the manuscript

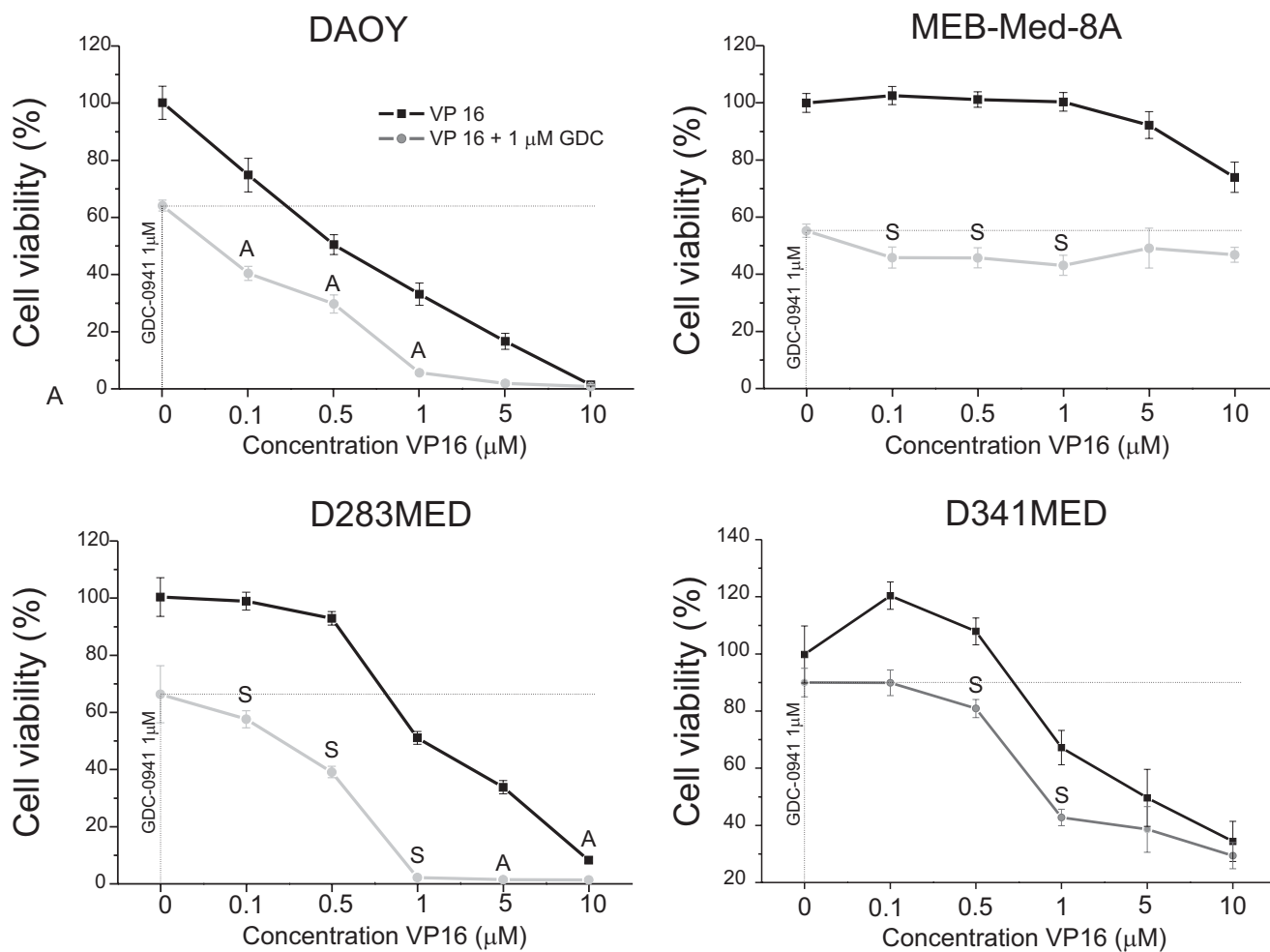
REFERENCES

- Gajjar A, Chintagumpala M, Ashley D, Kellie S, Kun LE, Merchant TE, Woo S, Wheeler G, Ahern V, Krasin MJ, Fouladi M, Broniscer A, Krance R, Hale GA, Stewart CF, Dauser R, et al. Risk-adapted craniospinal radiotherapy followed by high-dose chemotherapy and stem-cell rescue in children with newly diagnosed medulloblastoma : long-term results from a prospective, multicentre trial. *Lancet Oncol.* 2006; 7:813–820.
- Mabbott DJ, Spiegler BJ, Greenberg ML, Rutka JT, Hyder DJ, Bouffet E. Serial evaluation of academic and behavioral

- outcome after treatment with cranial radiation in childhood. *J Clin Oncol*. 2005; 23:2256–2263.
3. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvett A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007; 114:97–109.
 4. Northcott PA, Shih DJ, Peacock J, Garzia L, Sorana Morrissy A, Zichner T, Stutz AM, Korshunov A, Reimand J, Schumacher SE, Beroukhir R, Ellison DW, Marshall CR, Lionel AC, Mack S, Dubuc A, et al. Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes. *Nature*. 2012; 488:49–56.
 5. Hartmann W, Dignon-Sontgerath B, Koch A, Waha A, Endl E, Dani I, Denkhaus D, Goodyer CG, Sorensen 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.
 6. Baryawno N, Sveinbjornsson B, Eksborg S, Chen CS, Kogner P, Johnsen JJ. Small-molecule inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling inhibit Wnt/beta-catenin pathway cross-talk and suppress medulloblastoma growth. *Cancer Res*. 2010; 70:266–276.
 7. Guerreiro AS, Fattet S, Fischer B, Shalaby T, Jackson SP, Schoenwaelder SM, Grotzer MA, Delattre O, Arcaro A. Targeting the PI3K p110alpha isoform inhibits medulloblastoma proliferation, chemoresistance, and migration. *Clin Cancer Res*. 2008; 14:6761–6769.
 8. Blom T, Roselli A, Hayry V, Tynnenen O, Wartiovaara K, Korja M, Nordfors K, Haapasalo H, Nupponen NN. Amplification and overexpression of KIT, PDGFRA, and VEGFR2 in medulloblastomas and primitive neuroectodermal tumors. *J Neurooncol*. 2010; 97:217–224.
 9. Liu W, Zhang S, Zhang L, Cui Q, Wang J, Gui T, Pang Q. A prognostic analysis of pediatric central nervous system small cell tumors: evaluation of EGFR family gene amplification and overexpression. *Diagnostic pathology*. 2014; 9:132.
 10. 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.
 11. 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. *Nature genetics*. 2001; 29:143–152.
 12. Torbett NE, Luna-Moran A, Knight ZA, Houk A, Moasser M, Weiss W, Shokat KM, Stokoe D. A chemical screen in diverse breast cancer cell lines reveals genetic enhancers and suppressors of sensitivity to PI3K isoform-selective inhibition. *Biochem J*. 2008; 415:97–110.
 13. Zheng Z, Amran SI, Thompson PE, Jennings IG. Isoform-selective inhibition of phosphoinositide 3-kinase: identification of a new region of nonconserved amino acids critical for p110alpha inhibition. *Mol Pharmacol*. 2011; 80:657–664.
 14. Ihle NT, Powis G. Inhibitors of phosphatidylinositol-3-kinase in cancer therapy. *Mol Aspects Med*. 2010; 31:135–144.
 15. Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, Kleveland I, Arthur JS, Alessi DR, Cohen P. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J*. 2007; 408:297–315.
 16. Gharbi SI, Zvelebil MJ, Shuttleworth SJ, Hancox T, Saghir N, Timms JF, Waterfield MD. Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. *Biochem J*. 2007; 404:15–21.
 17. Ihle NT, Powis G. Take your PIK: phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors race through the clinic and toward cancer therapy. *Mol Cancer Ther*. 2009; 8:1–9.
 18. Folkes AJ, Ahmadi K, Alderton WK, Alix S, Baker SJ, Box G, Chuckowree IS, Clarke PA, Depledge P, Eccles SA, Friedman LS, Hayes A, Hancox TC, Kugendradas A, Lensun L, Moore P, et al. The identification of 2-(1H-indazol-4-yl)-6-(4-methanesulfonyl-piperazin-1-ylmethyl)-4-morpholin-4-yl-thieno[3,2-d]pyrimidine (GDC-0941) as a potent, selective, orally bioavailable inhibitor of class I PI3 kinase for the treatment of cancer. *Journal of medicinal chemistry*. 2008; 51:5522–5532.
 19. Besse B, Soria J, Gomez-Roca C, Ware JA, Adjei AA, Dy GK, Shankar GR, Brachmann K, Groen HJ. A phase Ib study to evaluate the PI3-kinase inhibitor GDC-0941 with paclitaxel (P) and carboplatin (C), with and without bevacizumab (BEV), in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 29. 2011:3044.
 20. Moreno Garcia, Baird RD, K S, Basu JB, Tunariu N, Blanco M, Cassier PA, Pedersen JV, Puglisi M, Sarker D, Papadatos-Pastos DA, Omlin G, Biondo A, Ware JA, Koeppen H, Levy GG, et al. A phase I study evaluating GDC-0941, an oral phosphoinositide-3 kinase (PI3K) inhibitor, in patients with advanced solid tumors or multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2011; 29:3021.
 21. Von Hoff DD, LoRusso P, Demetri GD, Weiss GJ, Shapiro G, Ramanathan RK, Ware JA, Raja R, Jin J, Levy GG, Mazina KE, Wagner AJ. A phase I dose-escalation study to evaluate GDC-0941, a pan-PI3K inhibitor, administered QD or BID in patients with advanced or metastatic solid tumors. *J Clin Oncol* 29. 2011:3052.
 22. Von Hoff DD, LoRusso P, Tibes R, Shapiro G, Weiss GJ, Ware J, Fredrickson AJ, Mazina KE, Levy GG, Wagner AJ. A first-in-human phase I study to evaluate the pan-PI3K inhibitor GDC-0941 administered QD or BID in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*. 2010; 28:2613.
 23. Calabrese CM, Gaber WM, Kilmar J, Fuller C, Allen M, Gilbertson RJ. Autofluorescent mouse models of human medulloblastoma. *AACR Meeting (Anaheim, California: Proc Amer Assoc Cancer Res)* 2005; pp. 903-c-904

24. Friedman HS, Burger PC, Bigner SH, Trojanowski JQ, Brodeur GM, He XM, Wikstrand CJ, Kurtzberg J, Berens ME, Halperin EC, et al. Phenotypic and genotypic analysis of a human medulloblastoma cell line and transplantable xenograft (D341 Med) demonstrating amplification of *c-myc*. *Am J Pathol*. 1988; 130:472–484.
25. Rosen ST. Clinically relevant resistance in cancer chemotherapy. Kluwer Academic Publishers 2002; 112:202.
26. Bodey BS, Kaiser HE, Siegel SE. Molecular Markers of Brain Tumor Cells. Kluwer Academic Publishers 2004; 176:36.
27. Briggs KJ, Corcoran-Schwartz IM, Zhang W, Harcke T, Devereux WL, Baylin SB, Eberhart CG, Watkins DN. Cooperation between the *Hic1* and *Ptch1* tumor suppressors in medulloblastoma. *Genes Dev*. 2008; 22:770–785.
28. Yokota N, Mainprize TG, Taylor MD, Kohata T, Loreto M, Ueda S, Dura W, Grajkowska W, Kuo JS, Rutka JT. Identification of differentially expressed and developmentally regulated genes in medulloblastoma using suppression subtraction hybridization. *Oncogene*. 2004; 23:3444–3453.
29. Jacobsen PF, Jenkyn DJ, Papadimitriou JM. Establishment of a human medulloblastoma cell line and its heterotransplantation into nude mice. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1985; 44:472–485.
30. Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, Oh EY, Gaber MW, Finklestein D, Allen M, Frank A, Bayazitov IT, Zakharenko SS, Gajjar A, Davidoff A, Gilbertson RJ. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell*. 2007; 11:69–82.
31. Liang J, Slingerland JM. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle*. 2003; 2:339–345.
32. Gong C, Liao H, Wang J, Lin Y, Qi J, Qin L, Tian LQ, Guo FJ. LY294002 induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis of cancer stem-like cells from human osteosarcoma via down-regulation of PI3K activity. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012; 13:3103–3107.
33. Vogt PK, Hart JR. PI3K and STAT3: a new alliance. *Cancer Discov*. 2011; 1:481–486.
34. Teicher BA. Tumor models for efficacy determination. *Mol Cancer Ther*. 2006; 5:2435–2443.
35. Salphati L, Heffron TP, Alicke B, Nishimura M, Barck K, Carano RA, Cheong J, Edgar KA, Greve J, Kharbanda S, Koeppen H, Lau S, Lee LB, Pang J, Plise EG, Pokorny JL, et al. Targeting the PI3K pathway in the brain—efficacy of a PI3K inhibitor optimized to cross the blood-brain barrier. *Clin Cancer Res*. 2012; 18:6239–6248.
36. Bacolod MD, Lin SM, Johnson SP, Bullock NS, Colvin M, Bigner DD, Friedman HS. The gene expression profiles of medulloblastoma cell lines resistant to preactivated cyclophosphamide. *Curr Cancer Drug Targets*. 2008; 8:172–179.
37. Friedman HS, Dolan ME, Pegg AE, Marcelli S, Keir S, Catino JJ, Bigner DD, Schold SC Jr. Activity of temozolomide in the treatment of central nervous system tumor xenografts. *Cancer Res*. 1995; 55:2853–2857.
38. Metcalfe C, Aliche B, Crow A, Lamoureux M, Dijkgraaf GJ, Peale F, Gould SE, de Sauvage FJ. PTEN loss mitigates the response of medulloblastoma to Hedgehog pathway inhibition. *Cancer Res*. 2013; 73:7034–7042.
39. Hart JR, Vogt PK. Phosphorylation of AKT: a mutational analysis. *Oncotarget*. 2011; 2:467–476.
40. Graupera M, Potente M. Regulation of angiogenesis by PI3K signaling networks. *Exp Cell Res*. 2013; 319:1348–1355.
41. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 2007; 129:1261–1274.
42. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*. 2004; 18:1926–1945.
43. Yu H, Jove R. The STATs of cancer—new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4:97–105.
44. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9:798–809.
45. Jackson C, Ruzevick J, Amin AG, Lim M. Potential role for STAT3 inhibitors in glioblastoma. *Neurosurg Clin N Am*. 2012; 23:379–389.
46. Cattaneo E, Magrassi L, De-Fraja C, Conti L, Di Gennaro I, Butti G, Govoni S. Variations in the levels of the JAK/STAT and ShcA proteins in human brain tumors. *Anticancer Res*. 1998; 18:2381–2387.
47. Yang F, Van Meter TE, Buettner R, Hedvat M, Liang W, Kowolik CM, Mepani N, Mirosevich J, Nam S, Chen MY, Tye G, Kirschbaum M, Jove R. Sorafenib inhibits signal transducer and activator of transcription 3 signaling associated with growth arrest and apoptosis of medulloblastomas. *Mol Cancer Ther*. 2008; 7:3519–3526.
48. Liang CC, Park AY, Guan JL. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nat Protoc*. 2007; 2:329–333.

SUPPLEMENTARY FIGURES



Supplementary Figure 1: GDC-0941 synergizes with etoposide a standard chemotherapeutic in pediatric medulloblastoma treatment. MEB-Med-8A, D283 Med, Daoy and D341 Med were treated in combination with increasing concentrations of etoposide (0.5, 1, 5 and 10 μM) and 1 μM of GDC-0941. The vehicle DMSO served as control. Of note, 1–2 μM etoposide corresponds to cerebrospinalfluid levels of etoposide determined in treated patients. After 48 h drug exposure the cell viability was assessed by means of the MTS assay. We determined if GDC-0941 synergizes with etoposide and leads to greater decrease in cell viability than the sum of the compounds individual effects. For the combinational treatment curve “S” indicates synergistic effects, while “A” marks additive effects of the drugs. Each experiment was performed in triplicates and repeated four times.

3. Danksagung

Ich danke der Arbeitsgruppe im allgemeinen und Dr. rer. nat. Craveiro sowie Prof. Dr. med. Dilloo im Speziellen für die konstruktive Zusammenarbeit und Hilfe während dieser Studie. Weiterhin möchte ich meiner Familie für die Unterstützung danken.

4. Publikationsliste

Ehrhardt M, Schmidt-Wolf IG, Sievers E, Frank S, Strehl J, von Lilienfeld-Toal M, Gorschlüter M.

Anti-tumoral capabilities of effector cells after IFN-alpha or CpG-motif treatment of cocultured dendritic cells. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2006. DOI: [10.1007/s00005-006-0048-5](https://doi.org/10.1007/s00005-006-0048-5)

Ehrhardt M, Gorschlüter M, Sager J, Ziske C, Strehl J, Lilienfeld-Toal MV, Schmidt-Wolf IG.

Transfection of human monocyte-derived dendritic cells with CpG oligonucleotides. Immunol Cell Biol, 2005. DOI: 10.1111/j.1440-1711.2005.01328.x

Ehrhardt M

Identification of novel MARK3 substrates and upstream regulators. University of Wales, Bangor North West Cancer Research Fund Institute, 2010.

Ferguson F ,Arozarena I, Ehrhardt M and Wellbrock C

Combination of MEK and SRC inhibition suppresses melanoma cell growth and Invasion. Oncogene, 2013. DOI: [10.1038/onc.2012.25](https://doi.org/10.1038/onc.2012.25)

Ehrhardt M*, Craveiro R*,Holst I, Pietsch T, Dilloo D

In comparative analysis of Multi-Kinase Inhibitors, Pazopanib exhibits promising *in vitro* and *in vivo* efficacy for targeted medulloblastoma therapy Craveiro RB, Ehrhardt M, Holst MI, Pietsch T, Dilloo D. Oncotarget, 2014. DOI: [10.18632/oncotarget.2240](https://doi.org/10.18632/oncotarget.2240)

Ehrhardt M*, Craveiro R*,Holst I, Pietsch T, Dilloo D

The PI3K inhibitor GDC-0941 displays promising *in vitro* and *in vivo* efficacy for medulloblastoma therapy. Oncotarget, 2014. DOI: [10.18632/oncotarget.2742](https://doi.org/10.18632/oncotarget.2742)

Ehrhardt M*, Craveiro R*, Velz J, Olschewski M, Goetz B, Pietsch T, Dilloo D

The anti-neoplastic activity of Vandetanib against high-risk medulloblastoma variants is profoundly enhanced by additional PI3K inhibition. Oncotarget, 2017. DOI: [10.18632/oncotarget.14911](https://doi.org/10.18632/oncotarget.14911)

Ehrhardt M*, Craveiro R*, Velz J, Olschewski M, Casati A, Schönberger S, Pietsch T, Dilloo D

The clinically approved PI3K inhibitor GDC-0941 enhances *in vitro* the anti-neoplastic efficacy of Axitinib against c-myc amplified high-risk medulloblastoma. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2018. DOI: [10.1111/jcmm.13489](https://doi.org/10.1111/jcmm.13489)