

Aus dem
CharitéCentrum für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin
mit Perinatalzentrum und Humangenetik
Klinik für Kinderheilkunde m. S. Onkologie und Hämatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Synergistische Wirkung des BRD4-Inhibitors MK-8628 und PLK1-
Inhibitors Volasertib in vorklinischen Modellen des
Medulloblastoms

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Youjia Han

aus Nishinomiya, Japan

Datum der Promotion: 05. März 2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	- 1 -
Abbildungsverzeichnis	- 2 -
Tabellenverzeichnis	- 2 -
Abkürzungsverzeichnis	- 3 -
1. Abstract auf Englisch und Deutsch	- 5 -
1.1 Abstract (Englisch).....	- 5 -
1.2 Zusammenfassung (Deutsch).....	- 7 -
2. Manteltext	- 9 -
2.1 Darstellung des Forschungsstandes	- 9 -
2.1.1 Medulloblastom und MYC.....	- 9 -
2.1.2 BET und BRD4-Inhibitor.....	- 10 -
2.1.3 Der PLK1-Inhibitor als Kombinationspartner für den BRD4-Inhibitor.....	- 13 -
2.1.4 Fragestellung.....	- 14 -
2.2 Vertiefende Darstellung der Methodik	- 15 -
2.2.1 Auswahl der Zelllinien.....	- 15 -
2.2.2 Analyse von Zellviabilität, Zelltod, Zellproliferation und Zellzyklus.....	- 15 -
2.2.3 Analyse der Expression der BRD4-Targets.....	- 18 -
2.2.4 Genexpressionsanalyse.....	- 21 -
2.2.5 <i>In vivo</i> Behandlung der Xenograft-Mäuse.....	- 22 -
2.2.6 Synergismus.....	- 23 -
2.2.7 Statistische Analyse.....	- 23 -
2.3 Ergebnisse	- 24 -
2.3.1 Monotherapie der Medulloblastom-Zelllinien mit BRD4-Inhibitor MK-8628 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	- 24 -
2.3.2 Kombinationstherapie der Medulloblastom-Zelllinien mit BRD4-Inhibitor MK-8628 und PLK1-Inhibitor Volasertib oder GSK461364A <i>in vitro</i>	- 26 -
2.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	- 27 -
2.4 Weiterführende wissenschaftliche Fragestellungen	- 29 -
2.4.1 Ideale Biomarker für die zukünftige Einführung von BRD4-Inhibitoren in klinischen Versuchen.....	- 29 -
2.4.2 Geeignete pharmakodynamische Marker zur Auswertung der Reaktion des Tumors auf die Behandlung mit BRD4-Inhibitoren auf molekularer Ebene.....	- 29 -
2.4.3 Vergleich von MK-8628 mit BRD4-Inhibitoren der Vorgängergeneration.....	- 30 -
2.4.4 Kombination vom BRD4-Inhibitor mit weiteren Agenzien wie PLK1-Inhibitoren zur effektiveren Behandlung.....	- 30 -
2.4.5 Möglichkeit eines dualen BRD4/PLK1-Inhibitors.....	- 31 -
2.5 Literaturverzeichnis	- 32 -

3.	Eidesstattliche Versicherung	- 37 -
4.	Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen	- 38 -
5.	Auszug aus der Journal Summary List	- 40 -
6.	Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	- 41 -
7.	Lebenslauf	- 60 -
8.	Publikationsliste	- 61 -
9.	Danksagung	- 62 -

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der Interaktion zwischen BRD4 und MYC.....	- 11 -
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der Interaktion zwischen PLK1 und MYC.	- 14 -
Abbildung 3:	Simultane Inhibition von BRD4 und PLK1 durch Kombinationsbehandlung führt zu einer effektiveren Reduktion der MYC-Genexpression sowie der MYC-Proteinstabilität.....	- 28 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Liste der für die Western Blot-Experimente verwendeten Antikörper	- 20 -
-------------------	---	--------

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve (Fläche unter der Kurve)
BCA	Bicinchoninsäure
BET	Bromodomain and extraterminal domain (Bromodomäne und extra-terminale Domäne)
BRD4	Bromodomain containing protein 4 (Bromodomäne enthaltendes Protein 4)
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CCND1	Cyclin D1
CDK1	Cyclin dependent kinase 1 (Cyclin-abhängige Kinase 1)
cDNA	Complementary DNA (komplementäre DNA)
Ct	Threashould cycle (Schwellenwertzyklus)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EdU	Ethynyldeoxyuridin
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GO	Gene Ontology
GOI	Gene of interest (das zu untersuchende Gen)
GSEA	Gene set enrichment analysis
HPRT1	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NMC	NUT midline carcinoma
NUT	Nuclear protein in testis
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PLK1	Polo-like Kinase 1

P-TEFb	Positive transcription elongation factor b
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	RadioImmunoPrecipitation Assay
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT-qPCR	Real-time quantitative polymerase chain reaction (quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion)
SD	Solid dispersion (Feststoffdispersion)
SHH	Sonic Hedgehog
Suppl. Abb.	Ergänzende Abbildung
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween20
WNT	Wingless

1. Abstract auf Englisch und Deutsch

1.1 Abstract (Englisch)

Introduction: Targeted inhibition of epigenetic readers has been extensively studied in recent years. Bromodomain and extraterminal domain (BET) family proteins, especially Bromodomain containing protein 4 (BRD4), are such epigenetic readers, which inhibition is known to effectively repress *MYC* transcription. Such BET inhibition opens possibilities for a targeted treatment of childhood brain cancer with dismal prognosis such as medulloblastoma, the most common malignant brain tumor in children arising from embryonal cerebellar cells. Its *MYC*-dependent high-risk subgroup is the most aggressive form with the worst outcome, to which a more targeted therapeutic strategy is urgently needed to improve survival of patients. MK-8628 is an orally bioavailable small molecule BET-Inhibitor that can effectively inhibit BRD4 and downregulate expression of *MYC*. We assessed its therapeutic efficacy against preclinical models of medulloblastoma *in vitro* and *in vivo*, comparing it with its predecessor BET-Inhibitors. Additionally, inhibition of PLK1, a kinase with *MYC*-protein stabilizing function, is known to be effective in medulloblastoma. We assessed the combination of BRD4 inhibitor with a PLK1 inhibitor *in vitro* for an enhanced anti-medulloblastoma effect through simultaneous targeting of two distinct *MYC*-regulators.

Methods: We assessed the efficacy of MK-8628 against four medulloblastoma cell lines (one *MYC*-amplified, two non-amplified high-*MYC*, and one low-*MYC*) *in vitro* by measuring apoptotic cell death and cell cycle arrest. Disruption of *MYC* expression programs through MK-8628 treatment were assessed with array-based gene expression analysis. MK-8628 was tested *in vivo* in mouse xenograft models of *MYC*-amplified medulloblastoma for its efficacy in tumor volume reduction and survival prolongation, followed by immunohistochemical analysis of tumor tissue. Combination treatment of MK-8628 with a PLK1 inhibitor Volasertib or GSK461364A was assessed by measuring established synergy scores.

Results: Treatment with MK-8628 lead to significant cell death and to cell cycle arrest in medulloblastoma. MK-8628 effectively disrupted *MYC* transcription as well as *MYC*-regulated transcriptional programs. Mouse xenografts benefited from MK-8628 treatment, which led to decreased tumor volume and prolonged survival. Combination treatment with MK-8628 and a PLK1 inhibitor showed synergistic anti-medulloblastoma effects *in vitro*.

Conclusion: The orally bioavailable small molecule BRD4 inhibitor MK-8628 is similarly potent as previous BET inhibitors both *in vitro* and *in vivo* in preclinical models of medulloblastoma. Its effect can be enhanced through simultaneous targeting of PLK1.

1.2 Zusammenfassung (Deutsch)

Einleitung: In den vergangenen Jahren wurde die gezielte Inhibition der sogenannten ‚epigenetische Readers‘ ausführlich untersucht. Die Proteine aus der Bromodomänen und extraterminale Domänen (BET)-Familie, insbesondere das Bromodomäne enthaltende Protein 4 (BRD4), sind solche ‚epigenetischer Readers‘, dessen Inhibition zur Unterdrückung der *MYC*-Transkription führt. Derartige BET-Inhibition eröffnet Möglichkeiten einer gezielten Behandlung pädiatrischer Hirntumoren mit sehr schlechter Prognose. Dazu zählt das Medulloblastom, der häufigste maligne Hirntumor im Kindesalter, der aus embryonalen Zellen im Kleinhirn hervorgeht. Sein *MYC*-abhängiger Subtyp stellt eine Hochrisiko-Gruppe dar, die sich durch den aggressivsten Verlauf und das ungünstigste Prognose auszeichnet. MK-8628 ist ein oral bioverfügbarer, niedermolekularer BET-Inhibitor, der effektiv BRD4 inhibiert und die Expression von *MYC* herunterreguliert. In dieser Studie wurde die Wirksamkeit vom MK-8628 in präklinischen Modellen des Medulloblastoms *in vitro* und *in vivo* bewertet und die Ergebnisse mit bereits existierenden BET-Inhibitoren verglichen. Weiterhin ist es bereits bekannt, dass die Inhibition von PLK1, einer Kinase mit *MYC*-Protein-stabilisierender Funktion, eine sehr effektive anti-tumorale Wirkung gegen Medulloblastome aufweist. In dieser Studie wurde die Kombination des BRD4-Inhibitors mit einem PLK1-Inhibitor *in vitro* getestet und ihrer verstärkten Wirksamkeit gegen Medulloblastome durch die simultane Inhibition zweier unterschiedlicher *MYC*-Regulatoren untersucht.

Methoden: In dieser Studie wurde die Wirksamkeit von MK-8628 in vier Medulloblastom-Zelllinien (eine *MYC*-amplifiziert, zwei nicht-amplifiziert *MYC*-reich, eine *MYC*-arm) *in vitro* durch Messung der Apoptose und des Zellzyklusarrests untersucht. Die Störung des *MYC*-Expressionsprogramms nach MK-8628-Behandlung wurde mittels Genexpressionsanalysen beurteilt. MK-8628 wurde *in vivo* an Maus Xenograft-Modellen des *MYC*-amplifizierten Medulloblastoms auf Effektivität hinsichtlich der Reduktion der Tumormasse und verlängertem Überleben getestet. Ferner wurden diese Proben immunhistochemisch untersucht. Die Kombinationsbehandlung mit MK-8628 und dem PLK1-Inhibitor Volasertib oder GSK461364A wurden anhand eines etablierten Synergy-Scores bewertet.

Ergebnisse: Die Behandlung mit MK-8628 führte zu signifikant erhöhten Apoptoseraten und Zellzyklusarrest im Medulloblastom. MK-8628 störte effektiv die Transkription von *MYC* und durch *MYC* regulierte Transkriptionsprogramme. Xenograft-Mäuse profitierten von der Behandlung mit MK-8628 durch reduziertes Tumolvolumen und verlängertes Überleben. Die

Kombinationsbehandlung mit MK-8628 und einem PLK1-Inhibitor zeigte eine synergistische Wirkung gegen das Medulloblastom *in vitro*.

Schlussfolgerung: Der oral bioverfügbare, niedermolekulare BRD4-Inhibitor MK-8628 ist sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ähnlich wirksam wie BET-Inhibitoren früherer Generation in präklinischen Modellen des Medulloblastoms. Seine Wirkung kann durch die simultane Inhibition von PLK1 verstärkt werden.

2. Manteltext

2.1 Darstellung des Forschungsstandes

2.1.1 Medulloblastom und MYC

Das Medulloblastom ist der häufigste Hirntumor im Kindesalter, welches subtentoriell aus dem embryonalen Gewebe entsteht (1, 2). Anhand wesentlicher Charakteristika des molekularen Signalwegs werden zurzeit vier Subtypen dieses Tumors unterschieden: Wingless (WNT), Sonic Hedgehog (SHH), Gruppe 3 und Gruppe 4 (1-5). Diese Einteilung macht eine differenzierte Prognoseschätzung möglich. Der WNT-Subtyp macht 10% der Medulloblastome aus und hat einen hochregulierten WNT-Signalweg. Dieser Subtyp weist die beste Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 95% auf (2, 5) Der SHH-Subtyp macht insgesamt 30% der Medulloblastome aus und beinhaltet die Mutation eines Faktors im SHH-Signalweg (PTCH1, SMO, SUFU, GLI1, GLI2). Davon haben insbesondere die Gruppen mit *MYC*- oder *GLI2*-Amplifikation und mit *TP53*-Mutation eine schlechte Prognose (2). Das Merkmal des Gruppe 3-Subtyps ist die Amplifizierung verschiedener Proto-Onkogene, insbesondere von *MYC*. Innerhalb dieser Subgruppe haben Patienten mit *MYC*-Amplifikation im Tumorgewebe die schlechteste klinische Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von weniger als 50% und fallen somit in die Hochrisiko-Gruppe (1-6). Zur Gruppe 4 zählen bis zu 45% der Medulloblastome. Es handelt sich also um die größte Gruppe, die aber auch am wenigsten verstanden ist. Bisher wurden Abnormitäten in Chromosom 17 und die Mutation des *KDM6A*-Gens, welches für die Regulierung der Histon-Methylierung am Lysin 27 zuständig ist, als charakteristisch für diesen Subtyp eingeordnet (1-5, 7). Nach neuesten Erkenntnissen stellt der LIM homeobox transcription factor 1 (*LMX1A*) den hauptsächlichen regulatorischen Faktor für das Medulloblastoms der Gruppe 4 dar (2). Zusammengefasst liegt die Heilungschance des Medulloblastoms je nach Subtyp zwischen 40% und 95% (1).

Die bisherige Standardtherapie besteht aus der maximalen chirurgischen Tumorentfernung, gefolgt von kraniospinaler Radiotherapie und Chemotherapie (1). Nach neueren, gezielteren Therapiemöglichkeiten für Medulloblastompatienten mit verbesserter Heilungsrate und Tolerierbarkeit wurde in der letzten Dekade intensiv gesucht. Dies betrifft insbesondere die Hochrisiko-Gruppe-3-Medulloblastom mit *MYC*-Amplifikation, da die multimodale Therapie auch heute bei Patienten mit dieser aggressivsten Form meist nicht wirksam ist (6, 8).

Die *MYC*-Amplifikation ist eine der bereits früh bestimmten Genaberrationen im Medulloblastom (8). *MYC* ist ein oft stark exprimiertes Onkoprotein in verschiedenen

Tumorarten, es ist allerdings auch als Transkriptionsfaktor essenziell für die physiologische Zellentwicklung in Säugetieren. Insbesondere die Progression des Zellzyklus aus G1- in die S-Phase ist MYC-abhängig (9). Die wesentliche Funktion des MYC in sowohl gesunden als auch entarteten Zellen ist ein Faktor, der das direkte Targeting von MYC im Rahmen einer Tumorthherapie erschwert (9, 10). Weitere Herausforderungen ergeben sich durch seine Struktur. Da MYC als ein Transkriptionsfaktor kein aktives Zentrum besitzt, ist eine niedermolekulare Modulation wie bei einem Enzym nicht möglich (9, 10).

Um diese Nachteile zu überwinden, wurde nach indirekten Wegen für die Inhibition der *MYC*-Expression gesucht. Große Regionen, die Super-Enhancer genannt werden, befinden sich in der Nähe von Transkriptionsfaktor-Genen sowie Onkogenen und können durch epigenetische Modifikation wie Acetylierung von Histonen diese regulieren (11-14). Sogenannte epigenetische Readers erkennen solche epigenetischen Modifikationen in der Super-Enhancer-Region und binden dort, um weitere Aktivatoren der Transkription zu rekrutieren (14, 15). In den letzten Jahren wurden besonders diese epigenetischen Reader als das Angriffsziel für die Tumorbehandlung intensiv erforscht.

2.1.2 BET und BRD4-Inhibitor

Ein Beispiel solcher epigenetischer Readers ist die Familie aus Transkriptions-Co-Aktivatoren-Proteine mit Bromodomänen (Acetyl-Lysin-Erkennungsdomänen) und extra-terminalen (BET) Domänen. Diese Proteinfamilie erkennt das acetylierte Lysin am Histon (H3K27Ac) und rekrutiert Komponenten des Transkriptionsinitiationskomplexes (14, 16, 17). Zur BET-Familie gehören die Proteine BRD2, BRD3, BRD4 und BRDT. Während BRDT Keimbahnzell-spezifisch ist, sind die drei Erstgenannten ubiquitär vorhanden (18, 19). Besonders interessant für die Tumorbehandlung innerhalb der BET-Familie ist BRD4. BRD4 bindet an Genen, die unter anderem zu Beginn einer Transkription für den M/G1-Übergang im Zellzyklus exprimiert werden (19). Außerdem ist BRD4 ein kritischer Mediator der Transkriptionselongation durch seine Spezifität zum positive transcription elongation factor b (P-TEFb) (14, 16, 17, 19). P-TEFb wird BRD4-abhängig zur Promotorregion der RNA-Polymerase II rekrutiert. Die Phosphorylierung der RNA-Polymerase II durch BRD4-gebundenen P-TEFb ist für die effiziente Transkription des *MYC* in der frühen G1-Phase des Zellzyklus essenziell (14, 20). Deshalb ist BRD4 ein attraktives Target, um die *MYC*-Expression auf indirektem Weg herunter zu regulieren und dadurch *MYC*-abhängige Tumoren zu bekämpfen (21).

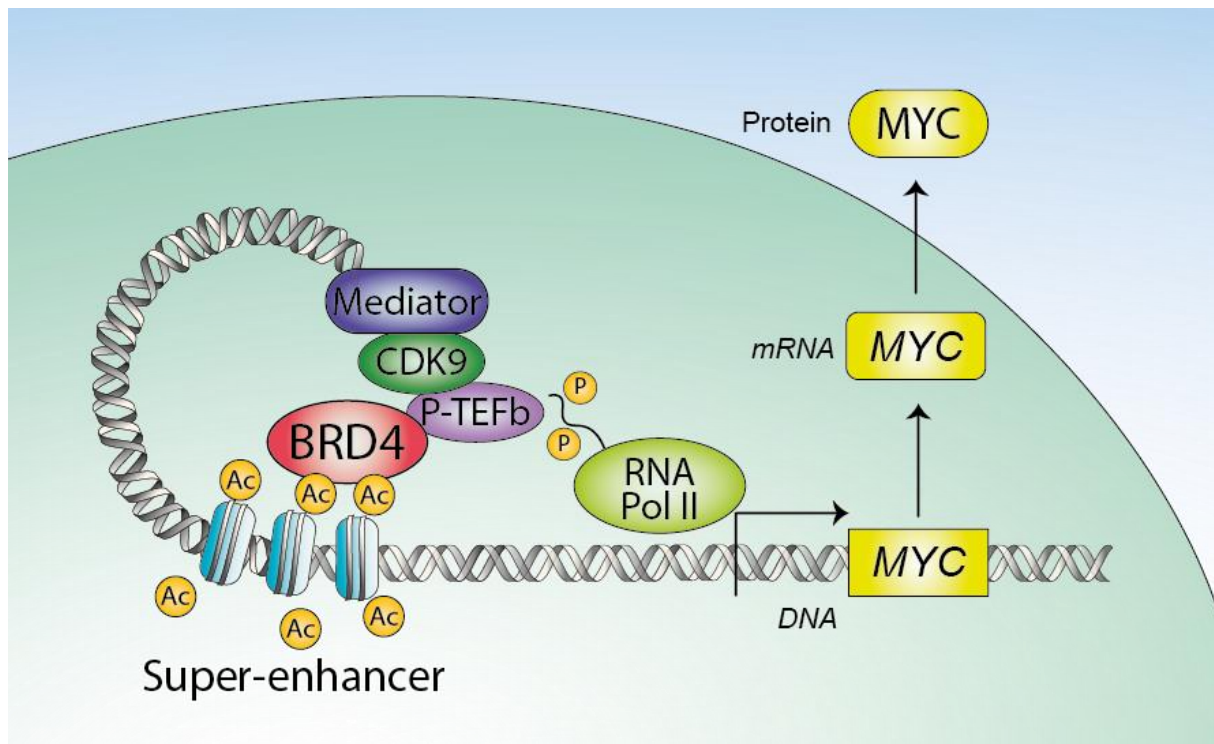


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen BRD4 und MYC.

BRD4, ein sogenannter epigenetischer Reader, erkennt und bindet an acetylierte Histone in der Super-Enhancer-Region. Hierdurch werden weitere Transkriptionsmediatoren wie P-TEFb und CDK9 rekrutiert und bilden einen Mediator-Komplex. Durch BRD4 aktiviertes P-TEFb phosphoryliert RNA-Polymerase II, sodass die Transkription des MYC initiiert wird. Nach der Transkription der MYC-DNA in MYC-mRNA im Zellkern folgt die Translation der MYC-mRNA in MYC-Proteine im Zytoplasma (14, 21, 22).

Die erste Generation der BET-Inhibitoren, JQ1 und iBET, gehören zur Familie der Benzodiazepine und sind pan-BET Inhibitoren; sie unterscheiden nicht zwischen den vier Proteinen der BET-Familie BRD2, BRD3, BRD4 und BRDT (18). Dabei zeigt JQ1 die höchste Spezifität zu BRD4, während die Bindung an BRD2, BRD3 und BRDT schwächer ist (14, 18, 19). Diese Prototypen von niedermolekularen BET-Inhibitoren wurden zuerst im NUT midline carcinoma (NMC) getestet, einem seltenen und aggressiven Tumor, der sich durch eine chromosomale Translokation auszeichnet, welche oft ein Fusionsgen *BRD4/NUT* (nuclear protein in testis) entstehen lässt. Das daraus resultierende Fusionsprotein führt zur massiven Überexpression seiner Ziel-Onkogene, inklusive *MYC* (18, 19). JQ1 zeigte dort eine starke Spezifität zu BRD4 sowie antiproliferative Effekte mit rascher Reduktion des *MYC*-Gehaltes der kultivierten NMC-Zellen und eine Reduktion der Tumorgröße in Mausmodellen (18, 19). Weitere Studien mit BET-Inhibitoren haben ähnliche Effekte von JQ1 in verschiedenen Tumorarten nachgewiesen, darunter das multiples Myelom, das B-Zell-Lymphom, die akute myeloide Leukämie und das Neuroblastom (9, 14, 15). Auch im Medulloblastom wurde JQ1 präklinisch getestet und zeigte signifikante anti-proliferative Effekte, sowohl *in vitro* als auch

in vivo mit Zellzyklusarrest in G1-Phase, Herabregulation der *MYC*- und *MYC*-abhängigen Ziel-Gene und Verlängerung der Überlebenszeit der Xenograft-Mäuse (6).

Leider führte die JQ1-Behandlung allerdings nicht zu einer tumorfreie Kuration bei *in vivo* Modellen des Medulloblastoms (6). Für die weiterführende klinische Anwendung wurde, obwohl BRD4 das dominante Mitglied der BET-Familie ist und deshalb in den meisten Studien als der Hauptwirkungsort des pan-BET-Inhibitors angenommen wird, die fehlende Spezifität der Inhibitoren JQ1 sowie iBET aufgrund unerwünschter Wirkungen auf normale Nerven- oder Immunzellen als limitierender Faktor angesehen (18). JQ1 zeigte außerdem eine kurze Halbwertszeit, weshalb von weiteren klinischen Studien mit dieser Substanz abgesehen wurde (23).

Mittlerweile wurden neue Generationen der BET-Inhibitoren mit verbessertem Wirkprofil entwickelt. Ein Beispiel dafür ist MK-8628 (früher OTX015 genannt), ein Derivat von JQ1 (6, 14, 18, 21). Dieser niedermolekulare BET-Inhibitor blockiert wie JQ1 die Interaktion zwischen BET-Proteinen, insbesondere BRD4, und dem acetylierten Histon, und reguliert dadurch die Genexpression von *MYC* und seinen Ziel-Genen in ähnlicher Weise herunter (6, 14, 18, 21). Der Unterschied zwischen den beiden liegt darin, dass MK-8628 oral bioverfügbar ist (6, 14, 18, 21). Bisher wurde MK-8628 präklinisch vor allem in verschiedenen pädiatrischen, sowohl hämatologischen (akute Leukämien) als auch soliden Tumorentitäten (Lymphomen, Neuroblastom und Medulloblastom) untersucht (14, 21, 24). In weiteren klinischen Studien (Phase I/II) von MK-8628 bei Patienten mit akuten myeloischen Leukämien, Lymphomen und multiplen Myelomen konnten die Toxizität, die Nebenwirkungen und die empfohlene Dosis der Substanz ermittelt werden (18, 23). Hierbei konnte die verbesserte orale Bioverfügbarkeit und pharmakologischen Eigenschaften von MK-8628 im Vergleich zu seinen Vorgängern gezeigt werden (14, 18, 23-26).

Während die Ergebnisse der klinischen Studien vielversprechend sind, wurde die alleinige Behandlung mit MK-8628 in Patienten als nicht ausreichend beschrieben. Bei vielen Patienten zeigten sich einige Monate nach Regression des Tumors durch MK-8628 Rezidive (18). Für die präklinischen Modelle des Medulloblastoms war die Wirkung von MK-8628 allein ebenfalls nicht ausreichend, um eine komplette Remission des Tumors zu erzielen (6, 18). Es werden weitere Maßnahmen benötigt, um die Effektivität dieses BET-Inhibitors auf ein klinisch anwendbares Niveau zu steigern.

2.1.3 Der PLK1-Inhibitor als Kombinationspartner für den BRD4-Inhibitor

In dieser Studie wurde deshalb eine synergistisch wirkende Substanz zur Kombination gesucht (21). Als potenzieller Kombinationspartner wurde, basierend auf vorhandenen Studien, der Inhibitor der Polo-like Kinase 1 (PLK1) ausgewählt (21). Humane PLK ist eine Familie von Serin/Threonin-Kinasen, welche fünf Mitglieder (PLK1, PLK2, PLK3, PLK4 und PLK5) beinhaltet; davon ist PLK1 am besten erforscht und bekannt für seine vielfältige Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus (27). PLK1 ist ein wichtiger Regulator des G2/M-Checkpoints und besitzt Relevanz für die Koordination von Zentrosom und Spindelapparat, DNA-Reparatur und vieles mehr (27, 28). Außerdem spielt es auch eine wichtige Rolle in der Regulation des MYC-Signalwegs; durch Phosphorylierung stabilisiert PLK1 das MYC-Protein in der M-Phase des Zellzyklus und trägt zum Überleben der Tumorzellen bei (27-31). PLK1 ist oft hoch exprimiert in Tumorzellen und deshalb ein besonders attraktives Target in der Tumorthherapie (30). Verschiedene niedermolekulare PLK1-Inhibitoren wie BI6727 (Volasertib), BI2536, ON-01910 (Rigosertib), und GSK461364A werden in präklinischen und klinischen Studien in Phase I/II für solide Tumore getestet (30). In einigen Studien haben PLK1-Inhibitoren eine gute Wirkung gegen Hirntumore wie das Medulloblastom *in vitro* und *in vivo* gezeigt (30). Durch Behandlung mit PLK1-Inhibitoren wurde neben der Hemmung der Zellproliferation, Zellzyklusprogression sowie der Apoptose-Induktion ein verbessertes Überleben von Xenograft-Mäusen mit Medulloblastom gezeigt (30). Es sind auch Studien zur Kombinationstherapie mit BRD4- und PLK1-Inhibitoren vorhanden, zum Beispiel bei akuter myeloischer Leukämie, in der die zwei gleichzeitig applizierten Inhibitoren eine synergistische Wirkung gegen den Tumor gezeigt haben (32). Diese Erkenntnisse haben uns dazu motiviert, eine Kombination aus BRD4- und PLK1-Inhibitoren in präklinischen Modellen des Medulloblastoms zu untersuchen (21).

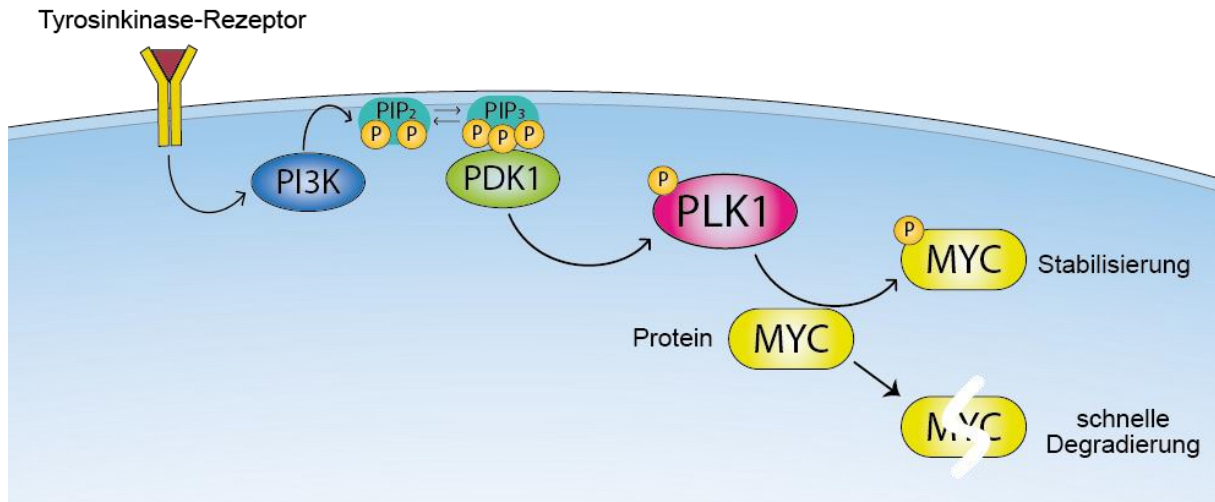


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen PLK1 und MYC.

Durch Bindung eines Liganden am Tyrosinkinase-Rezeptor wird Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) aktiviert. PI3K konvertiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃), das die Phosphoinositide-dependent Kinase-1 (PDK1) aktiviert. PDK1 aktiviert in Folge Polo-like Kinase 1 (PLK1) durch Phosphorylierung. PLK1 phosphoryliert MYC, sodass dieses Protein stabil bleibt und weiterhin zur Tumorentwicklung beitragen kann. Ohne Stabilisierung durch PLK1 degradiert MYC schnell durch Ubiquitinierung (14, 21, 28).

2.1.4 Fragestellung

Zusammenfassend sollte in der Studie (21) zum Einen die Effektivität des BRD4-Inhibitors MK-8628 in präklinischen Modellen des Medulloblastoms getestet und in den Vergleich zu den vorhandenen Studien mit dem Vorgänger JQ1 gestellt werden. Zweitens soll der synergistische anti-Tumor-Effekt bei Anwendung einer Kombination aus MK-8628 und PLK1-Inhibitoren in präklinischen Modellen des Medulloblastoms vorgestellt werden. Die Ergebnisse dienen als mögliche Grundlage für die weitere Erforschung des BRD4-Inhibitors und PLK1-Inhibitors in der Behandlung von Medulloblastomen in klinischen Studien.

2.2 Vertiefende Darstellung der Methodik

Alle Versuche wurden unabhängig voneinander mindestens dreimal durchgeführt, sofern nicht anders angegeben.

2.2.1 Auswahl der Zelllinien

In dieser Studie wurden vier Zelllinien ausgewählt, die aus zwei verschiedenen Subtypen des Medulloblastoms stammen. HD-MB03 ist eine *MYC*-amplifizierte Zelllinie und gehört zur Gruppe 3 (2). ONS-76, DAOY und UW228 gehören zum SHH-Subtyp. ONS-76 und DAOY haben eine hohe *MYC*-Expression. Im Gegensatz dazu hat UW228 eine sehr geringe Expression des *MYC* (2). Hieraus ergeben sich drei Testgruppen zur Analyse (*MYC*-amplifiziert, nicht-amplifiziert *MYC*-reich, *MYC*-arm). Die Zelllinien wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (HD-MB3, UW228 und DAOY) oder Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640 (ONS-76) angezüchtet, wobei beide Medien mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), L-Glutamin, und 1% Penicillin/Streptomycin ergänzt wurden.

Als Vergleichsmaterial zu den Medulloblastom-Zelllinien wurden die Fibroblasten-Zelllinien, BJ, RPE und VH-7 verwendet. Diese drei Zelllinien wurden wie bereits beschrieben in DMEM angezüchtet.

2.2.2 Analyse von Zellviabilität, Zelltod, Zellproliferation und Zellzyklus

Der Effekt des BRD4-Inhibitors MK-8628 und des PLK1-Inhibitors Volasertib und GSK461364A auf das Zellwachstum der vier Medulloblastom-Zelllinien wurde *in vitro* anhand folgenden Methoden untersucht:

2.2.2.1 Zellviabilität

Für die Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) sowie die Fläche unter der Kurve (area under the curve, AUC) der Zelllinien anhand der Dosis-Wirkungs-Kurve wurde die Zellviabilität der vier Medulloblastom-Zelllinien gemessen. Dafür wurde das Protokoll des CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Wisconsin, USA) verwendet. Diese Methode misst die ATP-Konzentration in den Zellen durch Lumineszenz, um die Anzahl der lebenden, metabolisch aktiven Zellen zu bestimmen. Die Reagenz beinhaltet Luciferase, die nach Zugabe zu den Zellen ein stabiles, leuchtendes Signal ergibt, dessen Intensität mit dem ATP-Gehalt korreliert (33).

Hierfür wurden die Zelllinien auf 96-Well-Platten mit einer Konzentration von 500 Zellen pro Well ausgesät und für 24 Stunden inkubiert, um eine Adhäsion auf der Plattenoberfläche zu ermöglichen. Am zweiten Tag wurden die Zellen mit den zu testenden Substanzen in

Triplikaten behandelt. Gemäß existierender Daten zur IC₅₀ wurden folgende Konzentrationsbereiche ausgewählt: 0 – 10 µM bei MK-8628, 0 – 0,1 µM bei Volasertib und 0 – 0,3 µM bei GSK461364A. In allen Experimenten wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) als Kontroll-Substanz verwendet. Nach 72 Stunden (an Tag fünf) wurden die Zellen aus dem Inkubator genommen und bei Raumtemperatur für 30 Minuten abkühlen gelassen. Anschließend wurde CellTiter-Glo-Reagenz hinzugefügt und nach 10 Minuten die Fluoreszenz mit dem Glomax Microplate Reader (33) gemessen. Die Ergebnisse wurden mit GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) graphisch dargestellt, sodass anhand dessen die IC₅₀ sowie die AUC berechnet werden konnte.

2.2.2.2 Zelltod (Apoptose) und Zellproliferation

Um den Effekt der anti-tumoralen Substanzen auf die Zellen genauer zu bestimmen, wurden Zelltod- und Zellproliferations-Assay durchgeführt.

Tumorzellen können unter Zugabe anti-tumoraler Substanzen in die Apoptose gehen, die auch als programmierter Zelltod bezeichnet wird und die häufigste Form des Zelltodes darstellt (34). Dabei entstehende DNA-Fragmente sind mit Histonen H2A, H2B, H3 und H4 gekoppelt, wodurch die DNA-Fragmente vor Abbau durch Endonukleasen geschützt werden (34). Dies kann durch monoklonale Antikörper gegen H2B sowie gegen Komplexe aus H2A-H2B Dimeren und DNA anhand der Doppel-Antikörper Sandwich-ELISA-Methode detektiert werden (34).

Das Zellproliferations-Assay misst das Zellwachstum über die Vermehrung der DNA. Eine indirekte aber spezifische Methode für die Messung der Zellproliferation ist die Detektion der proliferierenden Zellen mithilfe der Bromdesoxyuridin (BrdU)-Labeling von DNA, da DNA-Synthese und Zellproliferation miteinander verbunden sind. BrdU ist ein Thymidin-Analogon, welches nach Inkorporation in die DNA durch Enzyme-Immunoassay und Messung des Farbumschlags quantifiziert werden kann (35).

Für die Messung von Apoptose und Proliferation wurde das Cell Death Detection ELISA beziehungsweise BrdU-ELISA angewandt (Roche, Basel, Schweiz). 3000 Medulloblastom-Zellen pro Well wurden ausgesät und vor der Behandlung mit MK-8628 in drei verschiedenen Konzentrationen (0 nM, 250 nM und 500 nM) für 24 Stunden inkubiert.

Die Assays wurden gemäß den Protokollen des Herstellers durchgeführt. Für beide Assays wurden drei verschiedene Zeitpunkte (24, 48 und 72 Stunden nach der Behandlung) zur Messung ausgewählt.

2.2.2.3 Zellzyklusanalyse

Anhand der Durchflusszytometrie ist es möglich, Zellen in verschiedenen Stadien des Zellzyklus auseinanderzuhalten. Durch den Vergleich zwischen Proben mit und ohne Behandlung mit den zu untersuchenden Substanzen kann man erkennen, ob die Behandlung zum Zellzyklusarrest führt und in welcher Zellzyklusphase sie einen Effekt hat.

Zur Ermöglichung von Wachstum durchlaufen Zellen verschiedene Phasen des Zellzyklus, um sich zu teilen. Dabei wird die DNA repliziert, um den gleichen Chromosomensatz an die beiden Tochterzellen weiterzugeben. Der in der G1-Phase vorbereitete DNA-Replikationsvorgang findet in der S-Phase statt, in der das genetische Material verdoppelt wird. Die Phase der Nachkontrolle der Replikation und der Vorbereitung auf die Zellteilung ist die G2-Phase. In der M-Phase erfolgt dann durch Mitose die Aufteilung des verdoppelten Chromosomensatzes auf zwei Zellen.

Ethynyldeoxyuridin (EdU), ein Analog zu Thymidin, wird bei Bereitstellung in der Zellkultur in die DNA eingebaut und lässt sich durch Färbung mit fluoreszenten Aziden in der Durchflusszytometrie sichtbar machen (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Da EdU nur in der S-Phase der Zellen in die DNA eingebracht werden kann, ist es ein Marker für die Proliferation der Zellen. Die Gesamtheit der DNA kann durch Färbung mit fluoreszentem Propidiumiodid sichtbar gemacht werden. Die unterschiedliche Gesamtmenge an DNA und das Vorhandensein des inkorporierten EdU in der DNA ermöglicht dementsprechend eine Unterscheidung der Phasen der Zellzyklus.

Hierfür wurden die Medulloblastom-Zelllinien in 10-cm-Schalen mit einer Konzentration von $3,5 \times 10^5$ Zellen pro Schale kultiviert. Nach 24 Stunden erfolgte die Behandlung mit 500 nM MK-8628, 5 nM Volasertib, einer Kombination aus beiden oder mit DMSO als Kontrolle. Nach 22 Stunden wurde EdU zu den Zellen zugegeben und für weitere 2 Stunden inkubiert, um die Inkorporation von EdU in die DNA zu ermöglichen. Die Zellen wurden anschließend gewaschen, gesammelt, fixiert und permeabilisiert unter Verwendung von Click-iT Plus™ EdU Flow Cytometry Assay Kits (Thermo Fisher Scientific). Ihre DNA wurde mit Propidiumiodid gemäß Protokoll gefärbt (36). Der zelluläre DNA-Gehalt der Zellen (10.000 Zellen pro Probe, 3 Proben pro Zelllinie) wurde mithilfe eines BD LSR Fortessa X-20 (BD Biosciences, Kalifornien, USA) gemessen und mit FlowJo (BD Biosciences) analysiert.

2.2.3 Analyse der Expression der BRD4-Targets

2.2.3.1 RT-qPCR (quantitative Echtzeit-PCR)

Zellen produzieren verschiedene Proteine, um ihr Überleben zu gewährleisten. Hierfür bereiten sie zuerst die mRNA, den Bauplan für Translation der Proteine, vor. Der Gehalt einer bestimmten mRNA in einer Zelle reflektiert somit das Ausmaß Expression des entsprechenden Proteins. Der Goldstandard für eine indirekte Bestimmung des mRNA-Gehaltes in Zellen ist die RT-qPCR.

Die RT-qPCR teilt sich in drei Hauptschritte: Auf die reverse Transkription von mRNA zu cDNA folgt die Amplifikation dieser spezifischen cDNA durch PCR mit Echtzeit-Messung der integrierten fluoreszenten Signale und anschließend die Quantifizierung des vervielfältigten Produktes. Die Software misst die Ct-Werte (threshold cycle, Schwellenwertzyklus), die mithilfe von Vergleichskontrollen ermöglichen, initiale mRNA-Mengen in Proben zu berechnen. Eine häufig verwendete Methode hierfür ist die Berechnung des ‚Fold Change‘, frei übersetzt ‚x-fach-Unterschied‘ von zwei Werten (37). Es ist ein Vergleich zwischen den Ct-Werten für das ‚gene of interest‘ (GOI, das zu testende Gen) in der zu untersuchenden Probe und den Ct-Werten der Kontrolle (calibrator), die durch einen Normalisator (z.B. Housekeeping Gene) normalisiert wurden.

Normalisierung der Ct-Werte von Proben und Kontrolle:

$$Ct(GOI)^s - Ct(norm)^s = \Delta Ct(sample)$$

$$Ct(GOI)^c - Ct(norm)^c = \Delta Ct(calibrator)$$

Berechnung der Unterschiede zwischen normalisierten Ct-Werten:

$$\Delta Ct(sample) - \Delta Ct(calibrator) = \Delta \Delta Ct$$

Berechnung des ‚Fold Change‘ zur komparativen Quantifizierung der Unterschiede des initialen mRNA-Gehaltes:

$$Fold\ Change = 2^{-\Delta \Delta Ct}$$

Bei der Untersuchung des Effekts des BRD4-Inhibitors MK-8628 wurden die Veränderung in dem mRNA-Gehalt der *BRD4* und ihrer Targets wie *MYC* und *CCND1* nach Substanzgabe bei variierender Behandlungszeit gemessen. Die Medulloblastom-Zelllinie HD-MB03 wurde mit einer Konzentration von 300.000 Zellen pro 10-cm-Schale ausgesät und mit einer Lösung von MK-8628 (20 nM), Volasertib (5 nM), einer Kombination aus beiden oder DMSO als Kontrolle

behandelt. Die Behandlungszeit variiert zwischen a) 4 und 24 Stunden oder b) 1 und 3 Stunden mit einem Washout nach 3, 6, 12 oder 24 Stunden nach Behandlung.

Die Gesamt-RNA wurde mit den RNeasyMini-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß dem Protokoll des Herstellers aus den Zellen extrahiert. Die Konzentration der RNA wurde unter Zuhilfenahme eines Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Für das Washout von *BRD4*, *MYC* und *CCND1* wurde die cDNA-Synthese mit dem SuperScript-Reverse-Transcription-Kit (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt und die Expression mit Assays-on-Demand (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) gemessen. Die Expressionswerte wurden auf das geometrische Mittel von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normiert (38). Die Datenanalyse erfolgte mit qbasePLUS-Software Version 1.5 (Biogazelle, Zwijnaarde, Belgien).

Für den regulären Behandlungsversuch mit *MYC* wurde die cDNA mit dem Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit synthetisiert und die Expression mit StepOne Plus™ (39) gemessen. Die Expressionswerte wurden wie zuvor beschrieben auf das geometrische Mittel der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT1) normiert (38). Die Datenanalyse und komparative Quantifizierung wurden mit der StepOne Software v2.3 (39) nach Protokoll durchgeführt (39).

2.2.3.2 Western Blot

Der Western Blot ist die Standard-Methode zur Detektion eines spezifischen Proteins in Proben. Durch Proteindenaturierung und Elektrophorese werden die Proteine der Größe nach getrennt. Die gewünschten Ziel-Proteine werden dann mit spezifischen Antikörpern markiert. Durch Reaktion der am Protein gebundenen Antikörper mit einem Luminol-Agens ist die Visualisierung der markierten Proteine möglich.

In der vorgelegten Arbeit wurden *BRD4*, *PLK1* und verschiedene zugehörige Targets getestet, um den Effekt der Substanzen auf die Proteinexpression zu ermitteln und zu quantifizieren.

Für *BRD4* wurden *MYC*, *WEE1*, *CCND1* und *E2F1* als Targets untersucht (6, 40), für *PLK1* waren es *MYC*, *WEE1* und phospho-*PLK1* (27, 41, 42). In allen Versuchen wurde Beta-Actin als Kontrolle für den Nachweis von in den Zelllinien ubiquitär vorhandenen Proteinen getestet. Die Zelllinien wurden in einer 10cm großen Petrischale mit einer Konzentration von 300.000 Zellen pro 10-cm-Schale gezüchtet. Nach 24 Stunden wurden sie mit MK-8628 (20 nM), Volasertib (5 nM), einer Kombination aus beiden oder DMSO als Kontrolle behandelt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen gesammelt, inklusive toter Zellen. Mit RadioImmunoPrecipitation Assay (RIPA)-Puffer (15 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM

EGTA, 2% Triton X-100), supplementiert mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren (cOmplete mini EDTA-free und PhosSTOP, Roche), wurde aus Zellpellets Protein-Lysat extrahiert. Die Konzentration der Proteine wurde anhand der Standardreihe des bovinen Serumalbumins (BSA) und mit Bicinchoninsäure (BCA)-Reagenz gemäß Protokoll bestimmt (43). Für die Elektrophorese wurden alle Lysate mit der gleichen Proteinkonzentration pro Probe mit jeweils angemessenen Menge an Laemmli-Puffer (Bio-Rad Laboratories, California, USA) gemischt und zur Proteindenaturierung für 10 Minuten auf 95 °C aufgeheizt. Die Elektrophorese wurde auf NuPAGE 10% Bis-Tris Gel (Invitrogen) mit einer Spannung von 120 V durchgeführt, gefolgt von Elektrotransfer der Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran bei 90 V. Die Membran wurde mit 10% fettfreier trockener Milch beziehungsweise 5% BSA für Phospho-Antikörper in Tris-buffered saline with Tween20 (TBS-T)-Puffer für mindestens eine Stunde geblockt, dann mit primären Antikörpern in 10% fettfreier trockener Milch (bzw. 5% BSA für Phospho-Antikörper) über Nacht bei 4°C inkubiert. Die verwendeten primären Antikörper sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die Membran wurde anschließend drei Mal in TBS-T gewaschen und mit sekundären Antikörpern in 10% fettfreier trockener Milch (bzw. 5% BSA für Phospho-Antikörper) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Als sekundäre Antikörper wurden mit Meerrettichperoxidase (Horseradish peroxidase, HRP)-konjugierte Ziege-anti-Kaninchen-IgG (111-035-003, Dianova, Hamburg, Germany) oder HRP-konjugierte Ziege-anti-Maus-IgG (115-035-003, Dianova) mit einer Verdünnung von 1:3000 verwendet. Die Proteine wurden unter Verwendung des ImmunoCruz™ Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz) visualisiert und mit dem Chemilumineszenz-Imaging-Gerät FusionFX7 (Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland) detektiert.

Tabelle 1: Liste der für die Western Blot-Experimente verwendeten Antikörper

Antikörper gegen	Verdünnung	ID	Firma
MYC	1:500	#9402	Cell Signaling Technology
BRD4	1:200	sc-48772	Santa Cruz
WEE1	1:1000	sc-5285	Santa Cruz
CCND1	1:500	#2922	Cell Signaling Technology
E2F1	1:200	AF4825	R&D Systems
PLK1	1:500	sc-5585	Santa Cruz
phospho-PLK1	1:200	ab39068	Abcam
Beta-Aktin	1:20000	3700S	Cell Signaling Technology

2.2.4 Genexpressionsanalyse

Die Behandlung der Zellen mit den untersuchten Substanzen führt zu Veränderungen in der Aktivität vieler Gene. Anhand der Genexpressionsanalyse ist es möglich, diese Veränderungen zu visualisieren und zu vergleichen, um ein Gesamtbild zu verschaffen. Mit der DNA-Microarray-Technik kann man die Genaktivität messen, unter der Annahme, dass die Menge an mRNA-Molekülen mit dem Grad der Expressionsaktivität des Gens korreliert. Zwei Probesets von Zellen oder Geweben, die verglichen werden sollen (z.B. behandelte Zellen vs. unbehandelte Kontrolle), werden vorbereitet. Nach Isolierung der mRNA wird cDNA gebildet und die Probesets werden mit verschiedenen fluoreszenten Markern markiert (z.B. grün für unbehandelte, rot für behandelte Proben). Der DNA-Microarray-Chip beinhaltet verschiedene kurze DNA-Sequenzen (Oligonukleotide), woran die cDNA durch Hybridisierung binden kann. Wenn die cDNA beider Probesets am gleichen Oligonukleotid in gleicher Menge bindet, wird dieses Well bei der Messung gelb leuchten. Gibt es bei einem der Probesets eine Mehrheit einer bestimmten cDNA, wird das entsprechende Well mit komplementärer Sequenz ein stärkeres fluoreszierendes Signal zeigen. Im hier beschriebenen Fall bedeutet ein grünes Areal weniger Genexpression in behandelten Zellen und rot eine höhere Expression. Dieser Unterschied wird als differenzierte Expression bestimmten Genen zugeordnet und für die weitere Analyse verwendet.

In dieser Studie wurde die HD-MB03-Zelllinie mit 1×10^5 Zellen pro Well in 6-Well-Platten ausgesät und nach 12 Stunden mit einer 500 nM-MK-8628-Lösung oder mit der DMSO-Kontrolle behandelt. Die Gesamt-RNA wurde mit RNeasyMini-Kits (Qiagen) extrahiert und mit dem Affymetrix Human Gene Expression Array (HG-U133 Plus 2.0, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) wie beschrieben gemessen (14). Robust Multiarray Averaging (RMA) ist eine Methode, um die erhaltenen Microarray.CEL-Daten durch Affymetrix Microarrays zu normalisieren und mit einer Hintergrundkorrektur zusammenzufassen, damit die Daten gleich verteilt und vergleichbar sind (44). Für die weitere Analyse wurden alle Gene mit einem Wert von \log_2 -Expression $\geq 1,5$ und p-Werte $\leq 0,01$ als verändert exprimiert angenommen. Die differenzierte Genexpressionsanalyse dieser ausgewählten Daten wurde mit dem Limma-Package durchgeführt (45). Von diesem Ergebnis wurden die 50 am meisten differenziell exprimierten Gene durch hierarchisches Clustering mit euklidischer Distanz der \log_2 -Expressionswerte visualisiert.

Die Enrichment-Analyse der Daten wurde anhand von zwei Methoden durchgeführt. Gene Ontology (GO) ist eine Ontologie-Datenbank von GO-Termini (Annotation), die der Funktion einzelne Gene zugeordnet sind. Hieraus kann man Informationen über die Funktion spezifischer

Gene auf molekularer Ebene, ihre Rolle in biologischen Prozessen in Zellen (Signalwege und Programme) und ihre Aufenthaltsorte in Zellen erhalten. Anhand dieser Datenbank und der GO-Enrichment-Analyse kann man die Fraktion des spezifischen Gens in einem Signalweg zwischen Standardwert und Proben vergleichen und visualisieren, ob diese hoch repräsentiert ist.

Die Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) ist eine andere Methode für die Untersuchung von im Vorfeld festgelegten Gengruppen auf signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Phänotypen (46-48). Die Gengruppen können zum Beispiel die Gene sein, die dem gleichen Stoffwechselweg oder Signalweg angehören. Diese Gengruppen werden nach dem berechneten Enrichment Score rangiert und die hoch- oder herunterregulierten Gene werden visualisiert. In dieser Studie wurden beide Analysen mit clusterProfiler-Package in R durchgeführt unter Verwendung von Onkogen-c6-Signaturen aus der Molecular Signatures Database (MSigDB) (46-48). Zusätzlich wurden die MYC-Signature Scores von mit MK-8628 behandelten HD-MB03-Zellen anhand existierender Signatures (49-53) analysiert und die Ergebnisse mit den Resultate der von JQ1-Behandlung an Zellen derselben Zelllinie verglichen (6, 14).

2.2.5 *In vivo* Behandlung der Xenograft-Mäuse

Der anti-tumorale Effekt des MK-8628 wurde weiterhin *in vivo* an Xenograft-Mäusen geprüft. Die Medulloblastom-Zelllinie HD-MB03 wurde bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert, anschließend geerntet und in 200 µl Matrigel™ (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) suspendiert. Die gewonnene Suspension wurde in die linke Flanke von 4 Wochen alten, weiblichen, thymusaplastischen (nu/nu) Mäusen subkutan injiziert (1×10^7 Zellen pro Maus, n = 22 Mäuse). Nachdem die Tumoren eine Größe von 150 bis 200 mm³ erreicht hatten, wurde die Mäusepopulation nach dem Zufallsprinzip in drei Gruppen eingeteilt, von denen die eine MK-8628-SD (solid dispersion, Feststoffdispersion) erhielt. Daneben gab es eine Positiv- und eine Negativkontrollgruppe. Um einen klinisch relevanten Zustand herzustellen, wurde die Behandlung erst nach Erreichen von mindestens 200 mm³ Tumorgröße begonnen. Die Mäuse der erstgenannten Gruppe wurden täglich mit 25 mg/kg MK-8628-SD (n = 7) bzw. zweimal täglich mit 25 mg/kg MK-8628-SD (n = 6) behandelt. In der Positivkontrollgruppe (n = 3) wurden zweimal wöchentlich 100 mg/kg Cyclophosphamid verabreicht, während die Negativkontrolle (n = 6) lediglich täglich Wasser erhielt. Zur Verabreichung aller genannten Substanzen wurde eine Magensonde verwendet. Das Tumorwachstum wurde mit einem Kaliber gemessen und das Tumolvolumen mit der Formel (Breite × Länge × Höhe)/2 berechnet. Wenn die Tumorgröße 2500 mm³ überschritt, wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet.

Zur Beurteilung der Kurzzeitwirkung der MK-8628-Behandlung auf die molekularen Merkmale von Tumoren wurden 6 Dosen à 50 mg/kg Körpergewicht MK-8628-SD bzw. Wasser (n = 3 Mäuse pro Gruppe) nach 0, 12, 24, 36, 48, 60 und 72 Stunden verabreicht. Diese Mäuse wurden 4 Stunden nach der letzten Behandlung durch Genickbruch getötet, und die Xenotransplantat-Tumoren wurden aus allen Tieren entnommen und in jeweils zwei Hälften geteilt. Die eine Hälfte des Gewebes wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bei -80°C gelagert; die andere Hälfte wurde mit Formalin fixiert und zur immunhistochemische Analyse in Paraffin eingebettet. Die Gewebe wurde mit primären Antikörper gegen Ki-67 (1:50, pH 6; #275R-16, Cell Marque) beziehungsweise Cleaved Caspase-3 (1:100, pH 6; #9661, Cell Signaling Technology) mit entsprechenden sekundären Antikörper (Histofine Simple Stain MAX PO, Medac) zur Reduktion der Hintergrund mithilfe der LabVision Autostainer 480S (Thermo Scientific) gefärbt. Die Objektträger wurden mit dem Panoramic 250 slide scanning programs (3D Histech) aufgenommen. Alle Tierversuche wurden gemäß den Richtlinien des Europarates für die Unterbringung und Pflege von Labortieren durchgeführt; die Protokolle wurden von der Ethikkommission für Tierversuche am Universitätsklinikum Essen genehmigt.

2.2.6 Synergismus

Für die Analyse des Synergismus zweier unterschiedlichen Substanzen wurden die zu testenden Zelllinien in 96-Well-Platten mit einer Konzentration von 500 Zellen pro Well ausgesät und nach 24 Stunden mit der entsprechenden Konzentrationsreihe von Substanzen (angepasst an die jeweiligen IC₅₀-Werte) behandelt. Nach 72 Stunden wurden die Zellen mit CellTiter-Glo-Reagenz gemischt und nach 10 Minuten die Fluoreszenzsignale mit einem Glomax Microplate Reader (33) gemessen. Anhand der Ergebnisse wurde mittels Microsoft Excel die Inhibitionsrate des Zellwachstums berechnet und mithilfe des R-Packages synergyfinder die Inhibition und der Bliss-Score (für Synergismus bei zwei unabhängig voneinander wirkenden Substanzen) berechnet und visualisiert (54).

2.2.7 Statistische Analyse

Zur Berechnung der IC₅₀- oder AUC-Werte sowie zur graphischen Darstellung der Kaplan-Meier-Kurve mit dem log-rank-Test der unbehandelten und behandelten Mäuse wurde Graph Pad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc.) verwendet. Dieses Programm wurde außerdem für die Durchführung eines doppelten t-Tests zum Vergleich aller intervallskalierten Variablen sowie eines chi-square Test für alle kategorischen Variablen genutzt. Die chemilumineszenten Bilddaten des Western Blot wurden mithilfe von Fiji (NIH Image, Maryland, USA) analysiert.

Die Berechnung und Visualisierung der Excess-over-Bliss-Werte erfolgte mit dem R-Paket synergyfinder (54).

2.3 Ergebnisse

Die Studie (21) verfolgte zwei übergeordnete Ziele: Erstens sollte der anti-tumorale Effekt des BRD4-Inhibitors MK-8628 in präklinischen Modellen des Medulloblastoms *in vitro* und *in vivo* im Vergleich zu BET-Inhibitoren früherer Generation evaluiert werden. Zweitens sollte der synergistische Effekt der kombinierten Behandlung mit einem BRD4- und einem PLK1-Inhibitor als eine neue Möglichkeit in der Therapie des Medulloblastoms untersucht werden. Die Ergebnisse der Monosubstanzbehandlung mit MK-8628 sowie der Kombinationstherapie werden hier zusammengefasst.

2.3.1 Monotherapie der Medulloblastom-Zelllinien mit BRD4-Inhibitor MK-8628 *in vitro* und *in vivo*

2.3.1.1 MK-8628 reduziert Zellviabilität der Medulloblastom-Zelllinien

Der BRD4-Inhibitor MK-8628 zeigte sich in den vier Medulloblastom-Zelllinien HD-MB03 (Gruppe 3 mit *MYC*-Amplifikation, Hochrisiko-Gruppe), ONS-76 und DAOY (SHH-Gruppe mit hoher *MYC*-Expression ohne Amplifikation), UW228 (SHH-Gruppe mit niedriger *MYC*-Expression) als effektiv durch signifikante Reduktion der Zellviabilität schon bei niedrigen Konzentrationen zwischen 142,0 und 448,6 nM ((21) Abb. 1A, Suppl. Abb. 1A, Suppl. Abb. 1B). Die Zelllinien mit hohem *MYC*-Expressionsgrad (HD-MB03, DAOY und ONS-76) zeigten niedrigere IC₅₀-Werte als die Zelllinie mit niedriger *MYC*-Expression (UW228) ((21) Abb. 1A, Suppl. Abb. 1A).

Gleichzeitig führte die Behandlung mit MK-8628 zur Reduktion der Zellproliferation ((21) Abb. 1B, Suppl. Abb. 1C) und induzierte Zelltod durch Apoptose in den Medulloblastom-Zelllinien ((21) Abb. 1C, Suppl. Abb. 1D). Dieser Effekt ist in der *MYC*-amplifizierten Zelllinie HD-MB03 am deutlichsten erkennbar (21) .

Die Zellzyklusanalyse zeigte, dass die MK-8628-Behandlung der Zelllinie HD-MB03 zu einer Zunahme der Zellfraktion in der Sub-G1-Phase und eine Abnahme an Zellen in der G1- und S-Phasen führte ((21) Abb. 1D, 1E, 1F).

Diese Ergebnisse zeigten insgesamt, dass MK-8628 einen ähnlichen anti-proliferativen Effekt in Medulloblastom-Zelllinien wie vorher beschriebene BET-Inhibitoren besitzt (21).

2.3.1.2 Suppression des *MYC*-Expressionsprogramms durch MK-8628

Der Western Blot der mit MK-8628 behandelten Medulloblastom-Zelllinien zeigte eine unveränderte BRD4-Expression und variable Reduktion der Proteinexpression der Targets des BRD4 wie *MYC*, *WEE1*, *E2F1* und *CCND1* ((21) Abb. 2A, 2B, Suppl. Abb. 1E). Die an der Zelllinie HD-MB03 durchgeführte RT-qPCR zeigte entsprechend eine Reduktion im Gehalt der mRNA-Transkripte für *MYC* und *CCND1*. Eine Kurzzeitbehandlung, gefolgt von einem Washout, führte zu einer Reduktion der *CCND1*-mRNA für mindestens 24 Stunden nach der Behandlung, was auf einen Langzeiteffekt des MK-8628 hinweist ((21) Abb. D).

Der Effekt des MK-8628 auf das *MYC*-Expressionsprogramms *in vitro* wurde an der *MYC*-amplifizierten Zelllinie HD-MB03 anhand einer Genexpressionsanalyse mit einem Gene Microarray evaluiert. Es zeigte sich ein klarer Unterschied zwischen der DMSO-Kontrolle und der mit MK-8628 behandelten Probe in den 50 am meisten differenziert exprimierte Genen ((21) Abb. 2E). MK-8628 führte zu einer ähnlichen Unterbrechung von Genexpressionsprogrammen der *MYC/MYCN*-Targets wie der ältere BET-Inhibitor JQ1 ((21) Abb. 2F). Ferner wurden anhand der Gene Ontology (GO)-Analyse Störung in für den Zellzyklus wichtigen Signalwege wie der Chromatinregulation gefunden, was der beschriebenen Funktion von BRD4 entspricht ((21) Abb. 2G). Die Gene Set Enrichment-Analyse (GSEA) zeigte 50 signifikant veränderte Signalwege. Darunter waren auch BET-relevante Wege wie *MYC*- und *E2F*-Signalwege signifikant herunterreguliert ((21) Abb. 2H). Zusammenfassend störte MK-8626 effektiv das BRD4-regulierte Expressionsprogramm im *MYC*-abhängigen Medulloblastom (21).

2.3.1.3 Oral appliziertes MK-8628 führt zu Tumorsuppression und Induktion von Apoptose in Xenograft-Mäusen mit *MYC*-amplifizierten Medulloblastomen

Basierend auf den positiven Ergebnissen der Experimente *in vitro* wurde eine Untersuchung der Wirkung von MK-8628 auf das *MYC*-amplifizierte Hochrisiko-Medulloblastom *in vivo* durchgeführt (21). Die orale Applikation von MK-8628 bei Xenograft-Mäusen mit Tumoren aus der HD-MB03-Zelllinie führte zu einer signifikanten Reduktion des Tumolvolumens über die Zeit ((21) Abb. 3A), begleitet von einer signifikant verbesserten Überlebensrate dieser Mäuse im Vergleich zur Negativkontrolle ((21) Abb. 3B). MK-8628 war trotzdem weniger effektiv als das in der Positivkontrolle verwendete Cyclophosphamid und wirkte nicht kurativ auf den Tumor ((21) Abb. 3A und 3B). Es ist auch zu erwähnen, dass sich zwischen der einmaligen und zweimaligen Behandlung von Xenograft-Mäuse mit MK-8628 kein signifikanter Unterschied im Tumorwachstum zeigte ((21) Abb. 3A und 3B). Die immunhistochemische Untersuchung der Tumoren aus mit MK-8628 behandelten Mäusen

zeigte eine signifikante Abnahme im Anteil der proliferierenden Zellen (sichtbar gemacht durch Ki67-Färbung) sowie eine signifikante Zunahme apoptotischer Zellen (identifiziert mithilfe von Cleaved Caspase-3-Färbung) ((21) Abb. 3C und 3D). Diese Ergebnisse sind konsistent mit den Resultaten der Versuche *in vitro* (21).

2.3.2 Kombinationstherapie der Medulloblastom-Zelllinien mit BRD4-Inhibitor MK-8628 und PLK1-Inhibitor Volasertib oder GSK461364A *in vitro*

Obwohl MK-8628 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* einen signifikanter anti-tumoralen Effekt gegen Medulloblastome zeigte ((21) Abb. 1, Abb. 2, Abb. 3), war seine Wirkung wie bei den BET-Inhibitoren der früheren Generation nicht ausreichend, um eine dauerhafte Tumorregression zu erzielen (6, 21). Daher wurde in der vorgelegten Studie nach weiteren Agenzien, die ebenfalls auf die MYC-Expression und dessen Signalwege abzielen, als Kombinationspartner für MK-8628 gesucht (21). Bei den PLK1-Inhibitoren ist eine Wirkung gegen Medulloblastome durch Hemmung der Zellproliferation und Desregulation der MYC-Stabilität bekannt (27, 29, 30). Außerdem wurde erst kürzlich ein synergistischer Effekt solcher PLK1-Inhibitoren kombiniert mit einem BRD4-Inhibitor in Leukämiezellen gezeigt (32). Aus diesem Grund ist die Untersuchung der Wirksamkeit dieser Kombination gegen Medulloblastome als sinnvoll zu erachten (21).

Aus der Gruppe der PLK1-Inhibitoren wurde in dieser Studie Volasertib (BI-6727) ausgewählt (21). Zuerst wurde seine Wirkung im Medulloblastom durch ein Zellviabilitätsassay geprüft. Dabei zeigte sich eine signifikante Reduktion der Zellviabilität in allen vier Zelllinien schon bei niedrigen Konzentrationen der Wirkstoffe (4,1 nM – 32,4 nM) ((21) Abb. 4A). In den Zelllinien mit hohem MYC-Gehalt (HD-MB03, DAOY und ONS-76) waren die IC₅₀-Werte niedriger als in der Zelllinie mit niedrigerer MYC-Expression (UW228). Die MYC-amplifizierte HD-MB03-Zelllinie reagierte am sensitivsten gegenüber einer Behandlung mit dem PLK1-Inhibitor ((21) Abb. 4A).

In neueren Studien über Volasertib wurde über dessen Fähigkeit berichtet, in hohen Konzentrationen (350 nM – 770 nM) auch an BRD4 zu binden (55). Obwohl diese Konzentrationen viel höher liegen als in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten, wurde zusätzlich GSK461364A als spezifischeren Inhibitor der PLK1 getestet, um den Synergismus unabhängig von off-Target-Wirkungen bewerten zu können (21). Das Zellviabilitätsassay mit GSK461364A wurde wie oben beschrieben durchgeführt und zeigte wiederum eine signifikante Reduktion der Zellviabilität in allen vier Zelllinien bei niedrigen IC₅₀ (7,6 nM – 170,9 nM, außer bei DAOY mit IC₅₀ = 5285,0 nM) (Suppl. Abb. 2A).

Anhand dieser Daten wurde als nächstes den Synergismus des PLK1-Inhibitors mit dem BRD4-Inhibitor bewertet (21). Basierend auf den IC₅₀-Werte wurden für jede Substanz eine Konzentrationsreihe aus jeweils sechs verschiedenen Konzentrationen hergestellt und zur Behandlung von vier Medulloblastom-Zelllinien kombiniert (21). Bei der Kombination von MK-8628 mit Volasertib ergab die Excess-over-Bliss-Analyse einen synergistischen Effekt für die Zelllinien HD-MB03, DAOY und ONS-76 ((21) Abb. 4B, Suppl. Abb. 2B). Der stärkste Synergismus zeigte sich in den Zelllinien DAOY und ONS-76, während die Kombination in der *MYC*-armen Zelllinie UW228 interessanterweise antagonistisch wirkte ((21) Suppl. Abb. 2B). Dieses Ergebnis könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Effektivität des kombinierten BRD4-PLK1-Inhibitors *MYC*-abhängig ist (21). Die Kombination aus MK-8628 und GSK461364A ergab ebenfalls einen synergistischen Behandlungseffekt in Medulloblastom-Zelllinien ((21) Suppl. Abb. 2C). Die größte Wirkung wurde in den *MYC*-reichen Zelllinien DAOY und HD-MB03 gezeigt ((21) Suppl. Abb. 2C).

Auf der molekulare Ebene zeigten sich die Effektivität der Kombination aus MK-8628 und Volasertib konsistent mit dieser Ergebnis des Synergy-Scores: in der *MYC*-amplifizierten Zelllinie HD-MB03 wurde die mRNA-Expression von *MYC* durch die Kombinationsbehandlung signifikant supprimiert ((21) Abb. 4C). Auch in der Proteinexpression von *MYC*, *CCND1* und *WEE1* wurde nach Kombinationsbehandlung eine größere Reduktion beobachtet als bei einer Monosubstanzbehandlung, begleitet durch eine signifikante Reduktion der Expression von autophosphorylierten pPLK1, die als ein Marker für die PLK1-Aktivität dient ((21) Abb. 4C und 4D). Übereinstimmend wurde nach kombinierter Behandlung in der Zellzyklusanalyse von HD-MB03- und DAOY-Kulturen eine signifikante Zunahme der Zellfraktion in der Sub-G1-Phase und eine Abnahme an Zellen in der G1- und S-Phase im Vergleich zur Monosubstanzbehandlung festgestellt ((21) Abb. 4E, 4F, 4G, Suppl. Abb. 3).

2.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend konnte in der Studie ein antiproliferativer Effekt des niedermolekularen BRD4-Inhibitors MK-8628 in Medulloblastomen gezeigt werden, der vergleichbar mit bereits beschriebenen BET-Inhibitoren ist. MK-8626 störte effektiv das BRD4-regulierte Expressionsprogramm im *MYC*-abhängigen Hochrisiko-Medulloblastom. Auch *in vivo* zeigte MK-8626 eine effektive Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion im *MYC*-abhängigen Medulloblastom, gefolgt von einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums und Verlängerung der Überlebenszeit der Xenograft-Mäuse. Diese Ergebnisse heben das Potential

von MK-8628 als einen klinisch anwendbaren BRD4-Inhibitor für Medulloblastom-Patienten hervor (21).

Weiterhin zeigte die Kombination aus BRD4- und PLK1-Inhibitoren einen signifikanten, synergistischen anti-tumoralen Effekt im Medulloblastom durch effektive Störung der Funktion von BRD4 und PLK1, etwa in ihrer wesentlichen Rolle in der Aufrechterhaltung der *MYC*-mRNA-Expression sowie der Stabilität des *MYC*-Proteins (Abb. 3). Somit stellte diese Studie die Anwendung einer Kombination aus BRD4- und PLK1-Inhibitoren als Möglichkeit in der Therapie des Hochrisiko-Medulloblastoms vor (21).

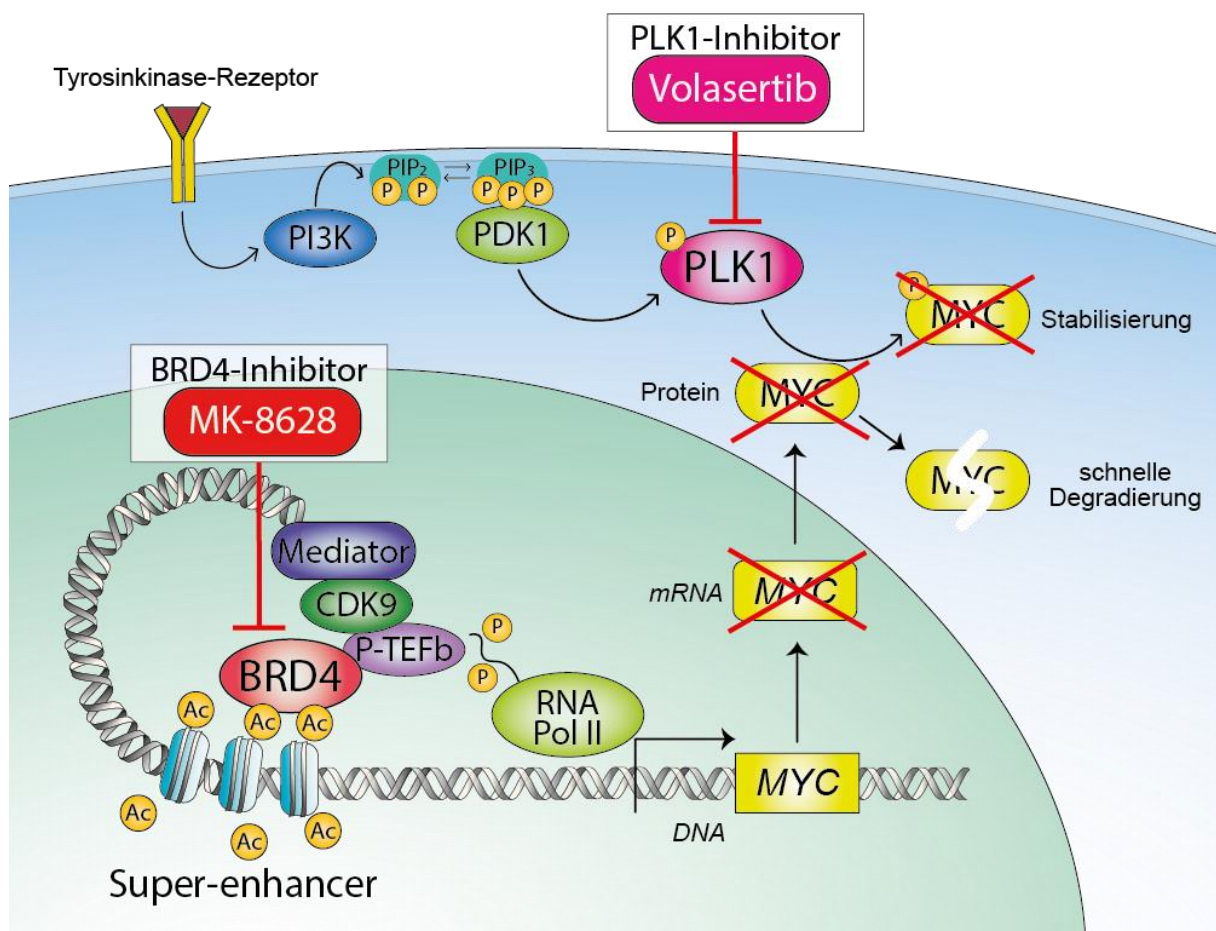


Abbildung 3: Simultane Inhibition von BRD4 und PLK1 durch Kombinationsbehandlung führt zu einer effektiveren Reduktion der *MYC*-Genexpression sowie der *MYC*-Proteinstabilität. Durch MK-8628 wird die Interaktion zwischen BRD4 und den acetylierten Histonen in der Super-Enhancer-Region aufgehoben, sodass die Transkription der *MYC*-mRNA herabgesetzt wird. Gleichzeitig hemmt Volasertib die *MYC*-stabilisierende Funktion der PLK1 und führt so zur schnelleren Degradierung des *MYC*-Proteins. Durch diese Kombinationsbehandlung aus BRD4- und PLK1-Inhibitoren können die *MYC*-Expression und die nachfolgenden *MYC*-Signalwege effektiv gestört werden (14, 21, 22, 28).

2.4 Weiterführende wissenschaftliche Fragestellungen

2.4.1 Ideale Biomarker für die zukünftige Einführung von BRD4-Inhibitoren in klinischen Versuchen

Für die Einführung von BRD4-Inhibitoren in klinischen Studien ist es essenziell, einen passenden Biomarker für die Selektion von Kandidaten zu kennen. Auch wenn der Mechanismus des BET-Inhibitors als anti-tumorale Agens nicht uniform und noch nicht in vollständig geklärt ist, bleibt die Expression von tumorwachstumsfördernden Onkogenen wie *MYC* das eindeutigste Charakteristikum der auf der Behandlung hypersensitiv reagierenden Tumorzellen (18). Wie in vorhergehenden Arbeiten von sowohl unserer als auch weiterer Forschungsgruppen wurde in dieser Studie der höchste anti-tumorale Effekt von MK-8628 im *MYC*-amplifizierten Hochrisiko-Medulloblastom beobachtet (21). MK-8628 zeigte aber auch einen deutlichen Effekt in der *MYC*-armen Medulloblastom-Zelllinie UW228, welche zur SHH-Gruppe der vier Medulloblastom-Subtypen zählt. Tang et al. zeigte, dass BRD4 auch die Transkription des *GLI*-Transkriptionsfaktors beeinflusst, der den SMO-Pathway der Hedgehog-Signalkaskade reguliert (56). Weitere Studien berichteten, dass alle Gene, die durch Super-Enhancer reguliert und somit reich an acetylierte Histon und BRD4 sind, hypersensitiv auf BRD4-Inhibitoren reagieren (15, 57, 58). *MYC* und die Aktivität des SHH-Signalwegs sind beide messbar und könnten als Biomarker für die Einlasskriterien für klinische Studien dienen. Dennoch sind für die Bestimmung von geeigneten Biomarkern für die Einführung von BRD4-Inhibitoren in klinische Versuche weitere Analysen erwünscht.

2.4.2 Geeignete pharmakodynamische Marker zur Auswertung der Reaktion des Tumors auf die Behandlung mit BRD4-Inhibitoren auf molekularer Ebene

In der Klinik ist es ebenso wichtig, dass die Wirkung der BRD4-Inhibition effizient messbar ist. Auch hier sind das *MYC*-Protein und die zugehörige *MYC*-mRNA die zuverlässigsten Marker in mit BRD4-Inhibitor behandelten Tumoren (6, 14). Durch BRD4-Inhibition wird, obwohl BRD4 ein globaler Regulator der Gentranskription ist, nur eine bestimmte Gruppe von Genen in ihrer Transkription gestört, vor allem Onkogene (59). Während der genaue Mechanismus dahinter noch ungeklärt ist, stellten Xu und Vakoc folgenden Mechanismus vor: BRD4-Inhibitoren supprimieren vorwiegend Gene, die dynamisch durch exogene Stimuli sowie mehrere trans- und cis-Regulatoren beeinflusst werden (18). Das gilt für viele wachstumsfördernde oder tumorinduzierende Gene, inklusive *MYC*, die deswegen als pharmakodynamische Marker der BRD4-Inhibition angewandt werden können (18). In der vorgelegte Studie wurde ebenfalls eine signifikante Suppression der *MYC*-Expression in Medulloblastom-Zelllinien durch die Behandlung mit MK-8628 beobachtet (21), und somit

MYC als ein effizienter pharmakodynamischer Marker für künftige klinische Versuche mit BRD4-Inhibitoren vorgestellt.

2.4.3 Vergleich von MK-8628 mit BRD4-Inhibitoren der Vorgängergeneration

Diese Studie stellte das MK-8628 dem älteren BET-Inhibitor JQ1 gegenüber, um die pharmakologischen Charakteristika der beiden Substanzen zu vergleichen und ihre klinische Anwendbarkeit zu erwägen. Veränderungen in den untersuchten Genexpressionsmustern nach Applikation beider Inhibitoren zeigten eine hohe Gemeinsamkeit und eine ähnliche Spezifität gegenüber ihren Targets. Auch wirkten beide Inhibitoren bereits in niedrigen Konzentrationsbereichen effektiv gegen das Medulloblastom (6, 21). Der große Unterschied besteht darin, dass MK-8628 oral bioverfügbar ist und somit in der Klinik Vorteile hat (24). Auch *in vivo* führte MK-8628 wie JQ1 zur effektiven Suppression der *MYC*-abhängigen Tumoren und zur Verlängerung der Überlebenszeit der Xenograft-Mäuse, und zeigte somit sein Potential als BRD4-Inhibitor, der auch in der klinischen Anwendung messbare Effekte verspricht. Sowohl JQ1 als auch MK-8628 wirkten jedoch nicht kurativ auf das Xenograft-Medulloblastom (6, 21). Auch in klinischen Studien in Phase I/II an Patienten mit BRD4-abhängigem NUT midline carcinoma beobachtete man ein Rezidiv einige Monaten nach Remission (60). Da eine Monosubstanzbehandlung mit dem BRD4-Inhibitor nicht suffizient gegen das Medulloblastom zu sein scheint, ist der nächste logische Schritt, die Kombination von der Substanz mit einem anderen zielgerichteten Agens zu testen, um eine synergistische Verstärkung des anti-tumoralen Effektes zu erzielen.

2.4.4 Kombination vom BRD4-Inhibitor mit weiteren Agenzien wie PLK1-Inhibitoren zur effektiveren Behandlung

Es sind verschiedene Wirkstoffe bekannt, die in Kombination mit BRD4-Inhibitoren einen anti-tumoralen Effekt in präklinischen Studien gezeigt haben. Bei der Auswahl eines weiteren Agens ist es wichtig, dass er den Wirkungsmechanismus des BRD4-Inhibitors effektiv unterstützen kann. Wie oben beschrieben, beruht die Inhibition von BRD4 auf der Störung der *MYC*-Transkription und -Expression. Über den PLK1-Inhibitor ist bekannt, dass er bei der Regulation der *MYC*-Protein-Stabilität eine wichtige Rolle spielt (42). In einer Studie mit akuter myeloischen Leukämie demonstrierte diese Kombination ein sehr gutes Resultat (32). In der vorgelegten Studie zeigte die kombinierte BRD4- und PLK1-Inhibition ebenfalls einen signifikanten synergistischen Effekt in *MYC*-reichen Medulloblastom-Subgruppen. In der *MYC*-armen Zelllinie UW228 wurde dagegen ein antagonistischer Effekt beobachtet, was auf einen noch zu klärenden Mechanismus der Interaktion zwischen den beiden Inhibitoren

hinweist und gleichzeitig das Potenzial von *MYC* als Marker des simultanen Targeting von BRD4 und PLK1 im Medulloblastom erhärtet.

2.4.5 Möglichkeit eines dualen BRD4/PLK1-Inhibitors

Interessanterweise wurde es erst kürzlich beschrieben, dass einige Kinase-Inhibitoren gleichzeitig dazu fähig sind, an der Acetyl-Lysin-Domäne von BRD4 zu binden. Durch Exploration solcher Moleküle haben Wang et al. erfolgreich duale BRD4/PLK1-Inhibitoren hergestellt, die selektiv und simultan an BRD4 und PLK1 binden können (61). Basierend auf der Beobachtung von synergistischen Effekten der BRD4- und PLK1-Inhibitoren in dieser Studie hat unsere Arbeitsgruppe ferner diese neuen dualen BRD4/PLK1-Inhibitoren in *MYC*-abhängigen pädiatrischen Tumoren getestet unter der Hypothese, dass ein gleichzeitiges Targeting von zwei *MYC*-Regulatoren durch ein Molekül ebenso eine gute Effektivität zeigen kann (62). Durch Screening von 49 verschiedenen dualen Inhibitoren wurden zwei Kandidaten ermittelt, UMB160 und UMB103, die eine hohe Inhibitionsfähigkeit ihrer Targets, breite therapeutische Fenster und weniger Toxizität gegenüber normalen Zellen aufwiesen (62). Wie erwartet zeigte die duale Inhibition einen signifikanten anti-tumoralen Effekt im *MYC*-abhängigen Medulloblastom, Neuroblastom und Rhabdomyosarkom *in vitro* (62). Im Medulloblastom führten beide duale Inhibitoren in niedrigen Konzentrationen zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität in allen vier Zelllinien ((62) Suppl. Abb. 5C und 5D). Sie senkten ferner effektiv die Proteinexpression des *MYC* und seiner Targets in einem ähnlichen Ausmaß wie die synergistische Kombinationsbehandlung aus BRD4- und PLK1-Inhibitoren ((62) Abb. 5A). Zellzyklusanalyse von mit UMB160 und UMB103 behandelten Hochrisiko-Medulloblastomen der Zelllinie HB-MB03 zeigte eine signifikante Abnahme der Zellfraktionen in der S- und G1-Phase bei gleichzeitiger Zunahme der Zellfraktion in der Sub-G1-Phase ((62) Suppl. Abb. 6H-6K). Die signifikanten Effekte der niedermolekularen dualen BRD4/PLK1-Inhibitoren auf Ebene der Zellproliferationshemmung, die Störung der Proteinexpression der BRD4- und PLK1-Targets, sowie der Zellzyklusarrest stellen ihr Potential als effektives Mittel gegen *MYC*-abhängige Tumore, wie die Hochrisiko-Gruppe des Medulloblastoms, auf ein klinisch relevantes Niveau (62).

2.5 Literaturverzeichnis

1. Kumar V, Kumar V, McGuire T, Coulter DW, Sharp JG, Mahato RI. Challenges and Recent Advances in Medulloblastoma Therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2017;38(12):1061-84.
2. Ivanov DP, Coyle B, Walker DA, Grabowska AM. In vitro models of medulloblastoma: Choosing the right tool for the job. *J Biotechnol.* 2016;236:10-25.
3. Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, Remke M, Cho YJ, Clifford SC, Eberhart CG, Parsons DW, Rutkowski S, Gajjar A, Ellison DW, Lichter P, Gilbertson RJ, Pomeroy SL, Kool M, Pfister SM. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol.* 2012;123(4):465-72.
4. Northcott PA, Dubuc AM, Pfister S, Taylor MD. Molecular subgroups of medulloblastoma. *Expert Review of Neurotherapeutics.* 2012;12(7):871-84.
5. Ellison DW, Kocak M, Dalton J, Megahed H, Lusher ME, Ryan SL, Zhao W, Nicholson SL, Taylor RE, Bailey S, Clifford SC. Definition of disease-risk stratification groups in childhood medulloblastoma using combined clinical, pathologic, and molecular variables. *J Clin Oncol.* 2011;29(11):1400-7.
6. Henssen AG, Thor T, Odersky A, Heukamp L, El-Hindy N, Beckers A, Speleman F, Althoff K, Schafers S, Schramm A, Sure U, Fleischhack G, Eggert A, Schulte JH. BET bromodomain protein inhibition is a therapeutic option for medulloblastoma. *Oncotarget.* 2013;4(11):2045-56.
7. 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(11):1424-30.
8. Northcott PA, Robinson GW, Kratz CP, Mabbott DJ, Pomeroy SL, Clifford SC, Rutkowski S, Ellison DW, Malkin D, Taylor MD, Gajjar A, Pfister SM. Medulloblastoma. *Nat Rev Dis Primers.* 2019;5(1):11.
9. Horiuchi D, Anderton B, Goga A. Taking on challenging targets: making MYC druggable. *American Society of Clinical Oncology Educational Book American Society of Clinical Oncology Meeting.* 2014:e497-502.
10. Chen H, Liu H, Qing G. Targeting oncogenic Myc as a strategy for cancer treatment. *Signal Transduct Target Ther.* 2018;3:5.
11. Häcker S, Karl S, Mader I, Cristofanon S, Schweitzer T, Krauss J, Rutkowski S, Debatin K-M, Fulda S. Histone deacetylase inhibitors prime medulloblastoma cells for chemotherapy-induced apoptosis by enhancing p53-dependent Bax activation. *Oncogene.* 2011;30(19):2275-81.
12. Barneda-Zahonero B, Parra M. Histone deacetylases and cancer. *Molecular Oncology.* 2012;6(6):579-89.
13. 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(6):904-17.

14. Henssen AG, Althoff K, Odersky A, Beckers A, Koche R, Speleman F, Schäfers S, Bell E, Nortmeyer M, Westermann F, De Preter K, Florin A, Heukamp L, Spruessel A, Astrahanseff K, Lindner S, Sadowski N, Schramm A, Astorgues-Xerri L, Riveiro ME, Eggert A, Cvitkovic E, Schulte JH. Targeting MYCN-Driven Transcription By BET-Bromodomain Inhibition. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 2016;22(10):2470-81.
15. Lovén J, Hoke HA, Lin CY, Lau A, Orlando DA, Vakoc CR, Bradner JE, Lee TI, Young RA. Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell*. 2013;153(2):320-34.
16. Wu S-Y, Chiang C-M. The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(18):13141-5.
17. Rahman S, Sowa ME, Ottinger M, Smith JA, Shi Y, Harper JW, Howley PM. The Brd4 extraterminal domain confers transcription activation independent of pTEFb by recruiting multiple proteins, including NSD3. *Molecular and Cellular Biology*. 2011;31(13):2641-52.
18. Xu Y, Vakoc CR. Targeting Cancer Cells with BET Bromodomain Inhibitors. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;7(7).
19. Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, Shen Y, Smith WB, Fedorov O, Morse EM, Keates T, Hickman TT, Felletar I, Philpott M, Munro S, McKeown MR, Wang Y, Christie AL, West N, Cameron MJ, Schwartz B, Heightman TD, La Thangue N, French CA, Wiest O, Kung AL, Knapp S, Bradner JE. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature*. 2010;468(7327):1067-73.
20. Yang Z, He N, Zhou Q. Brd4 recruits P-TEFb to chromosomes at late mitosis to promote G1 gene expression and cell cycle progression. *Mol Cell Biol*. 2008;28(3):967-76.
21. Han Y, Lindner S, Bei Y, Garcia HD, Timme N, Althoff K, Odersky A, Schramm A, Lissat A, Kunkele A, Deubzer HE, Eggert A, Schulte JH, Henssen AG. Synergistic activity of BET inhibitor MK-8628 and PLK inhibitor Volasertib in preclinical models of medulloblastoma. *Cancer Lett*. 2019;445:24-33.
22. Posternak V, Cole MD. Strategically targeting MYC in cancer. *F1000Res*. 2016;5.
23. Alqahtani A, Choucair K, Ashraf M, Hammouda DM, Alloghbi A, Khan T, Senzer N, Nemunaitis J. Bromodomain and extra-terminal motif inhibitors: a review of preclinical and clinical advances in cancer therapy. *Future Sci OA*. 2019;5(3):FSO372.
24. Boi M, Gaudio E, Bonetti P, Kwee I, Bernasconi E, Tarantelli C, Rinaldi A, Testoni M, Cascione L, Ponzoni M, Mensah AA, Stathis A, Stussi G, Riveiro ME, Herait P, Inghirami G, Cvitkovic E, Zucca E, Bertoni F. The BET Bromodomain Inhibitor OTX015 Affects Pathogenetic Pathways in Preclinical B-cell Tumor Models and Synergizes with Targeted Drugs. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 2015;21(7):1628-38.
25. Noel JK, Ooike S, Sugahara K, Nakamura H, Daibata M. Development of the BET bromodomain inhibitor OTX015. *Proceeding of the 2013 AACR- NCI-EORTC Molecular Targets and Cancer Therapeutics Conference*. 2013:414.
26. Herait P, Berthon C, Thieblemont C, Raffoux E, Magarotto V, Stathis A, Thomas X, Leleu X, Gomez-Roca C, Odore E, Roumier C, Bourdel F, Quesnel B, Zucca E, Michallet M, Recher C, Cvitkovic E, Rezai K, Preudhomme C, Facon T, Palumbo A,

- Dombret H. BET-bromodomain inhibitor OTX015 shows clinically meaningful activity at nontoxic doses: interim results of an ongoing phase I trial in hematologic malignancies. In: Research IPottAMotAAfC, editor. AACR; 2014 Apr 5-9; San Diego, CA. Philadelphia (PA)2014.
27. Liu Z, Sun Q, Wang X. PLK1, A Potential Target for Cancer Therapy. *Translational Oncology*. 2016;10(1):22-32.
 28. Cunningham JT, Ruggero D. New connections between old pathways: PDK1 signaling promotes cellular transformation through PLK1-dependent MYC stabilization. *Cancer Discov*. 2013;3(10):1099-102.
 29. Ackermann S, Goeser F, Schulte JH, Schramm A, Ehemann V, Hero B, Eggert A, Berthold F, Fischer M. Polo-like kinase 1 is a therapeutic target in high-risk neuroblastoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(4):731-41.
 30. Triscott J, Lee C, Foster C, Manoranjan B, Pambid MR, Berns R, Fotovati A, Venugopal C, O'Halloran K, Narendran A, Hawkins C, Ramaswamy V, Bouffet E, Taylor MD, Singhal A, Hukin J, Rassekh R, Yip S, Northcott P, Singh SK, Dunham C, Dunn SE. Personalizing the treatment of pediatric medulloblastoma: Polo-like kinase 1 as a molecular target in high-risk children. *Cancer Research*. 2013;73(22):6734-44.
 31. Tan J, Li Z, Lee PL, Guan P, Aau MY, Lee ST, Feng M, Lim CZ, Lee EYJ, Wee ZN, Lim YC, Karuturi RKM, Yu Q. PDK1 signaling toward PLK1-MYC activation confers oncogenic transformation, tumor-initiating cell activation, and resistance to mTOR-targeted therapy. *Cancer Discovery*. 2013;3(10):1156-71.
 32. Tontsch-Grunt U, Rudolph D, Waizenegger I, Baum A, Gerlach D, Engelhardt H, Wurm M, Savarese F, Schweifer N, Kraut N. Synergistic activity of BET inhibitor BI 894999 with PLK inhibitor volasertib in AML in vitro and in vivo. *Cancer Letters*. 2018;421:112-20.
 33. Promega Corporation. CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. Verfügbar auf: https://www.promega.de/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter_glo-luminescent-cell-viability-assay/?catNum=G7570#protocols. Letzter Zugriff: 19.11.2019.
 34. RS. W. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Research*. 2011;30(1):87().
 35. Roche. Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric). 2018. Verfügbar auf: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/Bulletin/1/11647229001bul.pdf>. Letzter Zugriff: 19.11.2019.
 36. Thermo Fisher Scientific. Click-iT® EdU Flow Cytometry Cell Proliferation Assay. Verfügbar auf: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/flow-cytometry-protocol/cell-proliferation/standard-click-it-edu-flow-cytometry-cell-proliferation-assay.html>. Letzter Zugriff: 19.11.2019.
 37. Thermo Fisher Scientific. Real-time PCR handbook. 2014. Verfügbar auf: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf>. Letzter Zugriff: 19.11.2019.
 38. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. 2002;3(7):RESEARCH0034.

39. Applied Biosystems. Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™. 2010. Verfügbar auf: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_046739.pdf. Letzter Zugriff: 19.11.2019.
40. Garcia PL, Miller AL, Gamblin TL, Council LN, Christein JD, Arnoletti JP, Heslin MJ, Reddy S, Richardson JH, Cui X, van Waardenburg R, Bradner JE, Yang ES, Yoon KJ. JQ1 Induces DNA Damage and Apoptosis, and Inhibits Tumor Growth in a Patient-Derived Xenograft Model of Cholangiocarcinoma. *Mol Cancer Ther.* 2018;17(1):107-18.
41. Silva VC, Cassimeris L. Stathmin and microtubules regulate mitotic entry in HeLa cells by controlling activation of both Aurora kinase A and Plk1. *Mol Biol Cell.* 2013;24(24):3819-31.
42. Xiao D, Yue M, Su H, Ren P, Jiang J, Li F, Hu Y, Du H, Liu H, Qing G. Polo-like Kinase-1 Regulates Myc Stabilization and Activates a Feedforward Circuit Promoting Tumor Cell Survival. *Molecular Cell.* 2016;64(3):493-506.
43. Thermo Fisher Scientific. Pierce™BCA Protein Assay Kit. Verfügbar auf: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf. Letzter Zugriff: 20.11.2019.
44. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JYH, Zhang J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology.* 2004;5(10):R80.
45. Hong F, Breitling R, McEntee CW, Wittner BS, Nemhauser JL, Chory J. RankProd: a bioconductor package for detecting differentially expressed genes in meta-analysis. *Bioinformatics (Oxford, England).* 2006;22(22):2825-7.
46. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS.* 2012;16(5):284-7.
47. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2005;102(43):15545-50.
48. Liberzon A, Subramanian A, Pinchback R, Thorvaldsdóttir H, Tamayo P, Mesirov JP. Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. *Bioinformatics.* 2011;27(12):1739-40.
49. Stegmaier K, Wong JS, Ross KN, Chow KT, Peck D, Wright RD, Lessnick SL, Kung AL, Golub TR. Signature-based small molecule screening identifies cytosine arabinoside as an EWS/FLI modulator in Ewing sarcoma. *PLoS Med.* 2007;4(4):e122.
50. Zeller KI, Jegga AG, Aronow BJ, O'Donnell KA, Dang CV. An integrated database of genes responsive to the Myc oncogenic transcription factor: identification of direct genomic targets. *Genome Biology.* 2003;4(10):R69.
51. Kim YH, Girard L, Giacomini CP, Wang P, Hernandez-Boussard T, Tibshirani R, Minna JD, Pollack JR. Combined microarray analysis of small cell lung cancer reveals altered apoptotic balance and distinct expression signatures of MYC family gene amplification. *Oncogene.* 2006;25(1):130-8.

52. Schuhmacher M, Kohlhuber F, Hölzel M, Kaiser C, Burtscher H, Jarsch M, Bornkamm GW, Laux G, Polack A, Weidle UH, Eick D. The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic Acids Research*. 2001;29(2):397-406.
53. Westermann F, Muth D, Benner A, Bauer T, Henrich K-O, Oberthuer A, Brors B, Beissbarth T, Vandesompele J, Pattyn F, Hero B, König R, Fischer M, Schwab M. Distinct transcriptional MYCN/c-MYC activities are associated with spontaneous regression or malignant progression in neuroblastomas. *Genome Biology*. 2008;9(10):R150.
54. He L, Kuleskiy E, Saarela J, Turunen L, Wennerberg K, Aittokallio T, Tang J. Methods for High-throughput Drug Combination Screening and Synergy Scoring. *Methods Mol Biol*. 2018;1711:351-98.
55. Rudolph D, Impagnatiello MA, Blaukopf C, Sommer C, Gerlich DW, Roth M, Tontsch-Grunt U, Wernitznig A, Savarese F, Hofmann MH, Albrecht C, Geiselman L, Reschke M, Garin-Chesa P, Zuber J, Moll J, Adolf GR, Kraut N. Efficacy and mechanism of action of volasertib, a potent and selective inhibitor of Polo-like kinases, in preclinical models of acute myeloid leukemia. *J Pharmacol Exp Ther*. 2015;352(3):579-89.
56. Tang Y, Gholamin S, Schubert S, Willardson MI, Lee A, Bandopadhyay P, Bergthold G, Masoud S, Nguyen B, Vue N, Balansay B, Yu F, Oh S, Woo P, Chen S, Ponnuswami A, Monje M, Atwood SX, Whitson RJ, Mitra S, Cheshier SH, Qi J, Beroukhim R, Tang JY, Wechsler-Reya R, Oro AE, Link BA, Bradner JE, Cho YJ. Epigenetic targeting of Hedgehog pathway transcriptional output through BET bromodomain inhibition. *Nat Med*. 2014;20(7):732-40.
57. Chapuy B, McKeown MR, Lin CY, Monti S, Roemer MGM, Qi J, Rahl PB, Sun HH, Yeda KT, Doench JG, Reichert E, Kung AL, Rodig SJ, Young RA, Shipp MA, Bradner JE. Discovery and characterization of super-enhancer-associated dependencies in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell*. 2013;24(6):777-90.
58. Whyte WA, Orlando DA, Hnisz D, Abraham BJ, Lin CY, Kagey MH, Rahl PB, Lee TI, Young RA. Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell*. 2013;153(2):307-19.
59. Perez-Salvia M, Esteller M. Bromodomain inhibitors and cancer therapy: From structures to applications. *Epigenetics*. 2017;12(5):323-39.
60. Stathis A, Zucca E, Bekradda M, Gomez-Roca C, Delord JP, de La Motte Rouge T, Uro-Coste E, de Braud F, Pelosi G, French CA. Clinical Response of Carcinomas Harboring the BRD4-NUT Oncoprotein to the Targeted Bromodomain Inhibitor OTX015/MK-8628. *Cancer Discov*. 2016;6(5):492-500.
61. Wang J, Erazo T, Ferguson FM, Buckley DL, Gomez N, Muñoz-Guardiola P, Diéguez-Martínez N, Deng X, Hao M, Masefski W, Fedorov O, Offei-Addo NK, park pm-c, Dai L, DiBona A, Becht K, Kim ND, McKeown MR, Roberts JM, Zhang J, Sim T, Alessi DR, Bradner JE, Lizcano JM, Blacklow SC, Qi J, Xu X, Gray NS. Structural and atropisomeric factors governing the selectivity of pyrimido-benzodiazepinones as inhibitors of kinases and bromodomains. *ACS Chemical Biology*. 2018.
62. Timme N, Han Y, Liu S, Yosief HO, Garcia HD, Bei Y, Klironomos F, MacArthur IC, Szymansky A, von Strebut J, Bardinet V, Dohna C, Künkele A, Rolff J, Hundsdörfer P, Lissat A, Seifert G, Eggert A, Schulte JH, Zhang W, Henssen AG. Small-molecule dual PLK1 and BRD4 inhibitors are active against preclinical models of pediatric solid tumors. *Translational Oncology*. 2019 (in press).

3. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, *Youjia Han*, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *„Synergistische Wirkung des BRD4-Inhibitors MK-8628 und PLK1-Inhibitors Volasertib in vorklinischen Modellen des Medulloblastoms / Synergistic activity of BRD4 inhibitor MK-8628 and PLK1 inhibitor Volasertib in preclinical models of medulloblastoma“* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

4. Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Publikation:

Youjia Han, Sven Lindner, Yi Bei, Heathcliff Dorado Garcia, Natalie Timme, Kristina Althoff, Andrea Odersky, Alexander Schramm, Andrej Lissat, Annette Künkele, Hedwig E. Deubzer, Angelika Eggert, Johannes H. Schulte, Anton G. Henssen, „Synergistic activity of BET inhibitor MK-8628 and PLK inhibitor Volasertib in preclinical models of medulloblastoma“.

Cancer Letters. Volume 445, 31 March 2019, Pages 24-33, ISSN 0304-3835.

Available online as Epub on 4 January 2019.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.12.012>

(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383518307274>)

Beitrag im Einzelnen:

Youjia Han hat die Experimente für die obengenannte Publikation von Oktober 2017 bis April 2018 in Vollzeit an dem CharitéCentrum für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin mit Perinatalzentrum und Humangenetik, Klinik für Kinderheilkunde m. S. Onkologie und Hämatologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Ab April bis Dezember 2018 hat *Youjia Han* in Teilzeit für die Durchführung weiterer Experimente, für die Erstellung des Publikationsmanuskripts und für den Revisionsprozess gearbeitet.

Die Experimente wurden unter Betreuung durch den Doktorvater Dr. med. Anton George Henssen (Leiter einer Emmy Noether-Gruppe (Deutsche Forschungsgemeinschaft) und BIH-Wissenschaftler) durchgeführt und ihr Progress wurde regelmäßig überprüft.

Youjia Han hat selbständig den größten Teil der experimentellen Arbeit durchgeführt, die die Publikation ermöglichte. Sie hat für die Planung, Protokollanpassung, Durchführung und Auswertung der *in vitro* Experimente wie das Zellviabilitäts-Assay, die Zellzyklusanalyse, den Western Blot, das RT-qPCR und die Synergy-Score-Analyse selbstständig gearbeitet. Hieraus entstanden die Abbildungen 1A, 1D-F, 2A-C, 4A-H, sowie die ergänzende Abbildungen 1A, 2A-C, und 3A-C. Die zum Zeitpunkt des Promotionsbeginns bereits vorhandenen Daten aus dem Gene Microarray, aus der *in vivo*-Experimenten mit Xenograft-Mäusen sowie ein Teil der *in vitro*-Experimenten wurden von ihr re-evaluiert und analysiert. Darauffolgend wurden die Abbildungen 1B-C, 2D-E, 2G-H, 3A-B, die ergänzende Abbildungen 1C-D, 1F, sowie die ergänzende Tabellen 1 – 2 eigenständig von *Youjia Han* erstellt. Die Abbildungen 2F, 3C, 3D sowie die ergänzende Abbildungen 1B und 1E wurden basierend auf den existierenden

Abbildungen von ihr überarbeitet.

Die Literaturrecherche für die obengenannte Publikation erfolgte bis auf die Auswahl einzelner Referenzen eigenständig durch die Promovendin *Youjia Han*.

Die strukturelle Gliederung und inhaltliche Formulierung des Papers erfolgte zum großen Teil durch *Youjia Han*. Insbesondere die Punkte „*Abstract*“, „*1. Introduction*“ und „*4. Discussion*“ wurden maßgeblich durch *Youjia Han* verfasst. An der Erstellung des Punktes „*2. Materials and Methods*“ und „*3. Results*“ war die Promovendin zu einem großen Teil beteiligt. An der Erstellung des Punktes „*2.5. Affymetrix microarrays, gene ontology and gene set enrichment analysis*“ war sie zum Teil beteiligt. An der Erfassung von „*2.7. In vivo treatment of xenograft tumors in nude mice*“ sowie „*3.3. Oral treatment with MK-8628 reduces tumor growth and induces apoptosis of human MYC-amplified group 3 medulloblastoma xenografts*“ war sie nicht beteiligt. In der Revision führte *Youjia Han* die zusätzlichen Experimente und inhaltlichen Korrekturen durch.

Zusammenfassend war die Promovendin *Youjia Han* maßgeblich an dem Design der Arbeit und der Durchführung der Experimente, der Literaturrecherche, der statistischen Auswertung sowie an der Erstellung, Überarbeitung und dem Review-Prozess des Papers beteiligt und erstellte sämtliche Grafiken und Tabellen eigenständig.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers (Dr. med. Anton George Hensen)

Unterschrift der Doktorandin (*Youjia Han*)

5. Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2017** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: "ONCOLOGY" Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 222 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	CA-A CANCER JOURNAL FOR CLINICIANS	28,839	244.585	0.066030
2	NATURE REVIEWS CANCER	50,407	42.784	0.079730
3	LANCET ONCOLOGY	44,961	36.418	0.136440
4	JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY	156,474	26.303	0.285130
5	Nature Reviews Clinical Oncology	8,354	24.653	0.026110
6	Cancer Discovery	11,896	24.373	0.065350
7	CANCER CELL	35,217	22.844	0.096910
8	JAMA Oncology	5,707	20.871	0.027770
9	ANNALS OF ONCOLOGY	38,738	13.926	0.095780
10	JNCI-Journal of the National Cancer Institute	37,933	11.238	0.052550
11	Journal of Thoracic Oncology	15,010	10.336	0.033280
12	CLINICAL CANCER RESEARCH	81,859	10.199	0.132210
13	SEMINARS IN CANCER BIOLOGY	6,330	10.198	0.010740
14	LEUKEMIA	25,265	10.023	0.059580
15	NEURO-ONCOLOGY	10,930	9.384	0.030350
16	Cancer Immunology Research	4,361	9.188	0.021180
17	CANCER RESEARCH	139,291	9.130	0.130190
18	Journal for ImmunoTherapy of Cancer	1,675	8.374	0.007130
19	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-REVIEWS ON CANCER	5,276	8.220	0.009300
20	Blood Cancer Journal	1,804	8.125	0.007660
21	CANCER TREATMENT REVIEWS	7,870	8.122	0.015820
22	Molecular Cancer	10,301	7.776	0.017280
23	INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER	51,800	7.360	0.071870
24	Journal of Hematology & Oncology	4,098	7.333	0.009750
25	EUROPEAN JOURNAL OF CANCER	29,883	7.191	0.050170
26	ONCOGENE	66,411	6.854	0.075960
27	CANCER	68,221	6.537	0.074740
28	CANCER LETTERS	29,311	6.491	0.042280
29	Journal of the National Comprehensive Cancer Network	5,143	6.471	0.017530
30	Advances in Cancer Research	2,343	6.422	0.003690
31	JOURNAL OF PATHOLOGY	16,156	6.253	0.024060

6. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

Youjia Han, Sven Lindner, Yi Bei, Heathcliff Dorado Garcia, Natalie Timme, Kristina Althoff, Andrea Odersky, Alexander Schramm, Andrej Lissat, Annette Künkele, Hedwig E. Deubzer, Angelika Eggert, Johannes H. Schulte, Anton G. Hensen.

„Synergistic activity of BET inhibitor MK-8628 and PLK inhibitor Volasertib in preclinical models of medulloblastoma“

Cancer Letters. Volume 445, 31 March 2019, Pages 24-33, ISSN 0304-3835.

Available online as Epub on 4 January 2019.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383518307274>

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.12.012>



Original Articles

Synergistic activity of BET inhibitor MK-8628 and PLK inhibitor Volasertib in preclinical models of medulloblastoma



Youjia Han^a, Sven Lindner^b, Yi Bei^a, Heathcliff Dorado Garcia^a, Natalie Timme^a, Kristina Althoff^b, Andrea Odersky^b, Alexander Schramm^b, Andrej Lissat^a, Annette Künkele^{a,c,d}, Hedwig E. Deubzer^{a,c,d,e}, Angelika Eggert^{a,c}, Johannes H. Schulte^{a,c}, Anton G. Henssen^{a,c,d,*}

^a Department of Pediatric Oncology/Hematology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Germany

^b Department of Pediatric Oncology and Hematology, University Children's Hospital Essen, Essen, Germany

^c German Consortium for Translational Cancer Research (DKTK), Berlin, Germany

^d Berlin Institute of Health (BIH), Berlin, Germany

^e Experimental and Clinical Research Center (ECRC) of the Charité and the Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine (MDC) in the Helmholtz Association, Berlin, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

BRD4

MYC

PLK1

Pediatric brain tumors

Targeted therapy

ABSTRACT

Medulloblastoma is the most prevalent central nervous system tumor in children. Targeted treatment approaches for patients with high-risk medulloblastoma are needed as current treatment regimens are not curative in many cases and cause significant therapy-related morbidity. Medulloblastoma harboring *MYC* amplification have the most aggressive clinical course and worst outcome. Targeting the BET protein BRD4 has significant anti-tumor effects in preclinical models of *MYC*-amplified medulloblastoma, however, in most cases these are not curative. We here assessed the therapeutic efficacy of the orally bioavailable BRD4 inhibitor, MK-8628, in preclinical models of medulloblastoma. MK-8628 showed therapeutic efficacy against *in vitro* and *in vivo* models of *MYC*-amplified medulloblastoma by inducing apoptotic cell death and cell cycle arrest. Gene expression analysis of cells treated with MK-8628 showed that anti-tumor effects were accompanied by significant repression of *MYC* transcription as well as disruption of *MYC*-regulated transcriptional programs. Additionally, we found that targeting of *MYC* protein stability through pharmacological PLK1 inhibition showed synergistic anti-medulloblastoma effects when combined with MK-8628 treatment. Thus, MK-8628 is effective against preclinical high-risk medulloblastoma models and its effects can be enhanced through simultaneous targeting of PLK1.

1. Introduction

Medulloblastoma is the most common malignant brain tumor in children. It arises from cerebellar cells and can be subdivided in four distinct clinical, biological and genetic subgroups, *i.e.* the Wingless (WNT), Sonic Hedgehog (SHH), group 3 and group 4 [1–3]. Group 3 tumors are characterized by the highest *MYC* expression and coincidental genomic *MYC* amplification [1–3]. Patients with group 3 medulloblastoma with high *MYC* expression have the worst clinical outcome with 5-year survival rates below 50% [4–6]. Due to the lack of novel targeted therapies, treatment of patients with group 3 medulloblastoma has not significantly improved over the past decade [1,4,6]. Therefore, new drugs are urgently needed for patients with group 3 medulloblastoma. As *MYC* is the central oncogenic driver of these tumors and tumors are highly dependent on *MYC* expression, *MYC* is an

ideal drug target in group 3 medulloblastoma.

Maintenance of high *MYC* expression in cancer through transcriptional and post-translational modes has been extensively studied in the past years. For example, high abundance of certain histone modifications and concomitant recruitment of their epigenetic readers play an important role in the aberrant expression of oncogenes such as *MYC* [7,8]. Targeted inhibition of epigenetic readers recruited to *MYC* enhancers has opened new possibilities to influence the transcriptional regulation of *MYC* in cancer [9]. One prototypical example for this is the targeted inhibition of bromodomain and extra-terminal domain (BET) containing protein BRD4, which leads to repression of *MYC* transcription [10]. Bromodomain protein BRD4 binds to acetylated lysines in the N-terminal regions of histones and recruits transcriptional co-activators to H3K27 at enhancer sites [11,12]. Blocking the interaction of BRD4 with the H3K27Ac leads to downregulation of *MYC* and

* Corresponding author. Department of Pediatric Oncology/Hematology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Germany.
E-mail address: Henssenlab@gmail.com (A.G. Henssen).

<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.12.012>

Received 2 October 2018; Received in revised form 5 December 2018; Accepted 11 December 2018
0304-3835/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

MYC target genes in various cancer entities [13–20]. In medulloblastoma, pharmacological BET inhibition is most potent in MYC-driven medulloblastoma models and one report has indicated specific inhibition of the hedgehog pathway in SHH-medulloblastoma [16,17,21,22]. MK-8628 is a selective small molecule BET protein inhibitor and has several advantages over previously described BRD4 inhibitors such as good oral bioavailability and favorable pharmacological properties in humans [20,23–27]. Future clinical introduction of this compound depends on in depth analysis of its efficacy in preclinical models.

Although BRD4 inhibition has promising efficacy against solid tumors, single agent treatment is not curative in preclinical *in vivo* models of medulloblastoma and will likely not cure patients when used alone [17,28]. We hypothesized that synergistic combination treatment approaches could increase efficacy to clinically relevant levels. Based on previous literature, we reasoned that one potential molecular target for such combination treatments could be Polo-like kinase 1 (PLK1) [29–31]. PLK1 is a serine/threonine kinase involved in the PDK1 pathway that binds directly to and phosphorylates MYC, stabilizing it in the late stage of cell cycle [32]. PLK1 is crucial for MYC regulation and for cancer cell survival due to its role in cell cycle regulation [30,32], and PLK1 inhibition can prevent proliferation, self-renewal, and cell-cycle progression of medulloblastoma cells and induces apoptosis [31]. Combination treatment with PLK1 inhibitors and BRD4 inhibitors has synergistic effects in leukemia, suggesting that this may also apply to other tumor entities such as medulloblastoma [33]. We here provide preclinical evidence that MK-8628 is similarly potent against MYC-driven medulloblastoma models as compared to previously described BET-inhibitors. Additionally, we show that combined BET and PLK1 inhibition exhibits synergistic anti-tumor activity in medulloblastoma. This may serve as a rationale for future clinical testing of BRD4 and PLK1 inhibitors in patients with high-risk medulloblastoma.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and *in vitro* treatment

The four human medulloblastoma cell lines were grown either in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (HD-MB3, UW228 and DAOY) or Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640 (ONS-76), both supplemented with 10% FCS, L-glutamine, and 1% penicillin/streptomycin. The identity of all cell lines was verified by STR genotyping performed by the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany). Using PCR all cell lines were found to be free of mycoplasma (primers sequences available upon request). MK-8628-API (Active Pharmaceutical Ingredient) and Volasertib-API were purchased from Selleckchem (Munich, Germany) and GSK461364A was purchased from Axon Medchem (Groningen, Netherlands), aliquoted for single use and stored at -20°C as a 10 mM stock solution in dimethyl sulfoxide (DMSO). For passaging and seeding, cell lines were washed with PBS, trypsinized and resuspended in fresh media, then counted using trypan blue dye staining. For treatment, cells were exposed to 0–10 μM MK-8628-API, 0–0.1 μM Volasertib-API, 0–0.3 μM GSK461364A-API or combinations of them prepared as serial dilutions in full medium. The final DMSO concentration was kept at or below 1%.

2.2. Cell proliferation, cell death, cell viability and cell cycle analysis

Medulloblastoma cell lines were seeded onto 96-well plates (500 cells per well) in triplicate for all assays, and incubated for 24h to permit surface adherence. Cells were treated with 0–10 μM MK-8628-API, 0–0.1 μM Volasertib-API or combination of both. Viability was assessed 72h after treatment using the CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Wisconsin, USA) according to the manufacturer's protocol. The IC_{50} and area under the curve (AUC) were calculated using GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego,

CA, USA) as previously described [34]. Apoptosis and proliferation were assessed after treatment with 500 nM MK-8628-API using the Cell Death and BrdU ELISA assays (Roche, Basel, Switzerland), respectively, after 24h, 48h and 72h of drug treatment. All assays were performed according to the manufacturer's protocols. For cell cycle analysis, cell lines were cultured for 72h in the presence of 500 nM MK-8628-API, 5 nM Volasertib-API, combination of both or DMSO control in 10 cm dishes at 3.5×10^5 cells/dish. Cells were harvested after 2h incubation with EdU, then DNA was stained with propidium iodide using Click-iT Plus™ EdU Flow Cytometry Assay Kits (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) as described before [35]. Cellular DNA content was analyzed in a BD LSRFortessa X-20 (BD Biosciences, California, USA). All experiments were independently performed at least 3 times, if not otherwise indicated.

2.3. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Total RNA was extracted from cells using RNeasyMini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol and concentration was determined with Nanodrop (Thermo Fisher Scientific). For *CCND1*, cDNA synthesis was performed using the SuperScript reverse transcription kit (Invitrogen, Darmstadt, Germany) and its expression was monitored using Assays-on-Demand™ (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA). Expression values were normalized to the geometric mean of GAPDH [36]. Data analysis and error propagation were performed using the qbasePLUS software version 1.5 (<http://www.biogazelle.com>). For *MYC*, cDNA was synthesized using the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) and its expression was measured using StepOne Plus™ (Applied Biosystems). Expression values were normalized to the geometric mean of HPR1 as described before [36]. Data analysis and error propagation were performed using the (StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems). All experiments were independently performed at least 3 times, if not otherwise indicated.

2.4. Western blot analysis

Protein lysates were extracted from cells, separated on NuPAGE 10% Bis-Tris Gel (Invitrogen) and electro-transferred on Polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Roche). Membranes were incubated for 1h with 10% nonfat dry milk (or 5% BSA for phospho-antibodies) in tris-buffered saline plus 0.1% Tween 20 (TBS-T), then incubated with primary antibodies in 10% nonfat dry milk (or 5% BSA for phospho-antibodies) in TBS-T overnight at 4°C . Primary antibodies against the following proteins and dilutions were used: MYC (1:500, #9402, Cell Signaling Technology (CST), Danvers, MA, USA), BRD4 (1:200, H-250, sc-48772, Santa Cruz, Dallas, TX, USA), WEE1 (1:1000, sc-5285, Santa Cruz), CCND1 (1:500, #2922, CST), E2F1 (1:200, AF4825, R&D Systems, Minneapolis, MI, USA), PLK1 (1:500, H-152, sc-5585, Santa Cruz), phospho-PLK1 (1:200, ab39068, Abcam, Cambridge, UK) and beta-actin (1:20000, 3700S, CST). After washing thrice with TBS-T, membranes were incubated 1h at room temperature with secondary antibodies diluted 1:5000 in 10% nonfat dry milk (or 5% BSA for phospho-antibodies) in TBS-T. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG (111-035-003, Dianova, Hamburg, Germany) or HRP-conjugated anti-mouse IgG (115-035-003, Dianova) were used as secondary antibodies. Proteins were visualized using the ImmunoCruz™ Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz) and analyzed on a FusionFX7 detection device (Vilber Lourmat, Eberhardzell, Germany). All experiments were independently performed at least 3 times, if not otherwise indicated.

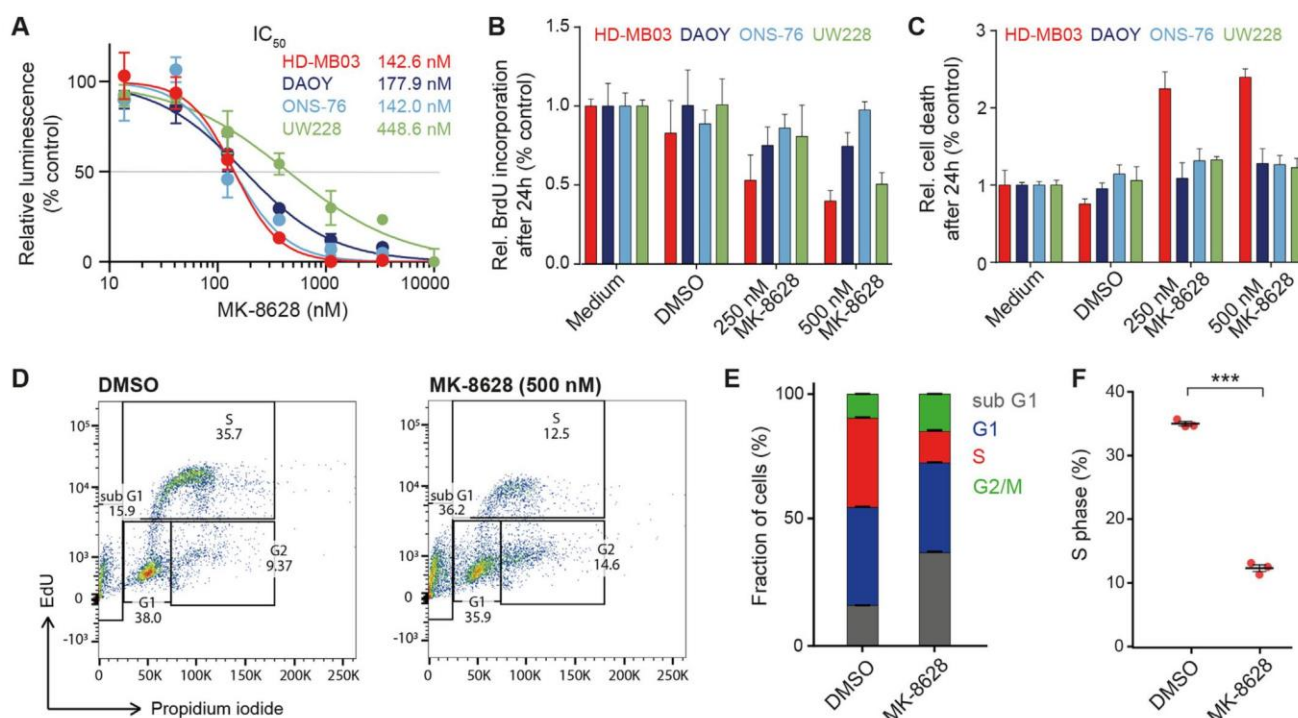


Fig. 1. MK-8628 exhibits significant anti-medulloblastoma effects *in vitro* at low nanomolar concentrations. (A) Dose response of four medulloblastoma cell lines treated with MK-8628 for 72h. Inhibitory concentrations of 50% viability (IC_{50}) are stated in the diagram. (Red: MYC-amplified; blue: non MYC-amplified with high MYC expression; green: non MYC-amplified with low MYC expression) (B) Relative BrdU incorporation of four medulloblastoma cell lines treated with MK-8628 (250 nM and 500 nM) or DMSO control for 24h. (C) Relative amount of cytoplasmic histone-associated DNA fragments, indicating cell death, in medulloblastoma cell lines treated with MK-8628 (250 nM, 500 nM) or DMSO control for 24h. (D) Cell cycle distribution of medulloblastoma cell line HD-MB03 after treatment with MK-8628 (500 nM) or DMSO control for 24h. (E) Fraction of HD-MB03 cells in each cell cycle phase after treatment with MK-8628 (500 nM) or DMSO control for 24h. (F) Fraction of HD-MB03 cells in S phase as measured in (E) (Student's t-test: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$).

2.5. Affymetrix microarrays, gene ontology and gene set enrichment analysis

HD-MB03 cells were plated at 1×10^5 cells/well in 6-well plates and after 12h were treated in triplicate with medium containing 0.2% DMSO (control) or 500 nM MK-8628-API for 24h. Total RNA was extracted using the RNeasyMini kit (Qiagen). Three replicates were treated and analyzed. Samples were profiled using the genechip Affymetrix Human Gene Expression Array (HG-U133 Plus 2.0, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) as described [37]. Microarray.CEL files were normalized and summarized to gene levels with RMA normalization [38]. Probes for which the \log_2 expression was ≥ 1.5 and had p -values ≤ 0.01 were considered as differentially expressed and picked for further analysis. Differential expression analysis was performed using limma package for R [39]. Hierarchical clustering was performed on the Euclidean distance of \log_2 expression values for the 50 most differentially expressed genes to visualize differential gene expression in HD-MB03 cells following MK-8628-API treatment. Gene ontology (GO) analysis and gene set enrichment (GSEA) analysis were performed using the clusterProfiler package in R [40]. The c6 oncogenic signatures (<http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp>) gene sets from Molecular Signatures Database (MSigDB) were used in this study. Furthermore we analyzed MYC signature scores (Dang [41], Kim [42], Schuhmacher [43], Westermann [44]). Agglomerative hierarchical clustering was performed using pairwise complete linkage and a Pearson correlation metric across both samples and genes.

2.6. Statistical analysis

Graph Pad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc.) was used to calculate

IC_{50} and the area under the curve (AUC) and to perform Kaplan-Meier survival analysis with log-rank statistics on treated and untreated mouse cohorts. Additionally, GraphPad was used to perform Student's two-sided t-tests to compare all interval variables, and the chi-square test was used for the comparison for all categorical variables. Fiji (NIH Image, Maryland, USA) was used for image analysis of western blot chemiluminescence images. Excess over Bliss was calculated using synergyfinder for R [45].

2.7. In vivo treatment of xenograft tumors in nude mice

HD-MB03 medulloblastoma cells were cultured to 80% confluency, harvested and suspended in 200 μ L Matrigel™ (BD Bioscience, Heidelberg, Germany) for subcutaneous inoculation (1×10^7 cells per mouse, $n = 24$ mice) into the left flank of 4-week-old female athymic (nu/nu) mice. Mice were randomly assigned to either MK-8628-SD (Solid Dispersion) or vehicle control groups ($n = 9$ mice per group) after tumors reached 150–200 mm^3 in size. MK-8628-SD was administered using orogastric gavage. The mice were treated daily with water, 25 mg/kg MK-8628-SD, twice per day with 25 mg/kg MK-8628-SD or two times a week with cyclophosphamide 100 mg/kg. Tumor growth was monitored using a caliper and tumor volume was calculated using the formula (breadth \times length \times height)/2. Mice were euthanized by cervical dislocation when tumor size exceeded 2500 mm^3 . To assess short term effects of MK-8628 treatment on molecular features of tumors, 6 doses of 50 mg/kg body weight MK-8628-SD or solvent ($n = 3$ mice each group) were administered at 0, 12, 24, 36, 48, 60 and 72h over a 3-day course. These mice were euthanized by cervical dislocation 4h after the last MK-8628-SD dose and xenograft tumors were excised from all mouse treatment cohorts, and divided into halves. Half the tissue was snap-frozen in liquid nitrogen then stored at $-80^\circ C$ and the

other half was formalin-fixed and paraffin-embedded for further analysis. All animal experiments were performed in accordance with the Council of Europe guidelines for accommodation and care of laboratory animals, and protocols were approved by the Ethical Commission for Animal Experimentation at the University Hospital Essen.

3. Results

3.1. MK-8628 treatment reduces cell viability of medulloblastoma cell lines by inducing cell death and reducing cell proliferation

To test the anti-medulloblastoma activity of MK-8628, we treated four medulloblastoma cell lines with MK-8628 and measured relative ATP abundance over time. In all medulloblastoma cell lines treated with MK-8628 we observed a significant decrease in cell viability with increasing drug concentration (Fig. 1A, Suppl. Fig 1A, Suppl. Fig 1B). The concentration of MK-8628 leading to 50% growth inhibition (IC_{50}) were between 142.6 nM and 448.6 nM, similar to concentrations described for other BET inhibitors [17,37,46]. We observed that cell lines expressing higher MYC levels, HD-MB03, DAOY and ONS-76, showed lower IC_{50} values than UW228, which expresses low levels of MYC (Fig. 1A, Suppl. Fig 1A). Consistent with decreased cell viability, MK-8628 treatment led to a significant decrease in cell proliferation in medulloblastoma cells as evidenced by reduced BrdU incorporation after inhibitor treatment (Fig. 1B, Suppl. Fig 1C). Additionally, we observed that treatment with MK-8628 led to a significant increase in cell death in all cell lines, as measured by release of cytoplasmic histone-associated DNA fragments (Fig. 1C, Suppl. Fig 1D). To measure changes in cell cycle we performed EdU pulse labeling followed by fluorescence-activated cell sorting (FACS) measurement of the cell cycle distribution of HD-MB03 cells treated with MK-8628 (Fig. 1D). Consistent with the increase in cell death we observed an increase of the fraction of cells in sub G1 phase (Fig. 1E). Previous reports have shown that BET inhibition leads to cell cycle arrest in G1 and S phases due to BRD4's critical role in these processes [47,48]. Consistently, we observed a decrease in the fraction of cells in G1 and S phases (Fig. 1D, E and 1F). Taken together, treatment of medulloblastoma cell lines with MK-8628 leads to reduction in cell viability and cell proliferation and to increased cell death, to a similar extent as previously described for other BET inhibitors [16,17,37,46].

3.2. Pharmacological BRD4 inhibition with MK-8628 leads to repression of MYC expression and MYC-driven gene expression programs in medulloblastoma cell lines

BET inhibitors have been shown to lead to repression of MYC in medulloblastoma cells [13,17]. To assess the effect of BET inhibitor MK-8628 on MYC mRNA, MYC protein and MYC target gene expression we treated medulloblastoma cell lines with MK-8628 and performed qRT-PCR and western immunoblotting analysis of known BRD4-regulated targets [14]. MYC protein and mRNA expression was repressed after MK-8628 treatment, whereas CCND1 and WEE1 showed varying grades of repression (Fig. 2A, B, 2C and 2D, Suppl. Fig. 1E) [14,16,17]. BRD4 did not change in expression after MK-8628 treatment, consistent with disruption of its activity and not its expression (Fig. 2A, Suppl. Fig 1F). Even short term treatment with MK-8628 followed by treatment wash out led to reduction of CCND1 expression for the following 24 h, suggesting that long-term target repression could be achieved with short-term inhibitor treatment (Fig. 2D). To assess the effect of MK-8628 on global gene expression programs *in vitro*, we performed gene expression microarray analysis of cells treated with MK-8628 compared to cells treated with DMSO control. A total of 6268 and 4982 genes were significantly up- or downregulated after MK-8628 treatment, respectively. Unsupervised clustering of the samples (3vs3) showed a clear separation of the top 50 differentially up- or downregulated genes according to the type of treatment (Fig. 2E). To assess the efficacy of MK-8628 to

disrupt MYC-regulated transcriptional programs, we compared the observed gene expression changes with signatures calculated from published gene expression data of HD-MB03 treated with the BET inhibitor JQ1 [17] as well as from four published MYC/MYCN target gene signatures [41–44]. Consistent with similar pharmacological activity against BRD4, MK-8628 induced similar gene expression changes as previously reported for JQ1 treatment (Fig. 2F) [41–44]. As described for BRD4 inhibition, all four MYC/MYCN programs were significantly disrupted after MK-8628 treatment (Fig. 2F). Gene Ontology analysis (GO analysis) revealed that MK-8628 treatment lead to disruption of pathways related to chromatin regulation and neuronal development, consistent with previous reports on BRD4 functions in chromatin regulation and differentiation (Fig. 2G) [11,12]. A total of 45 pathways were significantly up- or downregulated after treatment with MK-8628 (Suppl. Table 1). Furthermore, gene set enrichment analysis (GSEA) showed a total of 50 pathways that were significantly up- or downregulated after treatment with MK-8628 (Suppl. Table 2). The significantly downregulated pathways included MYC pathway among others (Fig. 2H). Other pathways closely related to cancer development or to BET protein, such as E2F family, were also disrupted by MK-8628 treatment (Fig. 2H, Suppl. Table 2) [14]. In conclusion, MK-8628 treatment of MYC-driven medulloblastoma cells potently disrupts transcriptional programs regulated by BRD4.

3.3. Oral treatment with MK-8628 reduces tumor growth and induces apoptosis of human MYC-amplified group 3 medulloblastoma xenografts

Next, we assessed the efficacy of MK-8628 in an *in vivo* high-risk medulloblastoma model. We treated mice harboring xenografts of group 3 MYC-amplified HD-MB03 cells with MK-8628. In order to mimic clinically relevant conditions, oral treatment with MK-8628 was started when tumors were established and exponentially growing and had reached at least 200 mm³ in volume. Oral MK-8628 treatment led to a significant decrease in tumor growth over time (Fig. 3A). This decrease in tumor burden led to a significant survival advantage for mice treated with MK-8628 (Fig. 3B). However, treatment response was not curative and less effective than treatment with cyclophosphamide, a cytotoxic agent commonly used in medulloblastoma therapy, suggesting that monotherapy with BRD4 inhibitors may not have clinically relevant effects in patients with medulloblastoma (Fig. 3A and B). Interestingly, there was no significant difference in tumor growth between the mice treated once a day compared to mice treated twice daily (Fig. 3A and B). Consistent with our *in vitro* studies, we observed that the fraction of proliferating cells as measured by staining for Ki67 was significantly decreased in tumors treated with MK-8628 (Fig. 3C and D). Furthermore we observed a significant increase in apoptotic cells as measured by staining for cleaved caspase-3 in tumors from mice treated with MK-8628 (Fig. 3C and D). Together, MK-8628 significantly repressed cell proliferation and induced apoptosis *in vivo*, which led to reduced tumor growth over time and suggests that MK-8628 could have the potential to exhibit clinically relevant effects in patients suffering from medulloblastoma tumors.

3.4. Combination of BRD4 and PLK1 inhibitors have synergistic anti-MYC and anti-medulloblastoma effects *in vitro*

Even though treatment with MK-8628 showed promising anti-tumor activity *in vivo* (Fig. 3), these effects were not curative, which is in line with previous reports on BRD4 inhibitor *in vivo* activity [17]. We reasoned that combination of MK-8628 with other drugs affecting MYC expression might improve therapeutic effects. PLK1 inhibitors such as Volasertib and GSK461364A can potentially reduce cell viability and suppress MYC protein expression in cancer cells [29–31]. Furthermore, in leukemia combined PLK1 and BRD4 inhibition has synergistic anti-leukemia effects [49]. We therefore hypothesized that combining MK-8628 with Volasertib or GSK461364A could also have synergistic

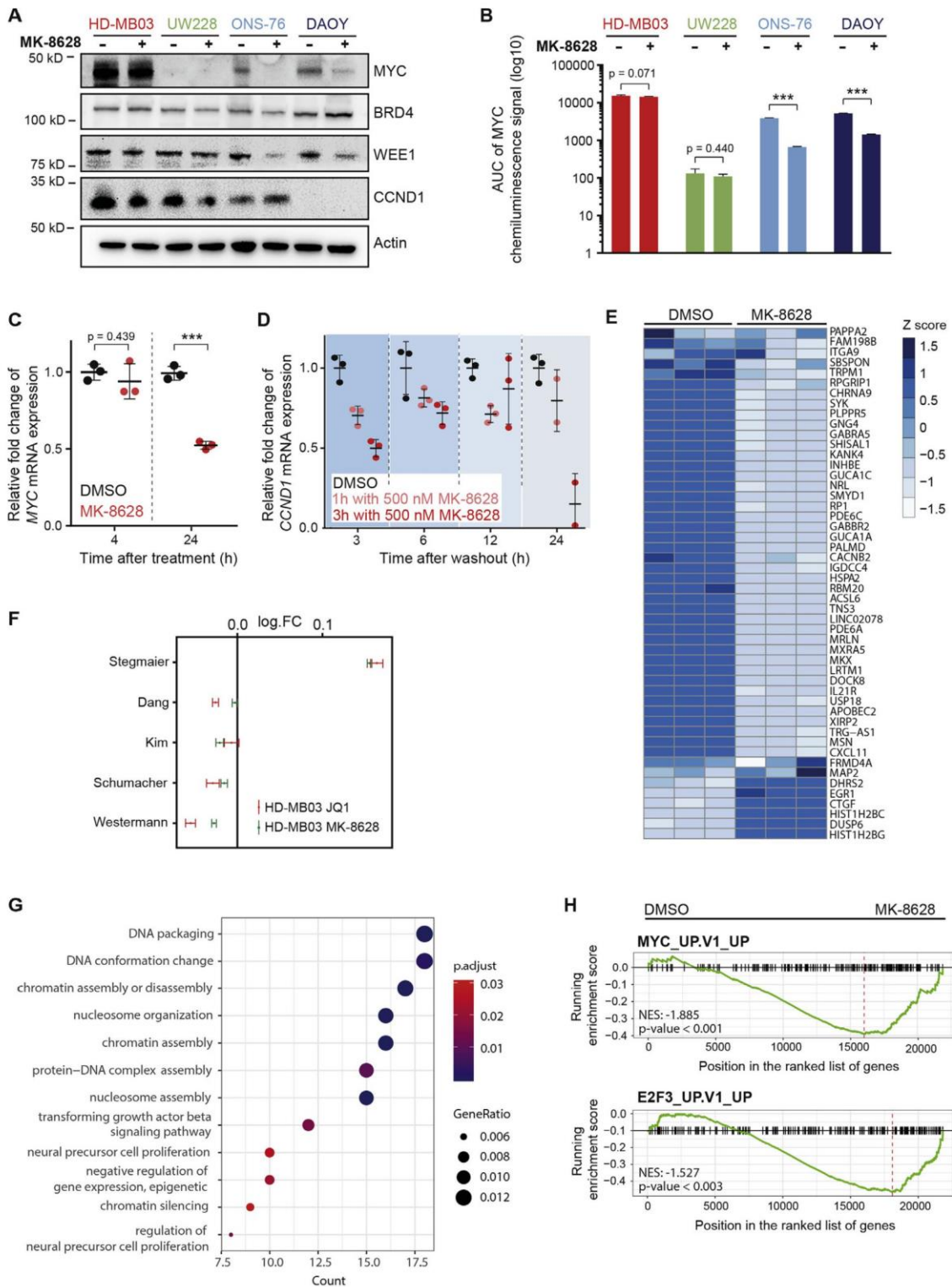


Fig. 2. MK-8628 treatment leads to repression of MYC transcription and protein expression. (A) Protein expression as measured using western immunoblotting of known BRD4 target genes compared after treatment of four medulloblastoma cell lines with MK-8628 (500 nM) or DMSO control for 24h. (B) Area under the curve (AUC) of the western immunoblotting chemiluminescence signals of MYC protein as measured in (A) (Student's t-test: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$). (C) MYC mRNA expression 4 and 24 h after MK-8628 treatment of medulloblastoma cell line HD-MB03 (Student's t-test: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$). (D) CCND1 mRNA expression of medulloblastoma cell line HD-MB03 treated for 1 or 3 h with 500 nM MK-8628 or DMSO control, measured at 3, 6, 12 or 24 h after treatment washout. (E) Heatmap of the top 50 differentially expressed genes in HD-MB03 cells after treatment with MK-8628 compared to DMSO-treated cells. (F) Enrichment of the published MYCN gene expression signatures in differentially expressed genes after treatment with MK-8628 compared to JQ1-treated cells. (G) Gene ontology (GO) analysis of RNA expression changes in HD-MB03 cells treated with MK-8628 compared to DMSO control (x-axis = number of genes affected, size of circle indicating gene ratio MK-8628 treatment vs. GO-term and circle color indicating adjusted p-value). (H) Two exemplary gene set enrichment analysis (GSEA) plots of the genes differentially expressed after treatment with MK-8628.

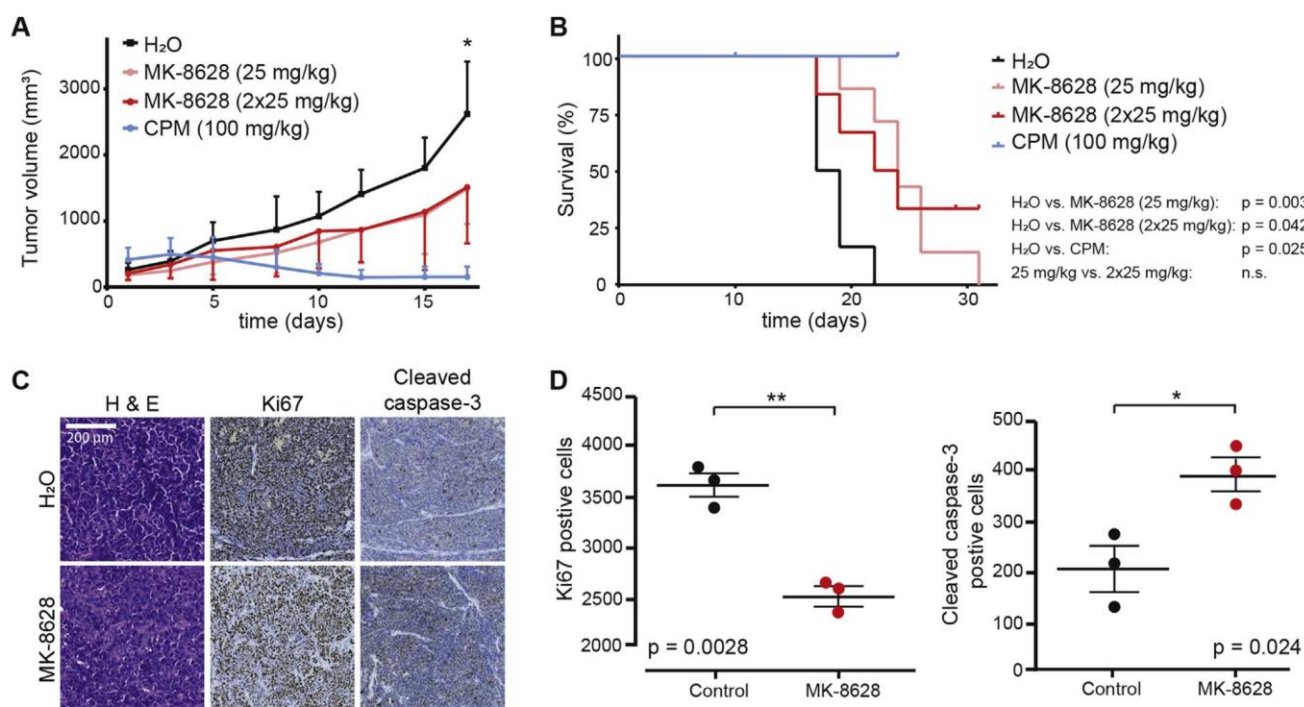


Fig. 3. MK-8628 treatment leads to decreased tumor growth and enhanced survival *in vivo*. (A) Tumor volume in nude mice harboring HD-MB03 xenografts treated with solvent (H₂O), cyclophosphamide (CPM) (100 mg/kg) or MK-8628 (25 or 2 × 25 mg/kg). (B) Kaplan Meier analysis of the overall survival of nude mice harboring HD-MB03 xenografts and treated with CPM (100 mg/kg) or MK-8628 (25 or 2 × 25 mg/kg) compared to mice treated with vehicle control (H₂O) (significance was calculated by log rank test). (C) Representative histological photomicrographs of tumors treated with MK-8628 or vehicle control (H & E; hematoxylin & eosin). (D) Quantitative analysis of photomicrographs of tumors treated with MK-8628 compared to tumors treated with vehicle control and stained for Ki67 (left) and cleaved caspase-3 (right) (Student's t-test: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$).

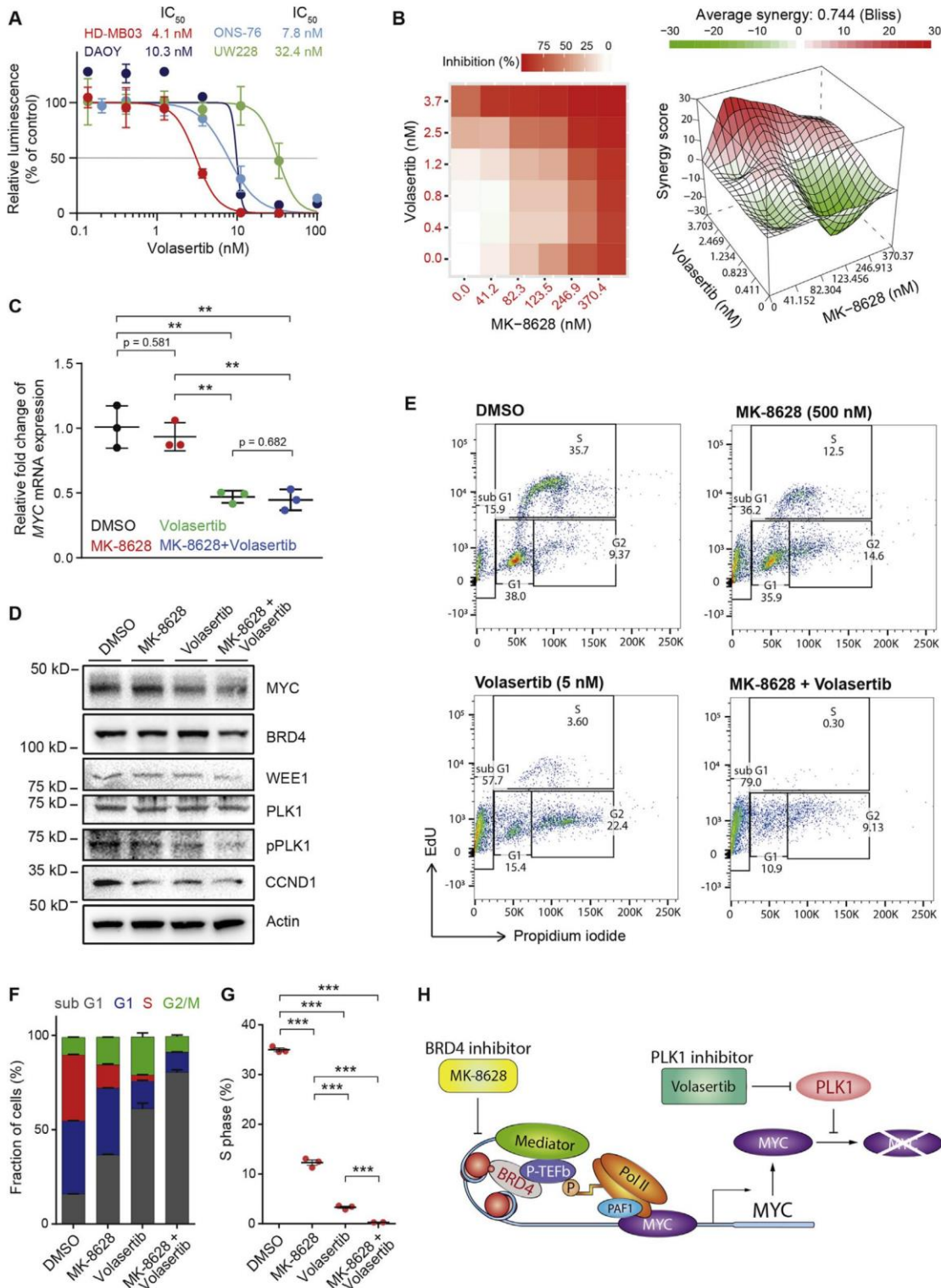
effects against medulloblastoma cells. To test this, we assessed the effect of Volasertib and GSK461364A on medulloblastoma cell viability. In all medulloblastoma cell lines treated with PLK1 inhibitors we observed a significant decrease in the number of viable cells with increasing inhibitor concentrations (Fig. 4A and Suppl. Fig. 2A). The IC₅₀ ranged between 4.1 nM and 32.4 nM for Volasertib. Again, MYC-amplified HD-MB03 cells were most sensitive to Volasertib treatment, while UW228 cells, expressing low levels of MYC, were more resistant to treatment (Fig. 4A). The IC₅₀ for GSK461364A ranged between 7.6 nM and 170.9 nM, except for DAOY cells which showed a high IC₅₀ at 5285.0 nM (Suppl. Fig. 2A). Next, we assessed the synergistic effect of combined Volasertib and MK-8628 treatment on medulloblastoma cells. In HD-MB03, DAOY and ONS-76 cell lines, an excess over Bliss analysis indicated synergistic effects of combined PLK1 and BRD4 inhibitor treatment with highest synergy found at low drug concentrations, in particular in DAOY and ONS-76 cells (Fig. 4B, Suppl. Fig. 2B). Interestingly, combination treatment was antagonistic in UW228 cells, expressing low levels of MYC, suggesting that the efficacy of combined BRD4 and PLK1 inhibitor treatment might depend on MYC expression levels (Suppl. Fig. 2B). It was recently shown that Volasertib can bind to BRD4 [50,51]. In order to confirm that the synergy observed was independent of this activity, we tested combination treatment with MK-8628 and GSK461364A, a highly specific PLK1 inhibitor, in all four medulloblastoma cell lines. Again, combination treatment exhibited synergistic anti-medulloblastoma effects (Suppl. Fig. 2C). Consistent to these synergistic effect of MK-8628 combined with PLK1 inhibitors, addition of Volasertib to MK-8628 treatment led to a greater reduction of MYC, CCND1 and WEE1 expression compared to single agent treatment, which was accompanied by reduced PLK1 activity as evidenced by the reduction of PLK1 auto-phosphorylation (Fig. 4C and D). Synergistic effects on cell viability were accompanied with a significant increase in the fraction of apoptotic cells in sub G1 phase and a

concomitant decrease in S phase, compared to single agent treatment (Fig. 4E, F and 4G and Suppl. Fig. 3). In summary, combined PLK1 and BRD4 inhibition exhibits synergistic anti-medulloblastoma effects which is accompanied by strong repression of BRD4 and PLK1 targets such as MYC mRNA expression and MYC protein stability (Fig. 4H).

4. Discussion

We here provide preclinical evidence for the therapeutic efficacy of BET bromodomain inhibitor MK-8628 in high-risk medulloblastoma. We show that single agent treatment with MK-8628, a small molecule BET bromodomain inhibitor, efficiently reduces cell viability and increases cell death for *in vitro* and *in vivo* models of high-risk medulloblastoma. These anti-tumor effects are accompanied by efficient transcriptional repression of MYC and its target genes as described for other BET inhibitors [16,17]. Additionally, we provide evidence that PLK1 inhibition can synergistically increase the anti-medulloblastoma effects of BRD4 inhibitors, providing a rationale for combined BRD4 and PLK1 inhibition in high-risk medulloblastoma.

In order to successfully introduce BRD4 inhibitors into clinical trials, adequate biomarkers for selection of patients, which are likely to respond, are clearly needed. While it has been challenging to identify markers predicting hypersensitivity to BET inhibitors, MYC and MYCN expression still remain the most commonly found features amongst responsive tumor cells [28]. Consistently, we and others have previously shown that MYC-expressing medulloblastoma cells are responsive to BET protein inhibition and that inhibition efficiently represses MYC transcription [16,17,21,22,52,53]. In line with previous findings, MK-8628 treatment also efficiently disrupted MYC transcription in MYC-amplified medulloblastoma which was further corroborated by our observation of highest induction of apoptosis by MK-8628 in cells harboring MYC amplifications. Tang et al. suggested that BRD4



(caption on next page)

also regulates *GLI* transcription downstream of SMO in medulloblastoma from the SHH group [21]. Similar to Tang et al. we also observed considerable effects of MK-8628 in UW228 cells, which originate from a SHH medulloblastoma tumor and only expresses *MYC* at a low level. This raises the question, whether molecular features other than *MYC* may also predict susceptibility to BET inhibition. Some reports

suggested that all genes regulated by enhancer regions marked with high H3K27 acetylation as well as high BRD4 occupancy (so called “super enhancers”) are hypersensitive to BRD4 inhibition [53–56]. Consistently, both *MYC* and *GLI* are marked by such “super-enhancers” in group 3 and SHH medulloblastoma, respectively [53]. As both *MYC* status and SHH activation are clinically testable, these features might

Fig. 4. Combining BRD4 inhibitor MK-8628 and PLK1 inhibitor Volasertib has synergistic effects against high-risk medulloblastoma cells. (A) Dose response of four medulloblastoma cell lines treated with Volasertib for 72h. Inhibitory concentrations of 50% viability (IC_{50}) are stated in the diagram. (B) Excess over Bliss analysis of MYC-driven HD-MB03 cells treated with combinations of MK-8628 and Volasertib (red color indicates synergy). (C) Relative MYC mRNA expression as measured using qRT-PCR after treatment with MK-8628, Volasertib or combination treatment for 4h compared to vehicle control-treated cells (Student's t-test: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$). (D) Protein expression of BRD4 and PLK1 targets after treatment of medulloblastoma cell line HD-MB03 with DMSO control, MK-8628 (500 nM), Volasertib (5 nM), or combination of both (500 nM MK-8628 + 5 nM Volasertib) for 24h. (E) FACS-based measurement of the cell cycle distribution of HD-MB03 cells after treatment with DMSO control, MK-8628 (500 nM), Volasertib (5 nM), or combination of both (500 nM MK-8628 + 5 nM Volasertib) for 24h. (F) Fraction of HD-MB03 cells in each cell cycle phase after treatment with DMSO control, MK-8628 (500 nM), Volasertib (5 nM), or combination of both (500 nM MK-8628 + 5 nM Volasertib) for 24h. (G) Fraction of HD-MB03 cells in S phase as measured in (F) (Student's t-test: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$). (H) Schematic of the proposed mechanism of action of combined BRD4 and PLK1 inhibition in medulloblastoma based on previous models [34]. BRD4 is a regulator of gene transcription and inhibition of its binding to chromatin leads to repressed MYC mRNA expression. PLK1 is a kinase involved in regulation of protein degradation and its inhibition is known to lead to increased MYC protein degradation.

lend themselves as inclusion criteria for clinical trials with BET inhibitors. In order to advance BET inhibitors into clinical testing, however, further insight about biomarkers predicting susceptibility towards BET inhibition may be required.

Another prerequisite for successful clinical testing of targeted therapeutics is knowledge about pharmacodynamics markers that efficiently measure molecular response of tumors during treatment. Again, MYC protein and mRNA remains the most reliably observed molecular response marker in tumors treated with BRD4 inhibitors [17,37]. Why inhibition of BRD4, a global regulator of gene transcription, only leads to transcriptional repression of a subset of genes, most of them related to oncogenesis, is still under investigation [57]. Xu and Vakoc suggested that BRD4 inhibitors preferentially suppress genes that are dynamically expressed through exogenous stimuli or those expressed in a lineage-specific manner and thus are under influence of numerous trans- and cis-acting regulators [28]. Many growth and cancer promoting genes such as MYC are therefore suppressed after treatment with BET inhibitors in tumors and could be used as pharmacodynamics markers [28]. Consistently, MYC was also repressed after treatment of medulloblastoma cell lines with MK-8628 and therefore may be useful as a molecular marker for tumor response in future clinical trials.

Many BET inhibitors are currently being tested clinically, and it is still difficult to predict which drugs might have sufficient clinical potency and favorable pharmacological properties to be appropriate for clinical use. Comparison of gene expression changes induced by MK-8628 and JQ1 on medulloblastoma showed a high similarity of gene expression changes, indicating that MK-8628 and JQ1 are similarly specific BET inhibitors at nanomolar concentrations. In contrast to JQ1 and other BET inhibitors, MK-8628 is orally bioavailable, which might be advantageous for clinical use [24]. Similarly to other BET inhibitors, MK-8628 potently inhibited xenograft tumor growth, and significantly prolonged mouse survival in a MYC-driven xenograft model. The survival advantage observed in mouse xenograft models of high-risk medulloblastoma suggests that MK-8628 has the potential to generate a measurable response in this patient subgroup, which have dismal prognoses with current treatment regimens, and thus, should be a rationale for the clinical testing of MK-8628 in patients with medulloblastoma. However, MK-8628 as well as other inhibitors tested pre-clinically do not cure mice harboring medulloblastoma xenografts, suggesting that single-agent BRD4 inhibitor treatment might not have sufficient potency to cure patients suffering from medulloblastoma. Even patients suffering from a BRD4-driven disease such as NUT mid-line carcinoma, who initially respond well to BRD4 inhibitor-treatment, often relapse after several months [58]. This suggests that combination of BRD4 inhibitors with other therapeutics might be needed to efficiently treat patients suffering from medulloblastoma and other BRD4-dependent tumors.

There are many reports about combining BRD4 inhibitors with other targeted agents. For example drugs targeting PARP, HDAC, BCL2, mTOR and BRAF, respectively, have been shown to enhance anti-tumor efficacy of BRD4 inhibitors [59–65]. Many combinations show promising results in preclinical models; yet it will be challenging to select combinations for clinical trials, as most studies have been conducted in

different tumor entities with different compounds and were assessed with different assays. One way to prioritize combination treatments may be to base their selection on our knowledge about their molecular mechanisms. As mentioned above, it is well described that BRD4 inhibition has significant effects on MYC expression and some, if not most, of its therapeutic effects, may be due to MYC repression. It is therefore likely that combining BRD4 inhibitors with other means of repressing MYC may potentiate the therapeutic effects of BRD4 inhibitors in a synergistic manner. Based on this idea, we selected to combine BRD4 and PLK1 inhibitors, as PLK1 inhibition is known to lead to increased MYC degradation [66]. This approach was recently shown to be successful in acute myeloid leukemia (AML) [33]. Consistent with reports in AML, combination of MK-8628 with Volasertib showed significant synergistic anti-medulloblastoma effects in MYC-expressing medulloblastoma cell lines but not cells expressing low levels of MYC. Interestingly, antagonistic effects were observed in UW228 cells, suggesting that other, yet to be defined mechanism of susceptibility to either BRD4 or PLK1 might be affected by inhibition of either target. This further substantiates the evidence that dual targeting of MYC by simultaneous inhibition of BRD4 and PLK1 might be a promising approach to increase therapeutic effects against a subset of medulloblastoma tumors. Intriguingly, several groups have recently described that many kinase inhibitors also have the ability to bind to the acetyllysine domain of BRD4, and Wang et al. explored and modulated the selectivity of such compounds and created selective dual inhibitors that target both PLK1 and BRD4 simultaneously [67]. Based on our observations about combining single-targeting BRD4 and PLK1 inhibitors, one might predict that the use of novel, dual-targeting agents might have the potential to generate clinically relevant therapeutic effects against MYC-driven tumors.

In summary, MK-8628 has promising preclinical anti-tumor activity against MYC-driven high-risk medulloblastoma, which can be potentiated by combination with PLK1 inhibitors. Further studies will be needed to carefully define *in vivo* activity of combination treatment once single agent phase I trials are completed and agents with favorable pharmacological properties are available, as this rationally devised strategy may have the potential to ameliorate the treatment of patients suffering from medulloblastoma.

Conflicts of interest

The authors have no conflict of interest to disclose.

Acknowledgements

A.G.H. is supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft – 398299703, the Berliner Krebsgesellschaft e.V., the Wilhelm Sander foundation and the Berlin Institute of Health. This work was supported by the German Cancer Foundation TransOnc program (ENABLE, 70112951). H.E.D. is supported by the Berlin Institute of Health (BIH) through TERMINATE-NB (CRG 04, 1.1.4.4). S.L. was supported by ASSET: Analysing and Striking the Sensitivities of Embryonal Tumours (FP7-HEALTH, ASSET).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.12.012>.

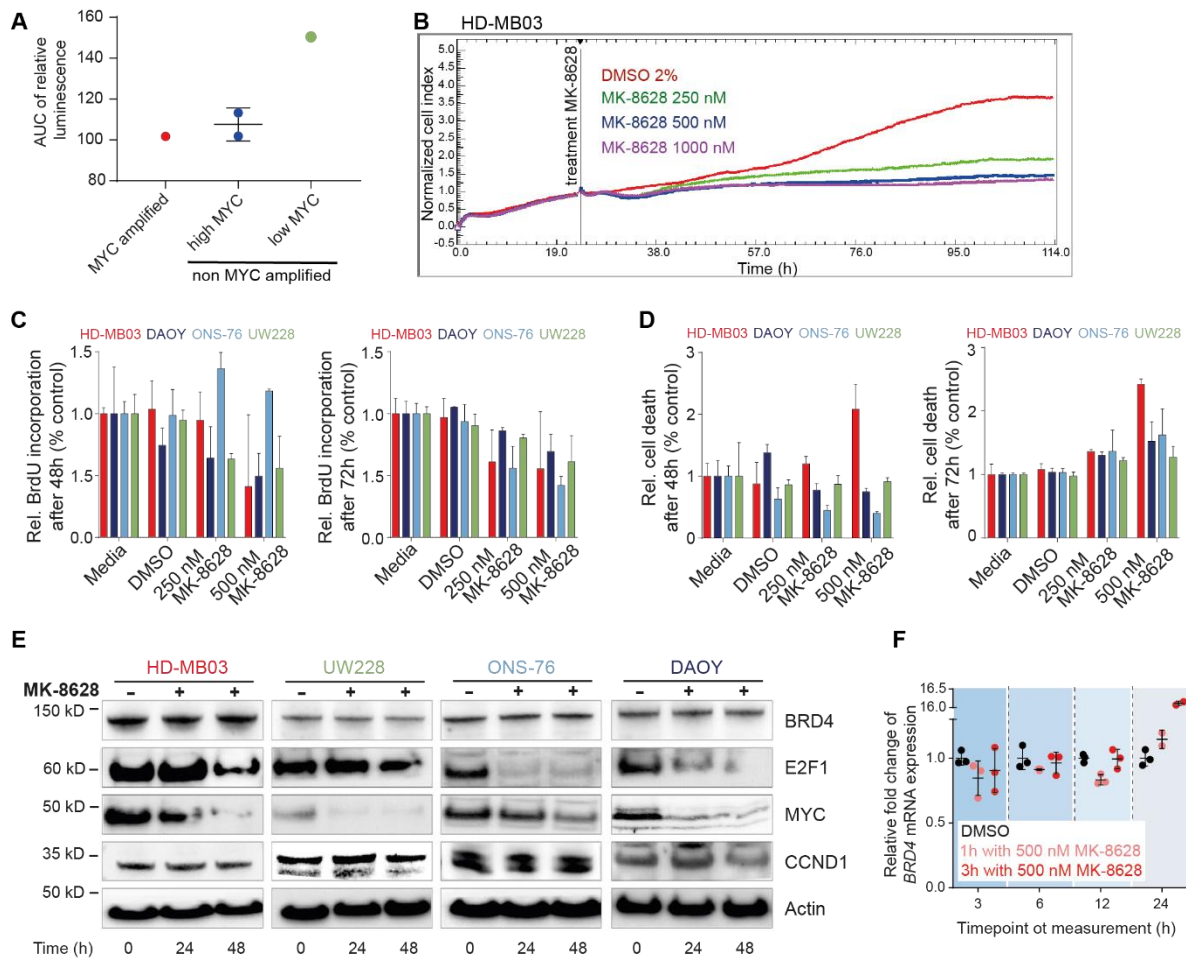
References

- M.D. Taylor, P.A. Northcott, A. Korshunov, M. Remke, Y.-J. Cho, S.C. Clifford, et al., Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus, *Acta Neuropathol.* 123 (4) (2012) 465–472.
- P.A. Northcott, A.M. Dubuc, S. Pfister, M.D. Taylor, Molecular subgroups of medulloblastoma, *Expert Rev. Neurother.* 12 (7) (2012) 871–884.
- V. Ramaswamy, M. Remke, E. Bouffet, S. Bailey, S.C. Clifford, F. Doz, et al., Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era: the current consensus, *Acta Neuropathol.* 131 (6) (2016) 821–831.
- D.W. Ellison, M. Kocak, J. Dalton, H. Megahed, M.E. Lusher, S.L. Ryan, et al., Definition of disease-risk stratification groups in childhood medulloblastoma using combined clinical, pathologic, and molecular variables, *J. Clin. Oncol.* 29 (11) (2011) 1400–1407.
- M. Kool, A. Korshunov, M. Remke, D.T. Jones, M. Schlanstein, P.A. Northcott, et al., 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.* 123 (4) (2012) 473–484.
- Y.J. Cho, A. Tsherniak, P. Tamayo, S. Santagata, A. Ligon, H. Greulich, et al., Integrative genomic analysis of medulloblastoma identifies a molecular subgroup that drives poor clinical outcome, *J. Clin. Oncol.* 29 (11) (2011) 1424–1430.
- S. Hacker, S. Karl, I. Mader, S. Cristofanon, T. Schweitzer, J. Krauss, et al., Histone deacetylase inhibitors prime medulloblastoma cells for chemotherapy-induced apoptosis by enhancing p53-dependent Bax activation, *Oncogene* 30 (19) (2011) 2275–2281.
- B. Barneda-Zahonero, M. Parra, Histone deacetylases and cancer, *Mol. Oncol.* 6 (6) (2012) 579–589.
- D. Horiuchi, B. Anderton, A. Goga, Taking on challenging targets: making MYC druggable, *Am. Soc. Clin. Oncol. Edu. Book* (2014) e497–502.
- P. Filippakopoulos, J. Qi, S. Picaud, Y. Shen, W.B. Smith, O. Fedorov, et al., Selective inhibition of BET bromodomains, *Nature* 468 (7327) (2010) 1067–1073.
- S.Y. Wu, C.M. Chiang, The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation, *J. Biol. Chem.* 282 (18) (2007) 13141–13145.
- S. Rahman, M.E. Sowa, M. Ottinger, J.A. Smith, Y. Shi, J.W. Harper, et al., The Brd4 extraterminal domain confers transcription activation independent of pTEFb by recruiting multiple proteins, including NSD3, *Mol. Cell Biol.* 31 (13) (2011) 2641–2652.
- J.E. Delmore, G.C. Issa, M.E. Lemieux, P.B. Rahl, J. Shi, H.M. Jacobs, et al., BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc, *Cell* 146 (6) (2011) 904–917.
- A. Puissant, S.M. Frumm, G. Alexe, C.F. Bassil, J. Qi, Y.H. Chanthery, et al., Targeting MYCN in neuroblastoma by BET bromodomain inhibition, *Cancer Discov.* 3 (3) (2013) 308–323.
- H. Herrmann, K. Blatt, J. Shi, K.V. Gleixner, S. Cerny-Reiterer, L. Mullauer, et al., Small-molecule inhibition of BRD4 as a new potent approach to eliminate leukemic stem- and progenitor cells in acute myeloid leukemia AML, *Oncotarget* 3 (12) (2012) 1588–1599.
- P. Bandopadhyay, G. Bergthold, B. Nguyen, S. Schubert, S. Gholamin, Y. Tang, et al., BET bromodomain inhibition of MYC-amplified medulloblastoma, *Clin. Canc. Res.* 20 (4) (2014) 912–925.
- A. Henssen, T. Thor, A. Odersky, L. Heukamp, N. El-Hindy, A. Beckers, et al., BET bromodomain protein inhibition is a therapeutic option for medulloblastoma, *Oncotarget* 4 (11) (2013) 2045–2056.
- J.E. Bolden, N. Tasdemir, L.E. Dow, J.H. van Es, J.E. Wilkinson, Z. Zhao, et al., Inducible in vivo silencing of Brd4 identifies potential toxicities of sustained BET protein inhibition, *Cell Rep.* 8 (6) (2014) 1919–1929.
- K. Althoff, A. Beckers, E. Bell, M. Nortmeyer, T. Thor, A. Sprussel, et al., A Cre-conditional MYCN-driven neuroblastoma mouse model as an improved tool for preclinical studies, *Oncogene* 34 (26) (2014 Jun) 3357–3368, <https://doi.org/10.1038/onc.2014.269> Epub 2014 Sep 1.
- A.G. Henssen, K. Althoff, A. Odersky, A. Beckers, R. Koche, F. Speleman, et al., Targeting MYCN-driven transcription by BET-bromodomain inhibition, *Clin. Canc. Res.* 22 (10) (2015 May 15) 2470–2481, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1449> Epub 2015 Dec 2.
- Y. Tang, S. Gholamin, S. Schubert, M.I. Willardson, A. Lee, P. Bandopadhyay, et al., Epigenetic targeting of Hedgehog pathway transcriptional output through BET bromodomain inhibition, *Nat. Med.* 20 (7) (2014) 732–740.
- S. Venkataraman, I. Alimova, I. Balakrishnan, P. Harris, D.K. Birks, A. Griesinger, et al., Inhibition of BRD4 attenuates tumor cell self-renewal and suppresses stem cell signaling in MYC driven medulloblastoma, *Oncotarget* 5 (9) (2014) 2355–2371.
- J.K.L. Noel, S. Ooike, K. Sugahara, H. Nakamura, M. Daibata, Development of the BET bromodomain inhibitor OTX015, *Proceeding of the 2013 AACR- NCI-EORTC Molecular Targets and Cancer Therapeutics Conference*, 2013, p. 414.
- M. Boi, E. Gaudio, P. Bonetti, I. Kwee, E. Bernasconi, C. Tarantelli, et al., The BET bromodomain inhibitor OTX015 affects pathogenetic pathways in preclinical B-cell tumor models and synergizes with targeted drugs, *Clin. Canc. Res.* 21 (7) (2015) 1628–1638.
- M.M. Coude, T. Braun, J. Berrou, M. Dupont, S. Bertrand, A. Masse, et al., BET inhibitor OTX015 targets BRD2 and BRD4 and decreases c-MYC in acute leukemia cells, *Oncotarget* 6 (19) (2015) 17698–17712.
- P. Herait, C. Berthon, C. Thieblemont, E. Raffoux, V. Magarotto, A. Stathis, et al., BET-bromodomain inhibitor OTX015 shows clinically meaningful activity at non-toxic doses: interim results of an ongoing phase I trial in hematologic malignancies, in: *Research IPotAMotAAFC* (Ed.), AACR; 2014 Apr 5-9; San Diego, CA. Philadelphia (PA), 2014.
- A phase I pharmacokinetic study of OTX015 for the treatment of patients with hematologic malignancies, in: E. Odore, K. Rezaei, E. Riveiro, F. Bourdel, P. Herait, E. Cvitkovic, et al. (Eds.), *Proceedings of the 105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*; 2014 Apr 5-9, Cancer Research, San Diego, 2014.
- Y. Xu, C.R. Vakoc, Targeting cancer cells with BET bromodomain inhibitors, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 7 (7) (2017).
- S. Ackermann, F. Goeser, J.H. Schulte, A. Schramm, V. Ehemann, B. Hero, et al., Polo-like kinase 1 is a therapeutic target in high-risk neuroblastoma, *Clin. Canc. Res.: Offic. J. Am. Assoc. Canc. Res.* 17 (4) (2011) 731–741.
- Z. Liu, Q. Sun, X. Wang, PLK1, A potential target for cancer therapy, *Translat. Oncol.* 10 (1) (2016) 22–32.
- J. Triscott, C. Lee, C. Foster, B. Manoranjan, M.R. Pambid, R. Berns, et al., Personalizing the treatment of pediatric medulloblastoma: Polo-like kinase 1 as a molecular target in high-risk children, *Cancer Res.* 73 (22) (2013) 6734–6744.
- J. Tan, Z. Li, P.L. Lee, P. Guan, M.Y. Aau, S.T. Lee, et al., PDK1 signaling toward PLK1-MYC activation confers oncogenic transformation, tumor-initiating cell activation, and resistance to mTOR-targeted therapy, *Cancer Discov.* 3 (10) (2013) 1156–1171.
- U. Tontsch-Grunt, D. Rudolph, I. Waizenegger, A. Baum, D. Gerlach, H. Engelhardt, et al., Synergistic activity of BET inhibitor BI 894999 with PLK inhibitor volasertib in AML in vitro and in vivo, *Cancer Lett.* 421 (2018) 112–120.
- R.L. Yauch, Dijkgraaf GJP, B. Aliche, T. Januario, C.P. Ahn, T. Holcomb, et al., Smoothed mutation confers resistance to a hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma, *Science* 326 (5952) (2009) 572–574.
- A.G. Henssen, C. Reed, E. Jiang, H.D. Garcia, J. von Stebut, I.C. MacArthur, et al., Therapeutic targeting of PGBD5-induced DNA repair dependency in pediatric solid tumors, *Sci. Transl. Med.* 9 (414) (2017).
- J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, et al., Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol.* 3 (7) (2002) RESEARCH0034.
- A. Henssen, K. Althoff, A. Odersky, A. Beckers, R. Koche, F. Speleman, et al., Targeting MYCN-driven transcription by BET-bromodomain inhibition, *Clin. Canc. Res.: Offic. J. Am. Assoc. Canc. Res.* 22 (10) (2016) 2470–2481.
- R.C. Gentleman, V.J. Carey, D.M. Bates, B. Bolstad, M. Dettling, S. Dudoit, et al., Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics, *Genome Biol.* 5 (10) (2004) R80.
- F. Hong, R. Breitling, C.W. McEntee, B.S. Wittner, J.L. Nemhauser, J. Chory, RankProd: a bioconductor package for detecting differentially expressed genes in meta-analysis, *Bioinformatics* 22 (22) (2006) 2825–2827.
- G. Yu, L.G. Wang, Y. Han, Q.Y. He, clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters, *OMICS* 16 (5) (2012) 284–287.
- K.I. Zeller, A.G. Jegga, B.J. Aronow, K.A. O'Donnell, C.V. Dang, An integrated database of genes responsive to the Myc oncogenic transcription factor: identification of direct genomic targets, *Genome Biol.* 4 (10) (2003) R69.
- Y.H. Kim, L. Girard, C.P. Giacomini, P. Wang, T. Hernandez-Boussard, R. Tibshirani, et al., Combined microarray analysis of small cell lung cancer reveals altered apoptotic balance and distinct expression signatures of MYC family gene amplification, *Oncogene* 25 (1) (2006) 130–138.
- M. Schuhmacher, F. Kohlhuber, M. Holzel, C. Kaiser, H. Burtscher, M. Jarsch, et al., The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc, *Nucleic Acids Res.* 29 (2) (2001) 397–406.
- F. Westermann, D. Muth, A. Benner, T. Bauer, K.O. Henrich, A. Oberthuer, et al., Distinct transcriptional MYCN/c-MYC activities are associated with spontaneous regression or malignant progression in neuroblastomas, *Genome Biol.* 9 (10) (2008) R150.
- L. He, E. Kuleskiy, J. Saarela, L. Turunen, K. Wennerberg, T. Aittokallio, et al., Methods for high-throughput drug combination screening and synergy scoring, *Methods Mol. Biol.* 1711 (2018) 351–398.
- M.-M. Coudé, T. Braun, J. Berrou, M. Dupont, S. Bertrand, A. Masse, et al., BET inhibitor OTX015 targets BRD2 and BRD4 and decreases c-MYC in acute leukemia cells, *Oncotarget* 6 (19) (2015) 17698–17712.
- V. Sahai, A.J. Redig, K.A. Collier, F.D. Eckerdt, H.G. Munshi, Targeting BET bromodomain proteins in solid tumors, *Oncotarget* 7 (33) (2016) 53997–54009.
- Z. Yang, N. He, Q. Zhou, Brd4 recruits P-TEFb to chromosomes at late mitosis to promote G1 gene expression and cell cycle progression, *Mol. Cell Biol.* 28 (3) (2008) 967–976.
- S. Abbou, C. Lanvers-Kaminsky, E. Daudigeos-Dubus, L. LE Dret, C. Laplace-Builhe, J. Molenaar, et al., Polo-like kinase inhibitor volasertib exhibits antitumor activity and synergy with Vincristine in pediatric malignancies, *Anticancer Res.* 36 (2) (2016) 599–609.
- P. Ciceri, S. Muller, A. O'Mahony, O. Fedorov, P. Filippakopoulos, J.P. Hunt, et al., Dual kinase-bromodomain inhibitors for rationally designed polypharmacology, *Nat. Chem. Biol.* 10 (4) (2014) 305–312.
- D. Rudolph, M.A. Impagnatiello, C. Blaukopf, C. Sommer, D.W. Gerlich, M. Roth, et al., Efficacy and mechanism of action of volasertib, a potent and selective inhibitor of Polo-like kinases, in preclinical models of acute myeloid leukemia, *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 352 (3) (2015) 579–589.
- B. Knoechel, J.E. Roderick, K.E. Williamson, J. Zhu, J.G. Lohr, M.J. Cotton, et al., An epigenetic mechanism of resistance to targeted therapy in T cell acute

- lymphoblastic leukemia, *Nat. Genet.* 46 (4) (2014) 364–370.
- [53] J. Loven, H.A. Hoke, C.Y. Lin, A. Lau, D.A. Orlando, C.R. Vakoc, et al., Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers, *Cell* 153 (2) (2013) 320–334.
- [54] B. Chapuy, M.R. McKeown, C.Y. Lin, S. Monti, M.G. Roemer, J. Qi, et al., Discovery and characterization of super-enhancer-associated dependencies in diffuse large B cell lymphoma, *Cancer Cell* 24 (6) (2013) 777–790.
- [55] W.A. Whyte, D.A. Orlando, D. Hnisz, B.J. Abraham, C.Y. Lin, M.H. Kagey, et al., Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes, *Cell* 153 (2) (2013) 307–319.
- [56] M. Muhar, A. Ebert, T. Neumann, C. Umkehrer, J. Jude, C. Wieshofer, et al., SLAM-seq defines direct gene-regulatory functions of the BRD4-MYC axis, *Science* 360 (6390) (2018) 800–805.
- [57] M. Perez-Salvia, M. Esteller, Bromodomain inhibitors and cancer therapy: from structures to applications, *Epigenetics* 12 (5) (2017) 323–339.
- [58] A. Stathis, E. Zucca, M. Bekradda, C. Gomez-Roca, J.P. Delord, T. de La Motte Rouge, et al., Clinical response of carcinomas harboring the BRD4-NUT oncoprotein to the targeted bromodomain inhibitor OTX015/MK-8628, *Cancer Discov.* 6 (5) (2016) 492–500.
- [59] P.K. Mazur, A. Herner, S.S. Mello, M. Wirth, S. Hausmann, F.J. Sanchez-Rivera, et al., Combined inhibition of BET family proteins and histone deacetylases as a potential epigenetics-based therapy for pancreatic ductal adenocarcinoma, *Nat. Med.* 21 (10) (2015) 1163–1171.
- [60] L. Paoluzzi, D. Hanniford, E. Sokolova, I. Osman, F. Darvishian, J. Wang, et al., BET and BRAF inhibitors act synergistically against BRAF-mutant melanoma, *Cancer Med.* 5 (6) (2016) 1183–1193.
- [61] R. Vazquez, M.E. Riveiro, L. Astorgues-Xerri, E. Odore, K. Rezai, E. Erba, et al., The bromodomain inhibitor OTX015 (MK-8628) exerts anti-tumor activity in triple-negative breast cancer models as single agent and in combination with everolimus, *Oncotarget* 8 (5) (2017) 7598–7613.
- [62] L. Yang, Y. Zhang, W. Shan, Z. Hu, J. Yuan, J. Pi, et al., Repression of BET activity sensitizes homologous recombination-proficient cancers to PARP inhibition, *Sci. Transl. Med.* 9 (400) (2017).
- [63] L.T. Lam, X. Lin, E.J. Faivre, Z. Yang, X. Huang, D.M. Wilcox, et al., Vulnerability of small-cell lung cancer to apoptosis induced by the combination of BET bromodomain proteins and BCL2 inhibitors, *Mol. Canc. Therapeut.* 16 (8) (2017) 1511–1520.
- [64] J.C. Enssle, C. Boedicker, M. Wanior, M. Vogler, S. Knapp, S. Fulda, Co-targeting of BET proteins and HDACs as a novel approach to trigger apoptosis in rhabdomyosarcoma cells, *Cancer Lett.* 428 (2018) 160–172.
- [65] S. Karakashev, H. Zhu, Y. Yokoyama, B. Zhao, N. Fatkhutdinov, A.V. Kossenkov, et al., BET bromodomain inhibition synergizes with PARP inhibitor in epithelial ovarian cancer, *Cell Rep.* 21 (12) (2017) 3398–3405.
- [66] D. Xiao, M. Yue, H. Su, P. Ren, J. Jiang, F. Li, et al., Polo-like kinase-1 regulates myc stabilization and activates a feedforward circuit promoting tumor cell survival, *Mol. Cell* 64 (3) (2016) 493–506.
- [67] J. Wang, T. Erazo, F.M. Ferguson, D.L. Buckley, N. Gomez, P. Muñoz-Guardiola, et al., Structural and atropisomeric factors governing the selectivity of pyrimidobenzodiazepinones as inhibitors of kinases and bromodomains, *ACS Chem. Biol.* 13 (9) (2018 Sep 21) 2438–2448, <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00638> Epub 2018 Aug 31.

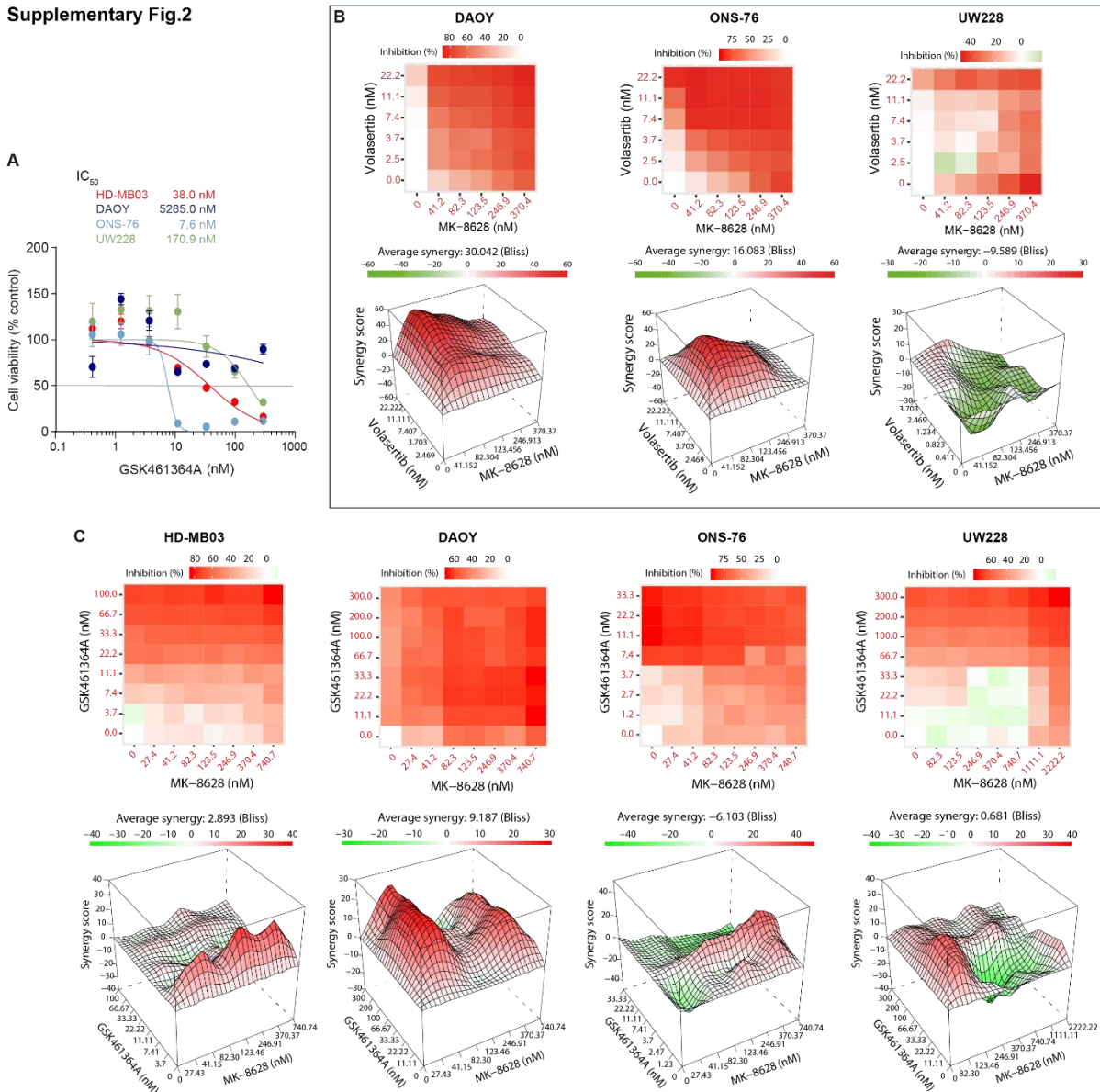
Ergänzende Materialien aus der Publikation

Supplementary Fig.1



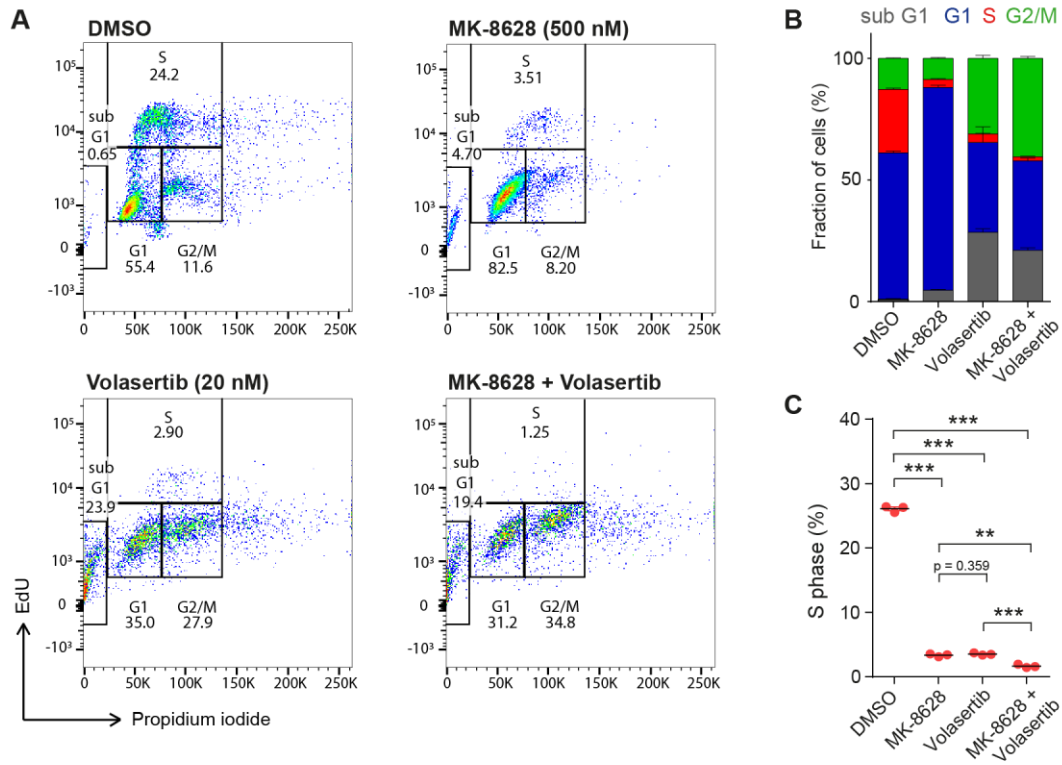
Supplementary Figure 1. (A) Area under the curve (AUC) of dose-response curves of *MYC*-amplified vs. non *MYC*-amplified high-*MYC* expressing vs. non *MYC*-amplified low-*MYC* expressing medulloblastoma cell lines treated with MK-8628. (B) Relative number of cells over time as measured using xCelligence impedance measurements of HD-MB03 medulloblastoma cells treated with MK-8628 (250 nM, 500 nM, 1000 nM) compared to DMSO treated control. (C) Relative BrdU incorporation of four medulloblastoma cell lines treated with MK-8628 (250 nM and 500 nM) or DMSO control for 48h (left) and 72h (right). (D) Relative amount of cell death, determined through detection of cytoplasmic histone-associated DNA fragments in medulloblastoma cell lines treated with MK-8628 (250 nM, 500 nM) or DMSO control for 48h (left) and 72h (right). (E) Protein expression as measured using western immunoblotting of known BRD4 target genes compared after treatment of four medulloblastoma cell lines with MK-8628 (500 nM) for 24h or 48h compared to no treatment control. (F) *BRD4* mRNA expression of medulloblastoma cell line HD-MB03 treated for 1 or 3 hours with 500 nM MK-8628 or DMSO control, measured at 3, 6, 12 or 24 hours after treatment washout.

Supplementary Fig.2



Supplementary Figure 2. (A) Dose response of four medulloblastoma cell lines treated with the PLK1 inhibitor GSK461364A for 72h. Inhibitory concentrations of 50% viability (IC₅₀) are stated in the diagram. (B) Excess over Bliss analysis of medulloblastoma cell lines treated with combinations of MK-8628 and Volasertib for 72h (red color indicates synergy). (C) Excess over Bliss analysis of medulloblastoma cell lines treated with combinations of MK-8628 and GSK461364A for 72h (red color indicates synergy).

Supplementary Fig.3



Supplementary Figure 3. (A) FACS-based measurement of the cell cycle distribution of DAOY cells after treatment with DMSO control, MK-8628 (500 nM), Volasertib (20 nM), or combination of both (500 nM MK-8628 + 20 nM Volasertib) for 24h. (B) Fraction of DAOY cells in each cell cycle phase after treatment with DMSO control, MK-8628 (500 nM), Volasertib (20 nM), or combination of both (500 nM MK-8628 + 20 nM Volasertib) for 24h. (C) Fraction of DAOY cells in S phase as measured in (B) (Student’s t-test: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$).

Supplementary table 1. List of Gene Ontology (GO) terms significantly changed after MK-8628 treatment of HD-MB03 cells.

	ID	Description	GeneR	BgRatio	p.adjust	qvalue
			atio			
1	GO:0002227	innate immune response in mucosa	8/306	21/15992	8.97994E-06	8.4026E-06
2	GO:0031497	chromatin assembly	16/306	151/15992	2.87923E-05	2.69412E-05
3	GO:0006323	DNA packaging	18/306	193/15992	2.87923E-05	2.69412E-05
4	GO:0006334	nucleosome assembly	15/306	132/15992	2.87923E-05	2.69412E-05
5	GO:0006333	chromatin assembly or disassembly	17/306	176/15992	3.22752E-05	3.02001E-05
6	GO:0034728	nucleosome organization	16/306	161/15992	4.20987E-05	3.93921E-05
7	GO:0002385	mucosal immune response	8/306	31/15992	4.20987E-05	3.93921E-05
8	GO:0002251	organ or tissue specific immune response	8/306	33/15992	6.2709E-05	5.86773E-05
9	GO:0019731	antibacterial humoral response	8/306	43/15992	0.000492981	0.000461286
10	GO:0042462	eye photoreceptor cell development	7/306	31/15992	0.000519205	0.000485824
11	GO:0007601	visual perception	16/306	203/15992	0.000574142	0.000537229
12	GO:0050953	sensory perception of light stimulus	16/306	207/15992	0.000679504	0.000635817
13	GO:0071103	DNA conformation change	18/306	273/15992	0.001420804	0.001329457
14	GO:0061844	antimicrobial humoral immune response mediated by antimicrobial peptide	8/306	53/15992	0.001640782	0.001535292
15	GO:0042461	photoreceptor cell development	7/306	40/15992	0.002117336	0.001981207
16	GO:0001754	eye photoreceptor cell differentiation	7/306	42/15992	0.002779849	0.002601126
17	GO:0035914	skeletal muscle cell differentiation	8/306	63/15992	0.005002835	0.004681191
18	GO:0007178	transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	18/306	309/15992	0.005495319	0.005142012
19	GO:0065004	protein-DNA complex assembly	15/306	228/15992	0.006055471	0.00566615

20	GO:0071824	protein-DNA complex subunit organization	16/306	259/15992	0.006804871	0.006367369
21	GO:0007517	muscle organ development	19/306	359/15992	0.010457431	0.009785097
22	GO:0071478	cellular response to radiation	12/306	165/15992	0.01176091	0.011004772
23	GO:0060395	SMAD protein signal transduction	7/306	55/15992	0.01176091	0.011004772
24	GO:0046530	photoreceptor cell differentiation	7/306	56/15992	0.012633647	0.011821399
25	GO:0007179	transforming growth factor beta receptor signaling pathway	12/306	168/15992	0.012633647	0.011821399
26	GO:2000177	regulation of neural precursor cell proliferation	8/306	76/15992	0.012633647	0.011821399
27	GO:0009584	detection of visible light	7/306	57/15992	0.012633647	0.011821399
28	GO:0003407	neural retina development	7/306	58/15992	0.013630397	0.012754065
29	GO:0045814	negative regulation of gene expression, epigenetic	10/306	124/15992	0.015595999	0.014593294
30	GO:0090092	regulation of transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	13/306	206/15992	0.019279815	0.018040268
31	GO:0050830	defense response to Gram-positive bacterium	8/306	85/15992	0.02306357	0.021580757
32	GO:0061351	neural precursor cell proliferation	10/306	132/15992	0.02306357	0.021580757
33	GO:0006342	chromatin silencing	9/306	108/15992	0.02306357	0.021580757
34	GO:0001654	eye development	17/306	338/15992	0.028422214	0.026594879
35	GO:0071559	response to transforming growth factor beta	13/306	218/15992	0.02875532	0.02690657
36	GO:0086002	cardiac muscle cell action potential involved in contraction	6/306	49/15992	0.030343993	0.028393103
37	GO:0009583	detection of light stimulus	7/306	70/15992	0.033825603	0.031650871
38	GO:0003283	atrial septum development	4/306	20/15992	0.041193973	0.038545511
39	GO:0007603	phototransduction, visible light	5/306	35/15992	0.041193973	0.038545511
40	GO:0071214	cellular response to abiotic stimulus	15/306	291/15992	0.041193973	0.038545511

41	GO:0104004	cellular response to environmental stimulus	15/306	291/15992	0.041193973	0.038545511
42	GO:0007009	plasma membrane organization	7/306	74/15992	0.041918436	0.039223396
43	GO:0060537	muscle tissue development	17/306	357/15992	0.04203764	0.039334937
44	GO:0017015	regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway	8/306	98/15992	0.044093525	0.041258643
45	GO:1903844	regulation of cellular response to transforming growth factor beta stimulus	8/306	100/15992	0.049334549	0.046162709

Supplementary table 2. List of gene sets from the c6 oncogenic signatures (<http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp>) from Molecular Signatures Database (MSigDB) significantly enriched after MK-8628 treatment of HD-MB03 cells.

ID	Description	enrichmentScore	NES	p.adjust	qvalues
152	STK33_DN	-0.433839785	-1.629080594	0.016383495	0.011040952
155	STK33_SKM_DN	-0.468822593	-1.76088347	0.016383495	0.011040952
131	RPS14_DN.V1_DN	-0.470534025	-1.70796884	0.016383495	0.011040952
149	HOXA9_DN.V1_DN	-0.465539852	-1.693059071	0.016383495	0.011040952
42	ATF2_UP.V1_UP	-0.453484556	-1.647875263	0.016383495	0.011040952
56	E2F3_UP.V1_UP	-0.439910473	-1.596809882	0.016383495	0.011040952
76	PR2_EZH2_UP.V1_UP	-0.478572544	-1.739978753	0.016383495	0.011040952
188	LEF1_UP.V1_DN	-0.446609194	-1.62134305	0.016383495	0.011040952
25	AKT_UP_MTOR_DN.V1_DN	-0.48440516	-1.757578378	0.016383495	0.011040952
58	MYC_UP.V1_UP	-0.519478875	-1.884837144	0.016383495	0.011040952
24	CSR_LATE_UP.V1_UP	-0.534628648	-1.935143543	0.016383495	0.011040952
97	ESC_V6.5_UP_EARLY.V1_DN	-0.457163952	-1.652961283	0.016383495	0.011040952
124	RB_P107_DN.V1_UP	-0.530593075	-1.888547943	0.016383495	0.011040952
128	CAHOY_ASTROGLIAL	-0.456152121	-1.561119829	0.016383495	0.011040952
126	RB_P130_DN.V1_UP	-0.461360173	-1.633373061	0.029302326	0.019747042
4	E2F1_UP.V1_UP	-0.420616767	-1.526776585	0.032748538	0.022069469
80	JNK_DN.V1_UP	-0.418984692	-1.520852395	0.032748538	0.022069469
12	GCNP_SHH_UP_LATE.V1_UP	-0.41351885	-1.500379948	0.032748538	0.022069469
53	BCAT_BILD_ET_AL_DN	0.491726779	1.817863844	0.032748538	0.022069469
38	BCAT.100_UP.V1_UP	0.473341978	1.767965608	0.032748538	0.022069469
176	KRAS.600.LUNG.BREAST_UP.V1_DN	-0.383868689	-1.43977023	0.032748538	0.022069469
135	IL2_UP.V1_DN	-0.405634619	-1.475766761	0.032748538	0.022069469
189	LEF1_UP.V1_UP	-0.401216996	-1.459694708	0.032748538	0.022069469
40	ATF2_S_UP.V1_UP	-0.40404152	-1.469404083	0.032748538	0.022069469
62	SNF5_DN.V1_UP	-0.401365142	-1.453786333	0.032748538	0.022069469

84	CTIP_DN.V1_UP	-0.421003668	-1.493411537	0.032748538	0.022069469
83	CTIP_DN.V1_DN	-0.41629888	-1.469137616	0.032748538	0.022069469
51	P53_DN.V1_DN	-0.403358869	-1.46413297	0.034378638	0.023168004
99	ESC_V6.5_UP_LATE.V1_DN	-0.403978642	-1.465719574	0.034378638	0.023168004
181	KRAS.KIDNEY_UP.V1_UP	-0.419682783	-1.501553242	0.034378638	0.023168004
108	MEL18_DN.V1_UP	-0.410760468	-1.462025934	0.034378638	0.023168004
115	CRX_DN.V1_DN	-0.420607409	-1.488623909	0.034378638	0.023168004
110	PTEN_DN.V1_UP	-0.399437558	-1.449899191	0.035673839	0.02404085
27	AKT_UP.V1_DN	-0.394041128	-1.431869333	0.035673839	0.02404085
10	GCNP_SHH_UP_EARLY.V1_UP	-0.391878007	-1.419422941	0.035673839	0.02404085
23	CSR_LATE_UP.V1_DN	-0.401501166	-1.450284339	0.035673839	0.02404085
125	RB_P130_DN.V1_DN	0.333288982	1.474239845	0.035972592	0.024242181
93	ESC_J1_UP_EARLY.V1_DN	0.292473383	1.332542651	0.040178571	0.02707662
75	PRC2_EZH2_UP.V1_DN	-0.388298076	-1.411231801	0.040178571	0.02707662
87	MTOR_UP.N4.V1_DN	0.368492837	1.666438119	0.040178571	0.02707662
143	TGFB_UP.V1_DN	0.303254981	1.395458169	0.040178571	0.02707662
74	PRC2_EED_UP.V1_UP	0.320217246	1.475969554	0.040178571	0.02707662
150	HOXA9_DN.V1_UP	0.363651617	1.66690324	0.040178571	0.02707662
67	MEK_UP.V1_DN	0.325464232	1.485778328	0.040178571	0.02707662
133	IL15_UP.V1_DN	-0.387271077	-1.406956683	0.040178571	0.02707662
95	ESC_J1_UP_LATE.V1_DN	-0.385482266	-1.400457929	0.040178571	0.02707662
109	PTEN_DN.V1_DN	-0.384780426	-1.395489073	0.040178571	0.02707662
5	EGFR_UP.V1_DN	0.341928187	1.562539181	0.040178571	0.02707662
102	ALK_DN.V1_UP	-0.401015057	-1.427581293	0.044746437	0.030154937
30	MTOR_UP.V1_UP	-0.381593545	-1.379279398	0.046930023	0.03162647

Die Verwendung der eigenen Publikation und der dazugehörigen Materialien für die Dissertation erfolgt mit Genehmigung der Elsevier Verlag.

Elsevier Permission guidelines

<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions>

7. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8. Publikationsliste

Publikation 1:

Youjia Han, Sven Lindner, Yi Bei, Heathcliff Dorado Garcia, Natalie Timme, Kristina Althoff, Andrea Odersky, Alexander Schramm, Andrej Lissat, Annette Künkele, Hedwig E. Deubzer, Angelika Eggert, Johannes H. Schulte, Anton G. Henssen,

„Synergistic activity of BET inhibitor MK-8628 and PLK inhibitor Volasertib in preclinical models of medulloblastoma“.

Cancer Letters. Volume 445, 31 March 2019, Pages 24-33, ISSN 0304-3835.

Available online as Epub on 4 January 2019.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.12.012>

(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383518307274>)

Impact Factor: 6.491 (2017)

Publikation 2:

Natalie Timme, **Youjia Han**, Shuai Liu, Hailemichael O. Yosief, Heathcliff Dorado Garcia, Yi Bei, Filippos Klironomos, Ian C. MacArthur, Annabell Szymansky, Jennifer von Strebut, Victor Bardinnet, Constantin Dohna, Annette Künkele, Jana Rolff, Patrick Hundsdörfer, Andrej Lissat, Georg Seifert, Angelika Eggert, Johannes H. Schulte, Wei Zhang, Anton Henssen.

“Small-Molecule Dual PLK1 and BRD4 Inhibitors are Active Against Preclinical Models of Pediatric Solid Tumors“.

Translational Oncology. Volume 13, Issue 2, February 2020, Pages 221-232, ISSN 1936-5233

Available online as Epub on 21 December 2019.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2019.09.013>

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1936523319303900>)

Impact Factor: 3.071 (2017)

9. Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Dr. Anton George Henssen für die Themenstellung und Betreuung. Mit viel Geduld und raschen Antworten hat er mir eine Betreuung zukommen lassen, die ich mir nicht besser hätte wünschen können.

Zudem möchte ich dem Laborteam von Herrn Prof. Dr. Johannes Schulte in Essen, insbesondere Herrn Dr. Sven Lindner und Frau Dr. Andrea Ordesky für die Bereitstellung essenzieller Datensätze für diese Arbeit danken.

Außerdem bedanke ich mich bei meine Tutor Herrn Heathcliff Dorado-Garcia für seine freundliche Einführung in die Laborarbeit und seine kontinuierliche Hilfsbereitschaft, bei Herrn Yi Bei für die Unterstützung mit seinem enormen Wissen in der Bioinformatik, und bei Frau Natalie Timme für die freundliche Zusammenarbeit für die Promotion. Meinen weiteren Kolleginnen und Kollegen der AG Henssen möchte ich für die gute Arbeitsatmosphäre und unkomplizierte Hilfe ebenfalls danken.

Zuletzt, aber nicht weniger, möchte ich mich bei meiner Familie, namentlich bei Qingjun Han, Lanhua Zheng und Youyou Han bedanken, die mich auch während unserer schwersten Zeit maximal unterstützt und mir die für die Promotionsarbeit nötige Kraft gegeben haben. Ich bedanke mich auch bei meinen Freundinnen und Freunden für ihre Unterstützung und Geduld in jeder zeitaufwendigen Phase des Studiums und der Promotion.