

Aus dem
CharitéCentrum 15 für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie
Institut für Neuropathologie
Direktor: Prof. Dr. Frank Heppner

Habilitationsschrift

Paradigmenwechsel in der Klassifikation und Diagnostik neuropathologischer Tumoren durch neue molekulare Methoden

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Neuropathologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Leonille Schweizer
geboren in Heidelberg

Eingereicht: Juni 2021

Dekan: Prof. Dr. med. Axel R. Pries

1. Gutachter: Prof. Dr. Joachim Weis, Aachen

2. Gutachterin: Prof. Dr. Christine Stadelmann-Nessler, Göttingen

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| ABKÜRZUNGEN | 3 |
| EINLEITUNG | 4 |
| Neue molekulare Methoden in der neuropathologischen Tumordiagnostik..... | 4 |
| Methylierungsbasierte Klassifikation von Hirntumoren | 6 |
| Epigenetische Befunde und molekulare Co-Evolution der Befundsprache | 7 |
| Übergang von morphologisch zu epigenetisch definierten Entitäten und integrierten molekularen Diagnosen..... | 8 |
| Bedeutung des molekularen Wandels für die Ausbildung von Neuropathologen .. | 10 |
| Der Paradigmenwechsel am Beispiel verschiedener neuropathologischer Tumorentitäten und diagnostischer Herausforderungen | 10 |
| <i>Papilläre Kraniopharyngeome und Rathke Zysten</i> | 11 |
| <i>Solitär Fibröse Tumoren und Hämangioperizytome der Meningen</i> | 11 |
| <i>Paragangliome des zentralen Nervensystems</i> | 12 |
| <i>Ependymale Mischtumoren der hinteren Schädelgrube</i> | 13 |
| Zielsetzung | 14 |
| EIGENE ARBEITEN | 15 |
| 1. <i>BRAF</i> Mutationsanalyse in papillären Kraniopharyngeomen und Rathke Zysten | 15 |
| 2. <i>NAB2-STAT6</i> Fusion in meningealen Hämangioperizytomen und solitär fibrösen Tumoren | 26 |
| 3. Methylierungsbasierte Klassifikation von Hirntumoren..... | 35 |
| 4. Molekulare Charakterisierung von Paragangliomen des ZNS..... | 43 |
| 5. <i>TERT</i> Promotormutationen und Verlust von Chromosome 6 als prognostische Marker einer Risikogruppe innerhalb der Methylierungsklasse Subependymom, posterior fossa | 58 |
| DISKUSSION | 70 |
| ZUSAMMENFASSUNG..... | 80 |
| LITERATURANGABEN | 81 |
| DANKSAGUNG | 90 |
| ERKLÄRUNG | 91 |

ABKÜRZUNGEN

| | |
|-------|---|
| 450k | Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip Array |
| BRAF | serine/threonine-protein kinase B-Raf |
| CEP | Cauda Equina Paragangliom |
| DNA | Desoxyribonucleic Acid |
| EPIC | Infinium MethylationEPIC BeadChip Array |
| FFPE | Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe |
| FISH | Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung |
| H3 | Histon H3 |
| H&E | Hämatoxylin und Eosin |
| HPZ | Hämangioperizytom |
| IHC | Immunhistochemie/Immunhistologie |
| IDH | Isocitratdehydrogenase |
| MGMT | O(6)-Methylguanin-DNA-Methyltransferase |
| MN1 | meningioma (disrupted in balanced translocation) 1 |
| NAB2 | NGFIA-binding protein 2 |
| NF1 | Neurofibromin 1 |
| NGS | Next Generation Sequencing |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PNET | Primitiv neuroektodermaler Tumor |
| RET | Proto-Oncogene Tyrosine-Protein Kinase Receptor Ret |
| RNA | Ribonucleic Acid |
| SDHB | Succinate Dehydrogenase Complex Iron Sulfur Subunit B |
| SFT | Solitär fibröser Tumor |
| STAT6 | Signal Transducer and Activator of Transcription 6 |
| TERT | Telomerase reverse transcriptase |
| t-SNE | t-distributed stochastic neighbor embedding |
| VHL | von Hippel-Lindau |
| WHO | World Health Organization |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

EINLEITUNG

Neue molekulare Methoden in der neuropathologischen Tumordiagnostik

Die aktuelle WHO Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems von 2016 umfasst über 100 bekannte Entitäten in 17 verschiedenen Kategorien [42]. Die Einteilung in diagnostische Kategorien beruht seit vielen Jahrzehnten vor allem auf der Histologie ergänzt durch die immunhistochemisch nachweisbare Expression von Proteinen, wobei unter anderem die morphologische Ähnlichkeit zu normalem Ursprungsgewebe als auch der Differenzierungsgrad der Tumoren eine große Rolle spielen. Die Gradierung (WHO Grad I – IV) von Hirntumoren basiert nicht allein auf dem Vorhandensein von histologischen Malignitätskriterien, sondern tradiert auch Wissen über die Malignität und Prognose einiger Entitäten.

Während der vergangenen 20 Jahre wurden zunehmend genetische und chromosomale Veränderungen nachgewiesen, die für einige Hirntumorentitäten kanonische Alterationen darstellen, beispielsweise der kombinierte Verlust von 1p19q in Oligodendrogliomen oder die *IDH1* Mutation in diffusen Astrozytomen. Während molekulare Veränderungen in vorherigen WHO Klassifikationen (1979-2007, [38]) keine Berücksichtigung bei der Kategorisierung von Hirntumoren fanden, wurden 2016 erstmals genetische und epigenetische Veränderungen bei einzelnen Hirntumorentitäten als diagnostisch definierende Befunde in die Klassifikation aufgenommen und auch in der Nomenklatur abgebildet, so beispielweise bei den diffusen Mittelliniengliomen, H3 K27M mutiert oder den Ependymomen mit *RELA* Fusion [42].

Gründe für die Aufnahme molekularer Marker in die aktuelle WHO Klassifikation von 2016 waren zum einen die nachgewiesene, prognostische Bedeutung einzelner Veränderungen, beispielsweise bei Glioblastomen mit *IDH1* R132H Mutation, die eine deutlich bessere Prognose aufweisen als Glioblastome, *IDH* Wildtyp [42, 55]. Zum anderen auch die hohe Interobserver-Variabilität und geringe Reproduzierbarkeit bei der auf rein histopathologischen Kriterien beruhenden Diagnosestellung, die vor allem im Bereich der höhergradigen, kindlichen Tumoren zu häufigen Fehldiagnosen führte [24, 74]. Mit der als Modell dienenden, umfassenden genetischen Charakterisierung einzelner Hirntumorentitäten, wie beispielsweise der Medulloblastome [29, 31, 53], und der Verfügbarkeit von Hochdurchsatzverfahren gewannen in den vergangenen 10

Jahren genomweite Analysemethoden gegenüber Einzelgen-Analysen zunehmend an Bedeutung, neben der Genom- bzw. Exomsequenzierung in der Neuropathologie vor allem auch die ganzgenomische Methylierungsanalyse (siehe Abbildung 1, MOLECULAR METHODS).

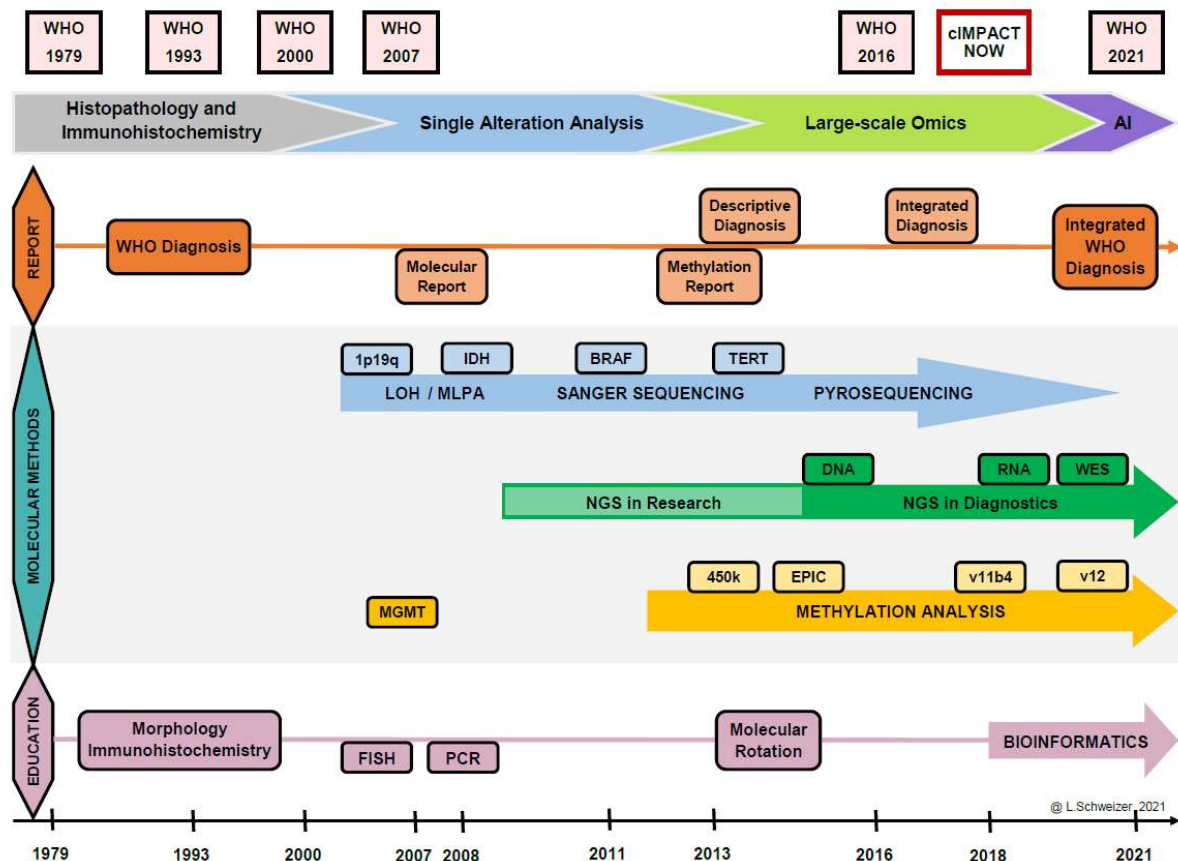


Abbildung 1 Neuropathologische Tumordiagnostik von 1979 (WHO Classification of CNS Tumors, 1st edition) bis 2021 (5th edition): Übergang von der Ära der Histologie und Immunhistochemie (IHC), über die Epoche der Bestimmung singulärer, genetischer Faktoren, in die aktuelle Phase der komplexen (epi)genomischen Analysen mit Transition in das computer-assistierte Zeitalter. REPORT: Veränderung der über die vergangenen Jahre gültigen histologie-basierten WHO Diagnosen zu integrierten, molekularen WHO Diagnosen in der kommenden WHO Klassifikation sowie Meilensteine der notwendigen Co-Evolution der Diagnostiksprache in Befund- und Diagnose-Formaten. MOLECULAR METHODS: blau - genetische Einzelparameter-Bestimmung (Chromosomenarm-Verluste, Punktmutationen) mittels Mikrosatellitenanalyse (LOH), multiplexer, ligationsabhängiger Sondenamplifikation (MLPA), Sanger Sequenzierung und Pyrosequenzierung. Grün: Next-Generation Sequencing (NGS) Verfahren auf DNA und RNA Basis von kleinen Genpanels bis zur Whole Exome Sequenzierung (WES) zunächst in der Forschung, später dann routinemäßig in der Diagnostik. Gelb: von der MGMT Promotormethylierungsanalyse zu ganz genomische Methylierungsanalysen mittels Illumina Arrays (450k, EPIC) und bioinformatischer Modelle (Classifier Versionen v11b4, v12). Violett: morphologie-dominierte Ausbildung in der Neuropathologie mit nebenbei Erlernen von FISH und PCR bis zur Einführung der molekularen Rotation in der universitären Zentrums-Neuropathologie und Anwendung bioinformatischer Analysen in der täglichen Arbeit. Abweichend von den regulären WHO Klassifikationen seit 2017 cIMPACT-NOW Empfehlungen (the Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy), Abbildung: L. Schweizer, 2021.

Methylierungsbasierte Klassifikation von Hirntumoren

Das epigenetische Profil von Tumorzellen besteht aus somatisch erworbenen Veränderungen und der embryonalen Entwicklung entstammenden Signaturen, die Rückschlüsse auf die Ursprungszelle des Tumors erlauben [25]. In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das Methylierungsprofil von Tumoren auch bei primitiver Morphologie und während der Tumorevolution bis hin zur Metastasierung nach langer Latenzzeit relativ stabil ist und eine Zuordnung zum Ursprungsgewebe eines Tumors ermöglicht [49, 53].

Mit Entwicklung der Methylation Arrays von Illumina (Infinium® HumanMethylation450 BeadChip (450k – 450.000 Methylierungsstellen/CpGs im Genom), Infinium® MethylationEPIC BeadChip (850k – 850.000 CpGs)) stand erstmals ein ganz genomischer Methylierungsassay zur Verfügung, der auch mit FFPE Proben bei relativ geringer DNA Einsatzmenge preiseffizient reproduzierbare Ergebnisse generierte.

Der Einsatz der Methode bei der Charakterisierung einzelner Tumorentitäten zeigte, dass zum einen morphologisch schwer unterscheidbare Differentialdiagnosen auf Basis des Methylierungsprofils sicher erkannt werden konnten, zum anderen auch innerhalb bekannter Entitäten neue epigenetisch definierte Subklassen erkennbar wurden (z.B. neue Entitäten innerhalb der primitiven neuroektodermalen Tumoren/PNETs des ZNS) [71], die Aufschluss über die molekulare Heterogenität morphologisch definierter Tumorkategorien gaben und teilweise prognostische und therapeutische Bedeutung besitzen (z.B. Methylierungssubklassen bei Medulloblastomen) [29, 31].

Zwischen 2013 und 2018 wurden im Rahmen des Brain Tumor Classifier Projektes der Versuch unternommen, auf Grundlage epigenetischer Profile eine unabhängige, molekulare Klassifikation der ZNS Tumoren zu etablieren, die in Ergänzung zur histopathologischen Diagnostik hinsichtlich der Verbesserung der diagnostischen Genauigkeit und klinischen Nützlichkeit evaluiert werden sollte (Ergebnisse der Studie siehe 3. Arbeit, [11]). Die 2018 publizierte und aktuelle Version des Brain Tumor Classifiers (v11b4) bildet über 80 Tumor-Methylierungsklassen ab, gehört vor allem im pädiatrischen Bereich inzwischen zum diagnostischen Standard in Deutschland und ist für auch für spezifische, adulte Hirntumorentitäten unverzichtbarer Bestandteil der Routinediagnostik geworden [11, 31, 53].

Epigenetische Befunde und molekulare Co-Evolution der Befundsprache

Die zunehmende „Molekularisierung“ der neuropathologischen Tumordiagnostik über die vergangenen Jahre hat sich auch in der Art der Befundung und diagnostischen Sprache niedergeschlagen und letztendlich auch zu neuen Beschreibungen, Diagnosen und Entitätsbezeichnungen geführt, in denen molekulare Parameter integraler Bestandteil des Tumornamens geworden sind (siehe Abbildung 1, REPORT).

Während vor einigen Jahren noch einzelne molekulare Faktoren, wie beispielsweise der 1p19q oder MGMT Status, unabhängig von der zugrundeliegenden histomorphologischen Diagnose als separater molekularer Befund, oft Nachtragsbefund, an den Kliniker übermittelt wurde, machte das veränderte molekulare Verständnis der Tumoren es mit der Zeit erforderlich, dass sogenannte integrierte molekulare Befunde entstanden. Diese integrierenden Befunde fassen sowohl histomorphologische und immunhistochemische als auch molekulare Ergebnisse in einem Befund zusammen und erst die Kombination der Informationsebenen erlaubt eine exakte und finale Diagnosestellung.

Die hinzukommenden genetischen und epigenetischen Informationsebenen machten wiederum eine molekulare Co-Evolution der neuropathologischen Diagnostiksprache erforderlich. Zu Beginn der Implementierung der methylierungsbasierten Tumorklassifikation in die Routinediagnostik (erste Befunde ab Mitte 2013 in Heidelberg) musste zunächst ein neues Befundformat geschaffen werden, welches zum einen den Bezug zur morphologischen WHO Diagnose herstellte, zum anderen eine neue Form von Information transportierte.

Die Herausforderung bestand hierbei nicht nur in der Übermittlung eines singulären genetischen Parameters wie bisher, sondern vielmehr in der Vermittlung einer komplexen, ganzgenomischen Informationsebene, deren diagnostischer Wert sich erst aus einem auf maschinellem Lernen beruhenden Algorithmus und Vergleich mit einer Referenzdatenbank epigenetischer Tumorprofile ergab. Anhand tausender, iterierender Entscheidungsbäume (sog. Random Forest Model mit Kalibrierungsmodell) wurde ein Ähnlichkeitswert (sog. Classifier Score) zwischen 0 und 1 bestimmt, der für einen untersuchten Einzelfall die Zugehörigkeit des Methylierungsprofils zu bereits definierten Tumorklassen ergab. Die Interpretation dieser Scores wurde mit Einführung diagnostischer Grenzwerte (Cutoffs für die

Klassifikation) zwar später vereinfacht, dennoch bestand eine der großen Herausforderungen darin, diese neue Information in die Befundung einfließen zu lassen und neben den bisherigen, traditionellen Ergebnissen (z.B. Zelldifferenzierung, Mitoserate, Expression glialer Marker) sprachlich darzustellen und zu werten.

Eine weitere, besondere Herausforderung stellten diskrepante Fälle dar, bei denen beispielweise die Morphologie einem diffusen Astrozytom (WHO Grad II) entsprach, das epigenetische Profil jedoch dem eines Glioblastoms (WHO Grad IV) [8, 69]. Diese Konstellationen machten es erstmals erforderlich von den diagnostischen Kriterien der WHO Klassifikation abzuweichen und in gut begründeten Ausnahmefällen eine *deskriptive Diagnose* (z.B. diffuses Astrozytom mit den molekularen Eigenschaften eines Glioblastoms) zu favorisieren (siehe Abbildung 1, REPORT). Deskriptive Diagnosen, die sich also explizit nicht an den in der WHO Klassifikation etablierten Kategorien orientieren, wurde auch zunehmend wichtig und mehr und mehr genutzt für Tumoren, die sich nicht eindeutig klassifizieren und einer bereits bekannten Tumorentität zuordnen ließen.

Übergang von morphologisch zu epigenetisch definierten Entitäten und integrierten molekularen Diagnosen

Während dies zu Beginn auf Kliniker Seite, auch aufgrund der hierdurch entstehenden Unsicherheit die optimale Weiterversorgung des Patienten betreffend, nicht selten zu Unverständnis führte, sind deskriptive Diagnosen inzwischen im Dialog zwischen Diagnostiker und Kliniker akzeptiert und erhöhen die Aufmerksamkeit für Patienten mit einer ungewöhnlichen Konstellation an Befunden. Die höhere Bereitschaft auf Seiten der Neuropathologen, die eigene diagnostische Unsicherheit bei Implementierung neuer molekularer Analysen transparenter zu kommunizieren, hat durch den interdisziplinären Austausch letztlich den notwendigen Prozess der molekularen Transformation der Diagnostiksprache weiter vorangetrieben und den Weg geebnet für die Einführung klinisch nützlicher und informativer *integrierter molekularer Diagnosen* (siehe Abbildung 1, REPORT) [13, 62].

Anhand der WHO Klassifikationen der ZNS Tumoren der Jahre 2007 und 2016 lässt sich nachvollziehen, wie sich Tumorbezeichnungen von streng nach histologischen Kriterien definierten Diagnosen hin zu integrierten molekularen Diagnosen veränderten [38, 42]. Am Beispiel der Medulloblastome (Kapital 8: embryonale Tumoren) lässt sich die Transition in genetisch definierte Entitäten gut erkennen, wobei

übergangsweise noch ein Nebeneinander von traditionell histopathologischer Einteilung (a) und genetisch basierter Klassifikation aufgeführt ist (b, Abbildung 2).

| | | | |
|---|------------|---|------------|
| a 8 Embryonal tumours | 131 | b 8 Embryonal tumours | 183 |
| Medulloblastoma | 132 | Medulloblastoma | 184 |
| CNS primitive neuroectodermal tumours (PNETs) | 141 | Medulloblastoma, NOS | 186 |
| Medulloepithelioma | 143 | <i>Medulloblastomas, genetically defined</i> | 188 |
| Ependymoblastoma | 145 | Medulloblastoma, WNT-activated | 188 |
| Atypical teratoid/rhabdoid tumour | 147 | Medulloblastoma, SHH-activated and <i>TP53</i> -mutant | 190 |
| | | Medulloblastoma, SHH-activated and <i>TP53</i> -wildtype | 190 |
| | | Medulloblastoma, non-WNT/non-SHH | 193 |
| | | <i>Medulloblastomas, histologically defined</i> | 194 |
| | | Medulloblastoma, classic | 194 |
| | | Desmoplastic/nodular medulloblastoma | 195 |
| | | Medulloblastoma with extensive nodularity | 198 |
| | | Large cell / anaplastic medulloblastoma | 200 |
| | | Embryonal tumour with multilayered rosettes, C19MC-altered | 201 |
| | | Embryonal tumour with multilayered rosettes, NOS | 205 |
| | | Other CNS embryonal tumours | 206 |
| | | Medulloepithelioma | 207 |
| | | CNS neuroblastoma | 207 |
| | | CNS ganglioneuroblastoma | 207 |
| | | CNS embryonal tumour, NOS | 208 |
| | | Atypical teratoid/rhabdoid tumour | 209 |
| | | CNS embryonal tumour with rhabdoid features | 212 |

Abbildung 2 Ausschnitt aus dem Inhaltsverzeichnis (Contents) der WHO Klassifikationen der ZNS Tumoren aus den Jahren 2007 (a, links, [38]) und 2016 (b, rechts, [42]). Dargestellt ist auszugsweise die Gliederung des Kapitels 8 über embryonale Tumoren. Am Beispiel der Medulloblastome ist der Übergang von einer rein morphologisch definierten Diagnose (a) hin zu einem Nebeneinander von Klassifikationen (genetisch definierte Medulloblastome und histologisch definierte Medulloblastome) erkennbar. Für die genetisch definierten Medulloblastome ist bereits der Übergang zur integrierten molekularen Diagnose erkennbar, die das Vorhandensein von molekularen Faktoren (z.B. Sonic-Hedgehog-Signalweg (SHH) aktiviert, TP53 mutiert) in die Tumordiagnose inkorporiert.

Die 2016 nach Erscheinen der vierten, revidierten Version der WHO Klassifikation der ZNS Tumoren durch die International Society of Neuropathology (ISN) ins Leben gerufenen Initiative cIMPACT-NOW (the Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy) trug einer weiteren, mit der molekularen Revolution einhergehenden Notwendigkeit Rechnung, die bisher in diesem Ausmaß nicht bekannt war: der zunehmend schnelleren Implementierung neuer, wissenschaftlicher Erkenntnisse in die Routinediagnostik und vor allem Klinik [39]. Erstmals wurden, basierend auf Expertenmeinungen und von der strikten Befolgung der WHO Kriterien abweichend, spezifische diagnostische Richtlinien (cIMPACT-NOW updates) vorgeschlagen, die eine Implementierung neuer molekulare Ergebnisse in die Diagnostik zeitnah ermöglichen sollten und bereits als Vorarbeiten für die nächste Version der WHO Klassifikation erarbeitet wurden [7, 8, 22, 23, 39-41, 43, 44]. Die Entwicklung verdeutlicht, dass mit der molekularen Transformation der Hirntumordiagnostik neue Formate geschaffen wurden, um auf die nicht mehr

zeitgemäße, jahrelange Latenzzeit bis zum Neuerscheinen der diagnostischen Richtlinien der WHO Klassifikation zu reagieren [27, 40].

Bedeutung des molekularen Wandels für die Ausbildung von Neuropathologen

Die traditionelle Ausbildung junger Neuropathologen im Bereich der Hirntumordiagnostik basierte auf dem Erlernen von Fähigkeiten in der Makroskopie (Autopsie, Zuschnitt), Morphologie und der Interpretation immunhistochemischer Färbungen. Bis zur WHO Klassifikation von 2016 waren diese Fähigkeiten ausreichend, um das gesamte Spektrum der neuropathologischen Hirntumoren gemäß den gültigen Kriterien einzuordnen [38, 42]. Zusätzlich erfolgte zumeist eine parallel zur klassischen histomorphologischen Ausbildung stattfindende Basisausbildung in der Auswertung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) zur Beurteilung einzelner, chromosomaler Veränderungen (z.B. 1p19q Verlust) sowie Sanger bzw. Pyro-Sequenzierung zum Nachweis von Punktmutationen bzw. einer MGMT Promotormethylierung (siehe Abbildung 1, EDUCATION).

Mit der Einführung und schnellen Ausweitung der epigenetischen Klassifikation in der Routinediagnostik wurde eine intensivere und umfassendere, molekulare Ausbildung junger Assistenten notwendig, die 2014 zur Einführung der ersten molekularen Rotation neben den Standard-Rotationen (Neurochirurgisches Eingangsgut, Autopsie, Muskel&Nerv) in Heidelberg führte und später von anderen Standorten mit molekularem Tumordiagnostikschwerpunkt übernommen wurde. Neben dem Erlernen der Interpretation zunehmend komplexerer, molekularer Methoden, wie der ganz genomischen Methylierungsanalyse und der Next-Generation Sequencing basierten Panel Diagnostik, zeichnet sich inzwischen deutlich ab, dass hiermit einhergehend auch eine Erweiterung der Kenntnisse im Bereich der Bioinformatik, hier insbesondere im Bereich der *machine learning* Verfahren und der Adaption von Datenanalyse-Pipelines, für die korrekte Anwendung der neuen Methoden zur Tumorklassifikation notwendig ist.

Der Paradigmenwechsel am Beispiel verschiedener neuropathologischer Tumorentitäten und diagnostischer Herausforderungen

Die im Rahmen der Habilitationsschrift zusammengefassten Publikationen zeigen exemplarisch anhand von ausgewählten Entitäten und in den Veröffentlichungen angewandten molekularen Methoden die neuropathologische Hirntumorforschung vor, während und nach der epigenetischen Revolution. Die Arbeiten dokumentieren den

Übergang aus der Ära der Einzelgen- bzw. Punktmutationsanalysen (Publikation 1: *BRAF* Mutationsanalyse), über die Exomsequenzierung histomorphologisch definierter Entitäten (Publikation 2: *STAT6-NAB2* Fusion), die Etablierung der computergestützten, methylierungsbasierten Hirntumorklassifikation (Publikation 3: Hirntumor-Classifier), hin zur Identifizierung von neuen, epigenetisch definierten Tumorentitäten (Publikation 4: Paragangliome mit distinktem molekularem Profil) und letztlich zur Beschreibung von prognostisch relevanten Subgruppen und molekularen Biomarkern innerhalb epigenetisch definierter Tumorklassen (Publikation 5: *TERT* Promotormutation in ependymalen Tumoren mit dem Methylierungsprofil „Subependymom, posterior fossa“, PFSE). Im Folgenden soll als Einführung in das diagnostische Spannungsfeld zwischen traditioneller und moderner molekularer Neuropathologie und als Kontext für die folgenden Ergebnisse ein kurzer Überblick über die exemplarisch gewählten Tumorentitäten gegeben werden.

Papilläre Kraniopharyngeome und Rathke Zysten

Papilläre Kraniopharyngeome und Rathke Zysten sind Raumforderungen der Sella Region [42]. Die differentialdiagnostische Unterscheidung zwischen zystisch wachsenden papillären Kraniopharyngeomen und Rathke Zysten mit plattenepithelialer Metaplasie stellt selbst für erfahrene Diagnostiker eine Herausforderung dar. Bei beiden Läsionen handelt es sich um plattenepithelial differenzierte, zystische Strukturen, bei denen anhand von Symptomatik und Bildgebung keine Differenzierung zwischen Tumor oder Zyste getroffen werden kann [64]. Der Erhaltungszustand des Biopsates ist aufgrund der Fragilität der meist aus dünnen Lamellen bzw. Membranen aufgebauten Läsion oft nicht ausreichend für eine sichere histomorphologische Unterscheidung. Eine Differenzierung aus klinischer Perspektive ist jedoch auf Grund des unterschiedlichen Rezidivrisikos und Gesamtüberlebens zur Planung der Nachsorge und adjuvanten Therapie erforderlich.

Solitär Fibröse Tumoren und Hämangioperizytome der Meningen

Solitär fibröse Tumoren und Hämangioperizytome (SFT/HPZ) sind Weichgewebstumore, die an verschiedenen Stellen des Körpers entstehen können. Gemäß WHO Klassifikation der Weichgewebs- und Knochentumoren werden sie unter der Kategorie fibroblastische/myofibroblastische Tumoren eingeordnet [77]. In der WHO Klassifikation der ZNS Tumoren von 2016 firmieren sie unter der Kategorie mesenchymale, nicht meningotheleiale Tumoren, die üblicherweise von der Dura aus

wachsen [42]. Aufgrund des ähnlichen morphologischen Erscheinungsbildes geht man davon aus, dass nicht-meningeale und meningeale SFT/HPZ zu einer Entität gehören, wobei bei der Beurteilung der Malignität und der Prognose die Entstehung im ZNS Kompartiment einfließt und unterschiedliche Gradierungssysteme für periphere und zentrale Tumoren gültig sind.

Ein weiterer Unterschied in der für Neuropathologen geltenden WHO Klassifikation für ZNS Tumoren besteht in der Unterscheidung zwischen solitär fibrösen Tumoren und Hämangioperizytomen als distinkte Entitäten, wohingegen Pathologen beide Tumoren als Varianten einer Entität auffassen. Für Neuropathologen sind unter anderem die sehr häufigen fibroblastischen Meningeome eine wichtige Differentialdiagnose, die aufgrund ihrer geringeren Rezidivwahrscheinlichkeit sicher unterschieden werden müssen [42]. Weitere teils schwierig abzugrenzende Tumorentitäten, die im Bereich der Meningen entstehen können, sind atypische und anaplastische Meningeome, Synovialsarkome, mesenchymale Chondrosarkome, Ewing Sarkome und maligne periphere Nervenscheidentumoren. Alle vorgenannten Entitäten können eine spindelzellige Differenzierung und typische, verzweigte Gefäße (sogenannte „staghorn-like“ oder „hemangiopericytoma-like“ Gefäßnetze) aufweisen, welche eine eindeutige Diagnosestellung erschweren. Die typische, immunhistochemische Expression von CD34 in Tumoren der SFT/HPZF Familie kann insbesondere in malignen Varianten verloren gehen und ist differentialdiagnostisch von begrenztem Nutzen [4]. Zusammenfassend lassen sich SFT/HPZs aufgrund bisheriger, konventioneller Methoden, wie Morphologie und Immunhistochemie, nicht immer sicher von anderen, klinisch relevanten Differentialdiagnosen unterscheiden.

Paragangliome des zentralen Nervensystems

Paragangliome und Phäochromozytome gehören zu einer Familie von neuroendokrinen Tumoren mit charakteristischem, histomorphologischem Erscheinungsbild, die an unterschiedlichen Stellen im Körper entstehen können, überwiegend im Bereich der Nebenniere und des Grenzstranges [26, 37]. Paragangliome im Bereich des ZNS treten entweder in der Kopf-Hals-Region auf, hier vor allem im Bereich des Schläfenbeins, von wo aus sie sich in den Kleinhirnbrückenwinkel ausdehnen können, oder selten auch im Bereich der Cauda equina [66]. Bei Auftreten einer Raumforderung im ZNS mit neuroendokriner Differenzierung muss zunächst geklärt werden, ob es sich um eine Metastase, z.B. um

die eines neuroendokrinen Karzinoms oder eines peripheren Paraganglioms bzw. Phäochromozytoms handelt oder um einen primär im ZNS entstandenen Tumor (z.B. ZNS Paragangliom). Die diagnostische Situation wird zudem dadurch erschwert, dass ein Teil der ZNS Paragangliome Zytokeratine exprimiert und somit eine Differenzierung von einem metastasierten, neuroendokrinen Tumor nicht immer möglich ist [16, 47]. Distinkte immunhistochemische Marker, die eine eindeutige Zuordnung solcher Läsionen ermöglichen, gibt es nicht. Die korrekte Diagnosestellung hat nicht nur Auswirkungen auf die Therapie und Prognose des Patienten, sondern möglicherweise auch auf die Angehörigen, da im Falle eines peripheren Paraganglioms, insbesondere in metastasierter Situation, in bis zu 40% der Patienten Keimbahnveränderungen nachgewiesen werden können und eine entsprechende humangenetische Abklärung von Familienmitgliedern notwendig sein kann [26, 37].

Ependymale Mischtumoren der hinteren Schädelgrube

Subependymome der hinteren Schädelgrube sind gutartige Tumoren, werden gemäß WHO Grad I eingeordnet und gehören zur Methylierungsklasse „Subependymoma, posterior fossa (PFSE)“ [11, 42, 53]. Ependymome der hinteren Schädelgrube zeigen dagegen ein aggressiveres klinisches Verhalten, werden gemäß WHO Grad II eingeordnet und lassen sich den Methylierungsklassen „Ependymoma, posterior fossa A (PFA)“ und „Ependymoma, posterior fossa B (PFB)“ zuordnen [15, 52]. Neben den morphologisch reinen Subependymomen und Ependymomen gibt es im diagnostischen Alltag immer wieder sogenannte ependymale Mischtumoren, die abschnittsweise eine subependymale und ependymale Differenzierung zeigen in variablem Ausmaß. Die aktuelle WHO Klassifikation von 2016 empfiehlt, diese Tumoren basierend auf der ependymalen Komponente nach WHO Grad II einzuordnen, obwohl in Einzelfällen ein sehr gute Prognose dokumentiert ist [42]. Genaue Angaben über das erforderliche Ausmaß der ependymalen Komponente in Prozent sind in der aktuellen WHO Klassifikation nicht hinterlegt, in einzelnen neuropathologischen Textbüchern wird empfohlen, ab einer ependymalen Komponente von 10% des Tumorgewebes den WHO Grad II zu vergeben [2]. Dies führt im Routinealltag nicht selten zu diagnostischen Konflikten, aber auch zu Unsicherheiten bezüglich der Nachsorge der Patienten auf klinischer Seite, auch da systematische Analysen von Serien dieser Tumoren fehlen. Über den zugrundeliegende molekularen Hintergrund und den klinischen Verlauf dieser

ependymalen Mischtumoren ist bisher wenig bekannt, in einer Studie konnten vier Fälle der Methylierungsklasse PFSE zugeordnet werden [13].

Zielsetzung

Ziel der Arbeiten war die molekulare Charakterisierung von Tumoren aus dem neuropathologischen Diagnostikspektrum und die Beantwortung folgender Fragen:

- 1.) Gibt es molekulare Veränderungen, die pathognostisch für bestimmte Entitäten sind?
- 2.) Lässt sich durch die Detektion dieser molekularen Veränderungen die Präzision der neuropathologischen Hirntumordiagnostik verbessern?
- 3.) Lassen sich durch molekulare Analysen neue Tumorentitäten identifizieren?
- 4.) Lassen sich innerhalb von molekular definierten Tumorentitäten relevante Subgruppen unterscheiden?
- 5.) Korrelieren diese molekular definierten Subgruppen mit morphologischen und klinischen Charakteristika?
- 6.) Gibt es molekular definierte Subgruppen oder molekulare Biomarker, die prädiktive Bedeutung haben?
- 7.) Eignet sich die molekulare Charakterisierung von Tumoren als mögliche Grundlage einer neuen Patienten-Stratifizierung für klinische Studien?

EIGENE ARBEITEN

1. BRAF Mutationsanalyse in papillären Kraniopharyngeomen und Rathke Zysten

Schweizer L, Capper D, Hölsken A, Fahlbusch R, Flitsch J, Buchfelder M, Herold-Mende C, von Deimling A, Buslei R. *BRAF V600E analysis for the differentiation of papillary craniopharyngiomas and Rathke's cleft cysts*. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2015 Oct;41(6):733-42. doi: 10.1111/nan.12201. PMID: 25442675.

<https://doi.org/10.1111/nan.12201>

Brastianos et al. [6] wiesen 2014 in 95% aller papillären Kraniopharyngeome BRAF V600E Mutationen mittels Whole Exome Sequenzierung nach. In dieser Arbeit wurde untersucht, in wie weit sich die Bestimmung des BRAF Mutationsstatus eignet, um zwischen einem papillären Kraniopharyngeom und einer Rathke Zyste zu unterscheiden und ob die Bestimmung mit Routinemethoden in der alltäglichen Diagnostik umsetzbar ist.

Hierzu wurden 33 Rathke Zysten und 18 papilläre Kraniopharyngeome mittels mutationsspezifischem Antikörper gegen das mutierte BRAF V600E Epitop (VE1; [11]) untersucht sowie zusätzlich 16 Fälle mittels BRAF Pyrosequenzierung analysiert. Die untersuchten papillären Kraniopharyngeome zeigten eine immunhistochemische Expression des mutierten BRAF V600E Proteins in allen Fällen (18/18; 100%) sowie eine BRAF V600E Mutation in acht sequenzierten Fällen. Dagegen konnten nur in 3/33 initial als Rathke Zyste diagnostizierten Fällen BRAF V600E Mutationen mittels Immunhistochemie und Pyrosequenzierung nachgewiesen werden. Zwei dieser Fälle erfüllten bei der histopathologischen Reevaluation die morphologischen Kriterien eines papillären Kraniopharyngeoms, der dritte Fall erwies sich als zystisches Rezidiv eines mehrere Jahre zuvor resezierten papillären Kraniopharyngeoms.

Die Bestimmung des BRAF Mutationsstatus mittels Pyrosequenzierung oder Immunhistochemie (methodische Konkordanz 100%) eignet sich als diagnostisches Hilfsmittel zur Differenzierung zwischen einem papillären Kraniopharyngeom und einer Rathke Zyste bei zystischen Raumforderungen der Sella.

2. NAB2-STAT6 Fusion in meningealen Hämangioperizytomen und solitär fibrösen Tumoren

Schweizer L*, Koelsche C*, Sahm F*, Piro RM*, Capper D, Reuss DE, Pusch S, Habel A, Meyer J, Göck T, Jones DT, Mawrin C, Schittenhelm J, Becker A, Heim S, Simon M, Herold-Mende C, Mechttersheimer G, Paulus W, König R, Wiestler OD, Pfister SM, von Deimling A. *Meningeal hemangiopericytoma and solitary fibrous tumors carry the NAB2-STAT6 fusion and can be diagnosed by nuclear expression of STAT6 protein.* Acta Neuropathol. 2013 May;125(5):651-8. doi: 10.1007/s00401-013-1117-6. PMID: 23575898. *Gleichermaßen beigetragen.

<https://doi.org/10.1007/s00401-013-1117-6>

Im Jahr 2013 konnten in zwei Arbeiten *NAB2-STAT6* Fusionen in peripheren SFT/HPZs nachgewiesen werden [17, 60]. Die vorliegende Arbeit diente dem Zweck, genetische Veränderungen in solitär fibrösen Tumoren und Hämangioperizytomen des ZNS zu untersuchen, sie mit dem kürzlich zuvor identifizierten genetischen Profil peripherer SFT/HPZs zu vergleichen und immunhistochemische Surrogatmarker als differentialdiagnostische Hilfsmittel zu etablieren. Mittels DNA Whole Exome Sequenzierung konnten in 8/10 meningealen HPZs ebenfalls *NAB2-STAT6* Fusionen nachgewiesen werden. In einem der negativen Fälle konnte eine *NAB2-STAT6* Fusion mit intronischen Bruchpunkten mittels Sanger Sequenzierung nachgewiesen werden.

Eine immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen das C-terminale Ende des STAT6 Proteins zeigte eine Veränderung des Färbemusters: Tumoren mit *NAB2-STAT6* Fusion wiesen eine kräftige, nukleäre Expression auf, wohingegen Tumoren ohne die Fusion eine schwache zytoplasmatische Färbung zeigten. Die nukleäre STAT6 Expression konnte in 35/37 Hämangioperizytomen und 25/25 solitär fibrösen Tumoren nachgewiesen werden, wohingegen 87 Meningeome und 51 andere Tumoren eine zytoplasmatische Expression zeigten.

Die Arbeit etablierte die STAT6 Immunhistochemie als hochspezifischen Surrogatmarker für meningeale SFT/HPZs. Zudem wies das Vorhandensein der *NAB2-STAT6* Fusion daraufhin, dass meningeale SFTs und HPZs ebenfalls Varianten einer Tumorentität darstellen.

3. Methylierungsbasierte Klassifikation von Hirntumoren

Capper D*, Jones DTW*, Sill M*, Hovestadt V*, Schrimpf D, Sturm D, Koelsche C, Sahm F, Chavez L, Reuss DE, Kratz A, Wefers AK, Huang K, Pajtler KW, Schweizer L, Stichel D, Olar A, Engel NW, Lindenberg K, Harter PN, Braczynski AK, Plate KH, Dohmen H, Garvalov BK, Coras R, Hölsken A, Hewer E, Bewerunge-Hudler M, Schick M, Fischer R, Beschorner R, Schittenhelm J, Staszewski O, Wani K, Varlet P, Pages M, Temming P, Lohmann D, Selt F, Witt H, Milde T, Witt O, Aronica E, Giangaspero F, Rushing E, Scheurlen W, Geisenberger C, Rodriguez FJ, Becker A, Preusser M, Haberler C, Bjerkvig R, Cryan J, Farrell M, Deckert M, Hench J, Frank S, Serrano J, Kannan K, Tzirigos A, Brück W, Hofer S, Brehmer S, Seiz-Rosenhagen M, Hänggi D, Hans V, Rozsnoki S, Hansford JR, Kohlhof P, Kristensen BW, Lechner M, Lopes B, Mawrin C, Ketter R, Kulozik A, Khatib Z, Heppner F, Koch A, Jouvet A, Keohane C, Mühleisen H, Mueller W, Pohl U, Prinz M, Benner A, Zapatka M, Gottardo NG, Driever PH, Kramm CM, Müller HL, Rutkowski S, von Hoff K, Frühwald MC, Gnekow A, Fleischhack G, Tippelt S, Calaminus G, Monoranu CM, Perry A, Jones C, Jacques TS, Radlwimmer B, Gessi M, Pietsch T, Schramm J, Schackert G, Westphal M, Reifenberger G, Wesseling P, Weller M, Collins VP, Blümcke I, Bendszus M, Debus J, Huang A, Jabado N, Northcott PA, Paulus W, Gajjar A, Robinson GW, Taylor MD, Jaunmuktane Z, Ryzhova M, Platten M, Unterberg A, Wick W, Karajannis MA, Mittelbronn M, Acker T, Hartmann C, Aldape K, Schüller U, Buslei R, Lichter P, Kool M, Herold-Mende C, Ellison DW, Hasselblatt M, Snuderl M, Brandner S, Korshunov A, von Deimling A, Pfister SM. *DNA methylation-based classification of central nervous system tumours*. Nature. 2018 Mar 22;555(7697):469-474. doi: 10.1038/nature26000.

* Gleichermaßen beigetragen.

<https://doi.org/10.1038/nature26000>

Für die Therapieplanung und Nachsorge von Krebspatienten ist eine korrekte histopathologische Diagnose unerlässlich. Für die derzeit bekannten circa 100 Hirntumorentitäten variiert die diagnostische Genauigkeit erheblich, die Interobserver-Variabilität ist für einige Entitäten hoch und abhängig von der diagnostischen Erfahrung, der Verfügbarkeit ergänzender Methoden und der Güte des Biopsates. Ziel der Arbeit war es eine methylierungsbasierte Klassifikation von Hirntumoren unabhängig von Morphologie und Immunhistochemie zu etablieren und im diagnostischen Routinealltag hinsichtlich Praktikabilität und Validität zu prüfen. Im

Rahmen der Studie wurden zunächst epigenetische Profile von 2801 Tumoren erstellt, die 91 Methylierungsklassen (82 Tumorklassen, 9 Normalgewebe Referenzklassen) zugeordnet werden konnten. Mittels eines Machine Learning Modells (sog. Random Forest mit Kalibrierungsmodell) wurde basierend auf den Methylierungsdaten ein Hirntumor Classifier trainiert.

Im Folgenden wurden 1104 diagnostische Hirntumorbiopsate mit dem Infinium HumanMethylation450 BeadChip (450k) oder Infinium MethylationEPIC BeadChip (850k) prozessiert und durch das Modell klassifiziert. Ein Klassifikations-Score von > 0.9 wurde als eindeutige Zuordnung zu einer Hirntumorklasse gewertet und gelang in 88% der Fälle ($n = 977$). In 838 dieser Fälle (76%) konnte die histopathologische Diagnose bestätigt bzw. durch molekulare Subklassifikation präzisiert werden, in 129 Fällen (12%) führte die methylierungsbasierte Klassifikation zu einer Änderung der initialen Diagnose, in 10 Fällen ($< 1\%$) zeigte der Classifier eine nicht nachvollziehbare Klassenzugehörigkeit an und die initiale Diagnose wurde beibehalten. Im Falle der 129 Fälle, in denen eine Korrektur der Diagnose vorgenommen wurde, war dies in 92 Fällen mit einer Änderung des WHO Grades des Tumors verbunden.

In einigen Fällen konnte keine Diagnose gemäß der gültigen WHO Klassifikation gestellt werden und stattdessen wurde eine sogenannte deskriptive integrierte Diagnose favorisiert, welche histomorphologische, immunhistochemische und molekulare Parameter gleichermaßen inkorporiert (z.B. HGNET-MN1 – high grade neuroepithelial tumor with *MN1* alteration, vgl. auch [71]). Ein Teil der nicht-klassifizierbaren Fällen (Classifier Score < 0.9) konnte mittels bioinformatischer Analyse („unsupervised clustering“ und „t-distributed stochastic neighbor embedding“ (t-SNE)) neuen, bisher nicht bekannten epigenetischen Subklassen zugeordnet werden, die im Verlauf als molekular definierte Tumorentitäten etabliert wurden und in zukünftige Versionen der WHO Klassifikation aufgenommen werden (vgl. auch [76]).

Um eine flächendeckende Anwendung der epigenetischen Hirntumordiagnostik zu ermöglichen, ist über die Website <https://www.moleculareuropathology.org> der Upload von lokal erzeugten Methylierungsprofilen möglich. Diese werden mit der aktuellen Version des Hirntumor Classifier abgeglichen und das Ergebnis in Form eines automatisch erzeugten epigenetischen Reports ausgegeben.

4. Molekulare Charakterisierung von Paragangliomen des ZNS

Schweizer L, Thierfelder F, Thomas C, Soschinski P, Suwala A, Stichel D, Wefers AK, Wessels L, Misch M, Kim HY, Jödicke R, Teichmann D, Kaul D, Kahn J, Bockmayr M, Hasselblatt M, Younsi A, Unterberg A, Knie B, Walter J, Al Safatli D, May SA, Jödicke A, Ntoulia G, Moskopp D, Vajkoczy P, Heppner FL, Capper D, Hartmann W, Hartmann C, von Deimling A, Reuss DE, Schöler A, Koch A. *Molecular characterization of CNS paragangliomas identifies cauda equina paragangliomas as a distinct tumor entity*. Acta Neuropathol. 2020 Dec;140(6):893-906. doi: 10.1007/s00401-020-02218-7. PMID: 32926213.

<https://doi.org/10.1007/s00401-020-02218-7>

In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass multiple genetische Alterationen in die Entstehung von Paragangliomen und Phäochromozytomen, neuroendokrine Tumoren der Nebenniere und der Ganglien, involviert sein können, und dass bis zu 40% dieser Tumoren erblich sind [26, 37]. Zudem konnte in diesen Arbeiten nachgewiesen werden, dass sich diese Tumoren in vier molekulare Subgruppen einteilen lassen. Cauda Equina Paragangliome (CEP) wurden bisher nicht untersucht, man nahm bisher jedoch an, dass sie einer der vorbeschriebenen Subgruppen zugeordnet werden können.

Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass sich das epigenetische und genetische Profil von CEPs sehr deutlich von dem anderer Paragangliome unterscheidet. Während sich Kopf-Hals-Paragangliome eindeutig den abdominal und thorakal gelegenen Paragangliomen zuordnen lassen, wiesen CEPs ein sehr distinktes Methylierungsprofil auf und zeigten keine Mutationen oder Fusionen, die üblicherweise in anderen Paragangliomen auftreten, insbesondere keine genetischen Alterationen in bisher bekannten hereditären Paragangliom-Genen (u.a. *NF1*, *SDHB*, *RET*, *VHL*).

Die Morphologie von CEPs zeigte sich deutlich variabler als die anderer Paragangliome, zudem wiesen sie eine starke Expression von Zytokeratinen auf sowie eine fehlende Expression von GATA3, wohingegen in anderen Paragangliomen das Gegenteil der Fall ist. Des Weiteren zeigten sie ein distinktes klinisches Verhalten: im Gegensatz zu anderen Paragangliomen erfolgte eine Metastasierung sehr selten und blieb dann auf das spinale Kompartiment beschränkt. Die Arbeit definiert CEPs als sporadische Tumorentität mit einem eigenständigen morpho-molekularen und klinischen Profil.

5. TERT Promotormutationen und Verlust von Chromosome 6 als prognostische Marker einer Risikogruppe innerhalb der Methylierungsklasse Subependymom, posterior fossa

Thomas C, Thierfelder F, Träger M, Soschinski P, Müther M, Edelmann D, Förster A, Geiler C, Kim HY, Filipski K, Harter PN, Schittenhelm J, Eckert F, Ntoulas G, May SA, Stummer W, Onken J, Vajkoczy P, Schüller U, Heppner FL, Capper D, Koch A, Kaul D, Paulus W, Hasselblatt M, Schweizer L. *TERT promoter mutation and chromosome 6 loss define a high-risk subtype of ependymoma evolving from posterior fossa subependymoma*. Acta Neuropathol. 2021 Mar 23. doi: 10.1007/s00401-021-02300-8. PMID: 33755803.

<https://doi.org/10.1007/s00401-021-02300-8>

In dieser Arbeit wurde eine Serie von 50 adulten, ependymalen Tumoren der hinteren Schädelgrube untersucht. Die Serie beinhaltete auch 24 ependymale-subependymale Mischtumoren mit unterschiedlichem Prozentsatz an ependymalem Anteil (2-95%). Wir konnten zeigen, dass sich Tumoren mit subependymaler Komponente ausnahmslos der Methylierungsklasse „Subependymom, posterior fossa“ (PFSE) zuordnen ließen.

In mikrodisssezierten und separat epigenetisch untersuchten Anteilen von vier Mischtumoren konnten wir zeigen, dass in der zell dichteren, ependymalen Komponente ein Verlust von Chromosom 6 auftrat, wohingegen das Kopienzahlprofil der subependymalen Komponente keinen Verlust aufwies. In 21 Fällen der Serie ließ sich eine *TERT* Promotormutation und in 20 Fällen ein Chromosom 6 Verlust nachweisen, vornehmlich in Fällen mit ependymaler Morphologie.

Das Vorhandensein eines Chromosom 6 Verlustes, einer *TERT* Promotormutation oder einer reinen Ependymom-Morphologie waren mit einem signifikant kürzeren progressionsfreien Leben assoziiert. Tumoren mit einer gemischten subependymalen-ependymalen Morphologie dagegen zeigten ein sehr gutes progressionsfreies Überleben ebenso wie reine Subependymome.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass niedriggradige Subependymome (WHO Grad I) über die Zeit molekulare Veränderungen in Subklonen akkumulieren können, die zu einem stärkeren Wachstum und einer veränderten ependymalen Morphologie und letztlich zu einer Transformation in Ependymome (WHO Grad II) führen können und mit einem deutlich erhöhten Rezidivrisiko assoziiert sind.

DISKUSSION

Der Einsatz neuer molekularer Methoden in der Hirntumordiagnostik hat zu einem Paradigmenwechsel von der auf histologischen Kriterien beruhenden Einteilung hin zu molekular definierten Tumorentitäten geführt. Damit einhergehend haben sich das diagnostische Prozedere (z.B. Reihenfolge der Anforderung von Untersuchungen), der Arbeitsalltag und die diagnostischen Instrumente (Übergang vom Mikroskop zum Computer), die Art der Befundung (Methylierungsreport, NGS Befund), die Diagnosen (integrierte, molekulare Diagnose), die Bestimmung prädiktiver Faktoren (histologiebasiert vs. molekular stratifiziert), die Konzeption von Forschungsprojekten (Analyse morphologisch definierter Kohorten vs. epigenetisch definierter Entitäten), die Ausbildung von Assistenten (Einführung der molekularen Rotation, bioinformatische Grundausbildung) und letztlich damit auch das diagnostische Selbstverständnis vieler Neuropathologen tiefgreifend verändert.

Bisherige Diagnosen beruhten auf der Beschreibung von histomorphologischen und immunhistochemischen Ähnlichkeiten und Kriterien, die anhand der visuellen Beurteilung von größeren Serien gewonnen wurden und bildlich in der WHO Klassifikation als Richtlinien vorgegeben wurden [38, 42]. Die traditionelle Befundung war abhängig von der Erfahrung des Diagnostikers, des verfügbaren Materials und dessen Repräsentativität (z.B. Nekrose auf dem Anschnitt sichtbar), der etablierten immunhistochemischen Färbungen und deren Güte in verschiedenen Instituten und regional unterschiedlichen, historisch gewachsenen und durch diagnostische Persönlichkeiten geprägten Auslegungen der Richtlinien. Dies führte insbesondere bei diagnostisch herausfordernden und leicht zu verwechselnden Differentialdiagnosen nicht selten zu einer hohen Interobserver-Variabilität und Fehldiagnosen [24, 71, 74]. Mit dem Übergang zu integrierten, molekularen Diagnosen hat die histomorphologische Diagnostik zwar an Stellenwert verloren, jedoch entgegen vieler Befürchtungen ihren Platz im Kontext moderner, molekularer Methoden bewahrt. Statt die histopathologische Beurteilung abzuschaffen, können heute Stärken und Vorteile der Morphologie und Immunhistochemie gezielter genutzt werden und Schwächen und Risiken durch molekulare Analysen sinnvoll ergänzt und ausgeglichen werden. Umgekehrt profitiert die Analyse und Interpretation molekularer Daten erheblich von der Kenntnis der zugrundeliegenden Morphologie, des Tumorzellgehalts und der

proliferativen Aktivität. Durch diese Verschränkung der Informationsebenen, die sich letztlich auch in den integrierten molekularen Diagnosen niederschlägt, ist die moderne Tumordiagnostik zwar komplexer und multimodaler geworden, aber auch präziser, reproduzierbarer und sicherer [10]. Die überregionale Verfügbarkeit und Anwendbarkeit der Methoden hat zudem einen Wandel von regionalen Tumor-Referenzzentren hin zu internet-basierten und global erreichbaren, diagnostischen Referenz-Plattformen (www.moleculareuropathology.org/mnp) mit hoher Objektivität eingeleitet und führt zu einer zunehmenden Internationalisierung der molekularen Tumordiagnostik [10, 13]. Mit dem Ausbau der methylierungsbasierten Referenz-Plattformen über die ZNS Tumoren hinaus, wie beispielsweise durch den Sarkom Classifier (<https://www.moleculareuropathology.org/mnp/classifier/9>), setzt sich die Entwicklung über die Grenzen der Neuropathologie hinaus fort [34].

Singuläre, molekulare Parameter, die zu einer verbesserten Präzision der Diagnostik geführt haben, waren für die meisten Institute in Deutschland bisher einfach zu implementieren und umzusetzen. Dies umfasst sowohl die Schaffung technischer Voraussetzungen und des notwendigen Knowhows als auch die Finanzierung der zusätzlichen Analysen. Die in der ersten Arbeit durchgeführte Pyrosequenzierung zur Bestimmung des *BRAF* Mutationsstatus zur Differenzierung zwischen Rathke Zysten und papillären Kraniopharyngeomen beispielsweise erlaubt unter Einsatz geringer Ressourcen eine präzise Unterscheidung beider Krankheitsbilder [64]. Ähnlich verhält es sich mit der *TERT* Promotormutationsanalyse in verschiedenen Entitäten, die mittels PCR und Sanger Sequenzierung bei geringem Aufwand von den meisten Einrichtungen problemlos durchführbar ist [72, 73]. Ebenso gehört der Nachweis der *NAB2-STAT6* Fusion mittels der als Surrogat fungierenden STAT6 Immunhistochemie inzwischen zum kostengünstigen, etablierten Standardrepertoire der meisten pathologischen und neuropathologischen Einrichtungen [35, 65].

Eine nukleären STAT6 Immunreaktivität als Korrelat für eine *NAB2-STAT6* Fusion in fast 100% der SFT/HPZs wurde zum definierenden Kriterium der Entität, durch welches sie eindeutig und klar von anderen, morphologisch ähnlichen Entitäten (z.B. fibrösen Meningeomen) zu unterscheiden war [35, 65, 77]. Zu den wenigen ebenfalls STAT6 nukleär positiven Ausnahmen zählen unter anderem dedifferenzierte Liposarkome, die sich jedoch durch ihr distinktes Mutationsprofil mit hochfrequenten Amplifikationen und dem Fehlen einer *NAB2-STAT6* Fusion molekular klar

unterscheiden lassen [18, 35, 45]. Diese Entwicklung hatte jedoch auch zur Folge, dass bei fehlendem Nachweis einer nukleären STAT6 Expression in erster Linie eine andere Differentialdiagnose als die eines SFT/HPZs favorisiert wurde, unabhängig von den histomorphologischen Kriterien.

Die hohe, entitätsdefinierende Frequenz spezifischer, genetischer Alterationen macht somit den Nachweis der Veränderung heute häufig zur Voraussetzung für die Diagnose. Neben diesen entitätsdefinierenden, rekurrenten Punktmutationen und Fusionen wurden im Rahmen der epigenetischen Aufarbeitung vieler Entitäten jedoch auch erstmals neue Tumorsubtypen identifiziert, die keine singulären Treiber-Alterationen aufwiesen, sondern sich stattdessen nur anhand ihres distinkten epigenetischen Profils identifizieren lassen. Ein Beispiel hierfür ist die kürzlich beschriebene Entität der niedriggradigen, glioneuronalen Tumoren mit oligodendrogliomartiger Erscheinung und nukleären Clustern (DGONC), die zwar in 97% der Fälle eine Monosomie von Chromosom 14 aufweisen, sich zum aktuellen Zeitpunkt aber nur über ihr distinktes Methylierungsprofil von anderen Entitäten sicher unterscheiden lässt [20, 58]. Problematisch erscheint hier vor allem die Tatsache, dass für einen Teil dieser neu entstehenden Entitäten keine Surrogatparameter (wie beispielsweise die STAT6 Immunhistochemie) zur Verfügung stehen, die in solchen Instituten Anwendung finden könnten, die keine Methylierungsanalysen durchführen können. Es wird insbesondere in zukünftigen WHO Klassifikationen mit dem Anspruch einer global anwendbaren Einteilung von ZNS Tumoren eine Herausforderung werden, den Spagat zwischen universitärer Zentrums-Neuropathologie und flächendeckender Basisdiagnostik, besonders auch in strukturschwächeren Ländern, abzubilden und pragmatisch zu meistern, u.a. auch um einer „Zweiklassen-Diagnostik“ vorzubeugen.

Trotz der über diverse Entitäten und Materialien (FFPE, Kryo- und Autopsiegewebe) robusten Methylierungsanalyse gibt es jedoch auch Limitationen der Methylierungsmethode. Zum einen bei geringem, zur Verfügung stehendem Gewebe, niedriger DNA Qualität und Gesamtmenge (< 100 ng), zum anderen bei niedrigem Tumorzellgehalt (< 30%) wie dies zum Beispiel häufig in der Infiltrationszone von diffusen, hirneigenen Tumoren der Fall sein kann. In beiden Fällen kann eine eindeutige Zuordnung des Tumors deutlich erschwert sein und auch vollständig misslingen. Die Anwendung neuer bioinformatischer Lösungen, wie zum Beispiel Verfahren der Dekonvolution, könnten hier perspektivisch Defizite überwinden [61].

Der Tumorzellgehalt war auch für die seit vielen Jahren genutzte Sanger Sequenzierung ein limitierender Faktor. Für den Nachweis einer Mutation musste die Allelfrequenz mindestens 20% (bei heterozygoten Varianten einem Tumorzellgehalt von 40% entsprechend) betragen. Im Falle der von uns analysierten Rathke Zyste lag beispielsweise der erwartete „Tumorzellgehalt“ (in diesem Falle „Tumor“ im Sinne von Raumforderung, also Prozentsatz an nicht normal entwickeltem Gewebe) in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle unterhalb der Detektionsgrenze der Sanger Sequenzierung [64]. Mit Hilfe der Pyrosequenzierung ist der Mutationsnachweis auch bei einem Tumorzellgehalt von 10-15% möglich. Die Immunhistochemie mit mutationsspezifischen Färbung dagegen, ermöglicht sogar den Nachweis der Expression in einzelnen Zellen, wie dies beispielsweise in der Infiltrationszone diffuser IDH mutierter Gliome und bei BRAF V600E mutierten Gangliogliomen gezeigt werden konnte [12, 14, 36]. Die Hochdurchsatzsequenzierung mit NGS Panels bei hoher Sequenziertiefe (coverage > 500) ermöglichen dagegen einen ähnlich sicheren Nachweis von Mutationen selbst bei einem sehr geringen Tumorzellgehalt einer Probe von <5% [62]. Jedoch lassen sich anders als bei der mutationsspezifischen Immunhistochemie vorhandene Mutationen in heterogenem Gewebe keinem spezifischen Zelltyp zuordnen wie dies beispielsweise im Falle der Gangliogliome mit dem Nachweis des mutierten BRAF Proteins in vornehmlich neuronalen Zellen gelang [36]. Dennoch erscheint die NGS Analyse aufgrund ihrer niedrigen Detektionsgrenzen unter anderem für solche Tumoren sinnvoll, die bisher aufgrund der Materialbeschaffenheit des Gewebes nicht für eine molekulare Analyse in Frage kamen [62]. Fallende Kosten und flächendeckende Verfügbarkeit sowie wachsendes Knowhow im Bereich der Datenanalyse werden perspektivisch auch den Einsatz in Proben mit extrem geringem Tumorzellgehalt, wie beispielsweise zellfreier DNA aus dem Liquor und Blut, ermöglichen [54, 57].

Mittels der derzeit üblichen und sich in routinemäßiger Anwendung befindenden NGS Anwendungen (bzw. Panel oder DNA Exom-Sequenzierung) werden jedoch üblicherweise nur kodierende, exonische Regionen abgedeckt [62]. Insbesondere bei Fusionen befinden sich die Bruchpunkte der jeweiligen Fusionspartner jedoch häufig intronisch, so dass dies entweder im Rahmen des Paneldesigns berücksichtigt werden muss oder stattdessen eine RNA Sequenzierung (RNA Fusionspanel, RNA Exom-Sequenzierung) angestrebt werden sollte [70]. In zwei Fällen unserer SFT/HPZ Serie konnte beispielsweise mittels DNA Exom-Sequenzierung keine *NAB2-STAT6* Fusion

nachgewiesen werden, in einem Fall lagen die Bruchpunkte intronisch und wurden durch die Sequenzierung der kodierenden DNA Abschnitte nicht mit abgedeckt [65]. Aber auch die STAT6 Immunhistochemie kann in Einzelfällen nicht eindeutig sein, so konnten wir bei zwei Fällen unserer Serie keine nukleäre STAT6 Expression nachweisen. Ein Grund für eine ausbleibende nukleäre STAT6 Immunreaktion in einzelnen Fällen könnte unter anderem in den sehr variablen Bruchpunkten und Fusionsvarianten liegen, so dass möglicherweise das Erhaltenbleiben des nukleären Lokalisationssignals im Fusionsgen (N, siehe Figure 1a, [65]) für eine Translokation in den Kern notwendig ist. Bei nicht eindeutiger STAT6 Immunhistochemie oder fehlendem Nachweis einer *NAB2-STAT6* Fusion auf DNA Ebene wäre ergänzend eine RNA Sequenzierung empfehlenswert, mit der Genfusionen besser nachgewiesen werden können [70].

Die diagnostische Praxis hat gezeigt, dass aufgrund der Vielzahl möglicher genetischer Treiberalterationen in relevanten Differentialdiagnosen (z.B. intronisch / exonisch; Punktmutation / chromosomale Translokation / Amplifikation / Fusion) in einigen Fällen eine Kombination aus mehreren, molekularen Methoden und immunhistochemischen Verfahren eingesetzt werden muss, um zu einer eindeutigen Lösung zu kommen. Da über den Verlauf einer Tumorerkrankung hinweg anhand der sehr stabilen epigenetischen Signaturen zum einen Hinweise auf die vermutliche Ursprungszelle gewonnen werden können, was insbesondere bei primitiven und wenige linienspezifische Marker exprimierenden Tumoren sehr hilfreich sein kann, aber auch zusätzliche Informationsebenen, wie beispielsweise Kopienzahlprofile, Hinweise auf chromosomale Veränderungen, fokale Amplifikationen und mögliche genomische Bruchpunkte zur Verfügung stellen, eignet sich die Methylierungsanalyse perspektivisch als initiale molekulare Screening Methode für die Diagnostik von ZNS Tumoren [13].

In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Bestimmung molekularer Marker nicht nur zu einer Verbesserung der diagnostischen Präzision führt [10], sondern auch zur Identifizierung von klinisch relevanten Subgruppen innerhalb von histologisch oder molekular definierten Tumorentitäten [10, 29, 30, 53, 71]. Im Falle der Paragangliome des ZNS konnten wir mittels Methylierungsanalyse zeigen, dass sich Paragangliome der Hals-Kopf-Region (sog. Glomustumoren) epigenetisch eindeutig Paragangliomen der Bauch- und Thoraxregion zuordnen lassen, wobei

insbesondere die häufig mit Mutationen in den SDH Genen einhergehende Hypermethylierung dieser Tumoren zu einer Eingruppierung in das für diese Alterationen angereicherte TCGA-M1 Cluster führte [26, 37]. Tumoren dieser Gruppe treten gehäuft im Rahmen von Paragangliom-Prädispositionssyndromen auf und haben ein deutlich erhöhtes Metastasierungsrisiko.

Trotz der morphologischen Ähnlichkeit der Cauda equina Paragangliome (CEP) zu den vorgenannten Paragangliomen anderer Lokalisation konnten wir anhand der epigenetischen Analysen zeigen, dass CEPs eine molekular definierte, distinkte Tumorentität darstellen, die im Gegensatz zu anderen Paragangliomen ausschließlich sporadisch auftreten, mit einem sehr geringen Metastasierungsrisiko assoziiert sind und keine Mutationen aufweisen, die in Paragangliomen bisher beschrieben wurden [66]. Die von uns beschriebene Zytokeratin-Expression in allen Fällen kann zwar in Kombination mit einer GATA3 Negativität als Surrogatparameter in vielen Fällen genutzt werden, jedoch sind aus der Literatur mehrere periphere Paragangliome und neuroendokrine Tumoren beschrieben worden, die Zytokeratine exprimieren und keine GATA3 Expression zeigen, so dass letztlich insbesondere bei Tumoren in atypischer Lokalisation (z.B. im Kleinhirnbrückenwinkel) die Methylierungsanalyse zur eindeutigen Zurordnung die sicherste Methode ist [56, 66, 68].

Interessanterweise zeigte sich die epigenetische Signatur so distinkt von derjenigen der übrigen Paragangliome, dass aufgrund der Verschiedenheit eine andere Ursprungszelle wahrscheinlich ist. Hierbei muss es sich nicht zwangsläufig um eine Zelle eines anderen Keimblattes handeln, möglicherweise könnte es sich um eine Neuralleistenzelle in einem unterschiedlichen Entwicklungs- und Differenzierungsstadium handeln [66]. Hierzu würde auch die in CEPs, nicht jedoch in anderen Paragangliomen auftretende Expression des für die Entwicklung des kaudalen Rückenmarks relevanten Transkriptionsfaktors HOXB13 passen [5].

Ähnlich wie wir für die SFT/HPZs zeigen konnten, dass es sich um eine durch die *NAB2-STAT6* Fusion molekular definierte Entität handelt, die ein morphologisches Spektrum von Tumoren umfasst, das von gutartigen zellarmen, solitär fibrösen Tumoren bis hin zu zeldichten malignen, anaplastischen Hämangioperizytomen reicht, ließ sich anhand der untersuchten Serie an ependymalen Mischtumoren nachweisen, dass es sich bei der über das epigenetische Profil definierten Entität „Subependymom, posterior fossa (PFSE)“ um ein morphologisches Kontinuum handelt, dass von reinen

Subependymomen, über subependymal-ependymale Mischtumoren bis hin zu reinen Ependymomen reicht [73]. Während die Erkennung einer subependymalen Komponente im Tumor durch gründliches Mikroskopieren auch bei geringen Anteilen dieser Differenzierung von nur 2% möglich ist, lassen sich reine Ependymome mit molekularem PFSE Profil durch konventionelle Methoden nicht erkennen. Die Morphologie und das immunhistochemische Profil überlappen mit anderen Methylierungsklassen der hinteren Schädelgrube (Gruppe A – PFA, Gruppe B – PFB). PFA Tumoren betreffen zumeist pädiatrische Patienten, PFB Tumoren dagegen treten vornehmlich, wie auch die PFSE Tumoren, in adulten Patienten auf [15, 52, 53]. Jedoch genügt die Hinzunahme klinischer und radiologischer Informationen nicht für eine klare Unterscheidung dieser molekularen Subklassen. Dass dies jedoch klinisch relevant ist, konnten wir anhand der Analyse des progressionsfreien Überlebens zeigen: im Vergleich zu den PFB Tumoren verhielten sich PFSE Tumoren mit *TERT* Promotormutation deutlich schlechter, wohingegen PFSE Tumoren ohne *TERT* Promotormutation ein deutlich besseres Überleben zeigten als PFB Tumoren ([73], Supplementary Figure S3).

Die Arbeit belegt, dass sich durch die molekulare Charakterisierung homogene Tumorguppen mit zwar unterschiedlicher Morphologie jedoch gleicher zugrundeliegender Molekularbiologie identifizieren lassen, innerhalb derer prognostische Biomarker, wie in diesem Falle die *TERT* Promotormutation, zu einer besseren Stratifizierung von Patienten führen können, was wiederum Ausgangspunkt sein kann für neue, prospektive Studien, die in homogeneren und reproduzierbareren Kohorten von Patienten Therapieeffekte evaluieren. Für die PFSE Tumoren ließe sich beispielweise gezielt in der *TERT* mutierten Subgruppe der Effekt einer Radiotherapie auf das progressionsfreie Überleben untersuchen.

Für bisherige Patienten-Stratifizierungen auf Grundlage der Diagnose wurden zumeist histologische und immunhistochemische Kriterien herangezogen, hier vor allem die proliferative Aktivität gemessen in Mitosen, Nekrosen und Proliferationsindex, die sich in der Gradierung von Tumoren niederschlugen. Für die Gradierung der SFT/HPZ Tumoren werden beispielsweise gemäß der aktuellen WHO Klassifikationen der ZNS Tumoren und der Weichgewebstumoren in erster Linie noch histologische Kriterien herangezogen werden [42, 77]. Für die nicht meningealen SFTs zeichnet es sich jedoch bereits ab, dass insbesondere dem Vorhandensein einer *TERT*

Promotormutation ebenfalls prognostische Bedeutung zukommt. In zwei Arbeiten konnte gezeigt werden, dass *TERT* Promotormutationen außerhalb des ZNS oft mit höhergradigen Tumoren assoziiert sind und sich anhand dieses Parameter innerhalb der Patienten mit histologisch intermediärem Risiko eine Hochrisikogruppe identifizieren lässt [19, 46]. Über die prognostische Bedeutung in SFT/HPZs des ZNS herrscht aktuell noch Uneinigkeit [4, 75]. Für Meningeome ist die prognostisch schlechte Bedeutung der *TERT* Promotormutation inzwischen so valide nachgewiesen [48, 63], dass ihr Vorhandensein ab der neuen WHO Klassifikation von 2021 bereits als definierendes, molekulares Kriterium für einen WHO ZNS Grad 3 gelten wird, vollkommen unabhängig von der zugrundeliegenden, teils völlig gutartigen Morphologie (mündliche Kommunikation PD Dr. med. Felix Sahn, Heidelberg).

Eine besondere Rolle kommt prognostischen molekularen Biomarkern zu, die zugleich auch therapeutische Zielstrukturen identifizieren und eine prädiktive Bedeutung hinsichtlich eines personalisierten Therapieansatzes haben. Eine plattenepitheliale Metaplasie bei Rathke Zysten wurde bisher in mehreren Studien als Risikofaktor für eine Rezidivierung identifiziert [1, 33, 78]. Ogawa et al. [50, 51] konnten zeigen, dass operierte Rathke Zysten mit plattenepithelialer Metaplasie ihres Zystenepithels ein erhebliches Risiko (bis zu 50%) für eine erneute Vergrößerung oder Rezidivierung aufwiesen, die einen erneuten Eingriff erforderlich macht. Interessanterweise zeigten 5/6 der rezidierten Rathke Zysten eine nukleäre β -Catenin Akkumulation, welche üblicherweise bei Vorliegen einer *CTNNB1* Mutation beobachtet wird und in 94-100% der adamantinösen Kraniopharyngeomen nachzuweisen ist [9, 28, 67]. Auch im Kontext unserer eigenen Ergebnisse erscheint es gut denkbar, dass es sich bei der überwiegenden Mehrzahl der rezidierten Rathke Zysten mit plattenepithelialer Metaplasie um unterdiagnostizierte Kraniopharyngeome vom adamantinösen oder papillären Subtyp handelt. Möglicherweise korreliert die Bestimmung des *BRAF* und *CTNNB1* Mutationsstatus besser mit dem Rezidivrisiko als der morphologische Nachweis einer Metaplasie und würde sich als Stratifizierungsparameter für eine intensiviertere Patientennachsorge entsprechend besser eignen. Darüber hinaus ermöglicht der Nachweis einer *BRAF* V600E Mutation den Einsatz eines Proteinkinaseinhibitors (z.B. Vemurafenib) im Rahmen eines personalisierten Behandlungskonzeptes, welcher bereits bei mehreren *BRAF* V600E mutierten papillären Kraniopharyngomen ein erhebliches Therapieansprechen zeigte [3, 21, 32, 59].

Der Paradigmenwechsel in der neuropathologischen Hirntumordiagnostik schlägt sich nicht nur in einer veränderten Konzeption von Forschungsprojekten nieder, wie dies hier exemplarisch anhand von Projekten gezeigt wurde, die initial noch von histologisch definierten Entitäten ausgingen und später die Identifizierung von prognostisch relevanten Subgruppen innerhalb molekular definierter Entitäten im Blick hatten. Essentiell für die Weiterentwicklung des Faches in Forschung und Diagnostik wird die Ausbildung von Nachwuchswissenschaftlern und Assistenzärzten sein, die sowohl traditionelle Inhalte der Neuropathologie wie Histologie und Immunhistochemie bedienen können, als auch neue Methoden wie die Methylierungsanalyse und das Next-Generation Sequencing in ihre Arbeit implementieren können. Hierzu ist es erforderlich, dass nicht nur molekulare Daten generiert werden, sondern auch deren Auswertung und Interpretation beherrscht wird. Dies erfordert eine adaptierte Ausbildung und Integration neuer Lehrkonzepte. Molekulare Rotationen in universitären Zentrums-Neuropathologien in Deutschland zum Beispiel, in denen der diagnostische Umgang mit zunehmend komplexeren, molekularen Ergebnissen routinemäßig geübt wird, verankern den molekularpathologischen Blick auf die Hirntumordiagnostik und das damit einhergehende molekulare Grundverständnis für die Tumorbiologie. Zudem ist auch die wissenschaftliche Weiterentwicklung der Hirntumordiagnostik unverzichtbar auf die Anwendung computer-assistierter Verfahren und Erarbeitung neuer Algorithmen angewiesen und damit auf diagnostischen und wissenschaftlichen Nachwuchs, der diese Entwicklung interdisziplinär und inhaltlich gestalten kann.

Eine interdisziplinäre Zusammenarbeit mit Kollegen der medizinischen Informatik, Bioinformatik, Biotechnologie und Molekularbiologie im Rahmen der Diagnostik und Patientenversorgung wird in Zukunft unverzichtbar sein und eine fachspezifische Rollendefinition erforderlich machen. Die Auswertung molekularer Daten und Integration der Ergebnisse in Diagnosen wird Bestandteil des zukünftigen Berufsbildes von Neuropathologen sein; diese Aufgaben können nicht einfach an nicht-ärztliche Kollegen delegiert und abgetreten werden. Hierfür wiederum ist jedoch ärztliche Expertise im Bereich der Analyse-Pipelines und Datenbanken, der Anwendung von Algorithmen und Tools, des maschinellen Lernens und der künstlichen Intelligenz erforderlich. Mit zunehmender Verfügbarkeit, Akzeptanz und flächendeckender Implementierung neuer Methoden entstehen somit neue Herausforderungen bezüglich der neuropathologischen Weiterbildung im Allgemeinen und der bioinformatischen

Alphabetisierung des Berufstandes. Mit Einführung der integrierten, molekularen Diagnosen in die nun kommende WHO Klassifikation von 2021 wird sich der molekulare Trend in der Neuropathologie weiter fortsetzen. Erprobte Implementierungs- und Ausbildungskonzepte können als Modelle dienen für eine flächendeckende, gelingende Umsetzung des Paradigmenwechsels in die diagnostische Routinepraxis.

ZUSAMMENFASSUNG

Die methylierungsbasierte Klassifikation von Hirntumoren hat zu einer tiefgreifenden Veränderung unserer Betrachtungsweise neuropathologischer Tumoren geführt, die sich auch in der kommenden, neuen WHO Klassifikation in Form integrierter, molekularer Diagnosen niederschlägt. Der Paradigmenwechsel durch neue molekulare Methoden hat sich jedoch auch essentiell auf den Arbeitsalltag und die Routineabläufe in neuropathologischen Instituten ausgewirkt, ebenso wie auf die Art der Befundung, das Selbstverständnis als Diagnostiker und die Ausbildung junger Neuropathologen.

Die Arbeit zeigt anhand ausgewählter, konkreter Beispiele wie sich wissenschaftliche Fragestellungen und Herangehensweisen, aber auch Verständnis und Implementierung von Ergebnissen vor, während und nach der epigenetischen Revolution im Bereich der Hirntumordiagnostik verändert haben. Während vor Einführung der Methylierungsanalysen histologisch definierte Hirntumorentitäten Ausgangspunkt für explorative, genetische Untersuchungen waren, wie dies in der ersten Arbeit anhand der papillären Kraniopharyngeome und in der zweiten Arbeit anhand der solitär fibrösen Tumoren und Hämangioperizytomen gezeigt wird, repräsentiert die dritte Arbeit einen diagnostischen Meilenstein in der Hirntumordiagnostik und weist auf das transformierende Potential einer morphologie-unabhängigen, auf epigenetischen Signaturen beruhenden und durch bioinformatische Analysen erst nutzbaren Klassifikation von ZNS Tumoren für die Routinediagnostik und Forschung hin.

Die vierte Arbeit zeigt am Beispiel der ZNS Paragangliome, wie sich durch die Anwendung der epigenetischen Analysen neue, molekular definierte Entitäten abgrenzen lassen. In der fünften Arbeit wird am Beispiel ependymaler Tumoren mit dem epigenetischen Profil der Methylierungsklasse „Subependymom, posterior fossa“ gezeigt, dass sich innerhalb einer nun epigenetisch definierter Tumorentität molekulare Risikogruppen identifizieren lassen, die charakteristische, genetische Veränderungen aufweisen, deren routinemäßige Bestimmung möglicherweise zu einer verbesserten Patienten-Stratifizierung in zukünftigen Studien beitragen könnte.

LITERATURANGABEN

- 1 Aho CJ, Liu C, Zelman V, Couldwell WT, Weiss MH (2005) Surgical outcomes in 118 patients with Rathke cleft cysts. *J Neurosurg* 102: 189-193 Doi 10.3171/jns.2005.102.2.0189
- 2 Arie Perry DJB (2018) *Practical Surgical Neuropathology: A Diagnostic Approach (Second Edition), Ependymomas and Choroid Plexus Tumors*. Elsevier: Pages 145-169. Doi 10.1016/B978-0-323-44941-0.00008-4
- 3 Aylwin SJ, Bodi I, Beaney R (2016) Pronounced response of papillary craniopharyngioma to treatment with vemurafenib, a BRAF inhibitor. *Pituitary* 19: 544-546 Doi 10.1007/s11102-015-0663-4
- 4 Bertero L, Anfossi V, Osella-Abate S, Disanto MG, Mantovani C, Zenga F, Ruda R, Garbossa D, Soffiatti R, Ricardi U et al (2018) Pathological prognostic markers in central nervous system solitary fibrous tumour/hemangiopericytoma: Evidence from a small series. *PLoS One* 13: e0203570 Doi 10.1371/journal.pone.0203570
- 5 Bockmayr M, Korner M, Schweizer L, Schuller U (2021) Cauda equina paragangliomas express HOXB13. *Neuropathol Appl Neurobiol*: Doi 10.1111/nan.12713
- 6 Brastianos PK, Taylor-Weiner A, Manley PE, Jones RT, Dias-Santagata D, Thorner AR, Lawrence MS, Rodriguez FJ, Bernardo LA, Schubert L et al (2014) Exome sequencing identifies BRAF mutations in papillary craniopharyngiomas. *Nat Genet* 46: 161-165 Doi 10.1038/ng.2868
- 7 Brat DJ, Aldape K, Colman H, Figarella-Branger D, Fuller GN, Giannini C, Holland EC, Jenkins RB, Kleinschmidt-DeMasters B, Komori T et al (2020) cIMPACT-NOW update 5: recommended grading criteria and terminologies for IDH-mutant astrocytomas. *Acta Neuropathol* 139: 603-608 Doi 10.1007/s00401-020-02127-9
- 8 Brat DJ, Aldape K, Colman H, Holland EC, Louis DN, Jenkins RB, Kleinschmidt-DeMasters BK, Perry A, Reifenberger G, Stupp R et al (2018) cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for "Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV". *Acta Neuropathol* 136: 805-810 Doi 10.1007/s00401-018-1913-0
- 9 Buslei R, Nolde M, Hofmann B, Meissner S, Eyupoglu IY, Siebzehnrubl F, Hahnen E, Kreutzer J, Fahlbusch R (2005) Common mutations of beta-catenin in adamantinomatous craniopharyngiomas but not in other tumours originating from the sellar region. *Acta Neuropathol* 109: 589-597 Doi 10.1007/s00401-005-1004-x

- 10 Capper D, Jones DTW, Sill M, Hovestadt V, Schrimpf D, Sturm D, Koelsche C, Sahm F, Chavez L, Reuss DE et al (2018) DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature* 555: 469-474 Doi 10.1038/nature26000
- 11 Capper D, Preusser M, Habel A, Sahm F, Ackermann U, Schindler G, Pusch S, Mechttersheimer G, Zentgraf H, von Deimling A (2011) Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody. *Acta Neuropathol* 122: 11-19 Doi 10.1007/s00401-011-0841-z
- 12 Capper D, Sahm F, Hartmann C, Meyermann R, von Deimling A, Schittenhelm J (2010) Application of mutant IDH1 antibody to differentiate diffuse glioma from nonneoplastic central nervous system lesions and therapy-induced changes. *Am J Surg Pathol* 34: 1199-1204 Doi 10.1097/PAS.0b013e3181e7740d
- 13 Capper D, Stichel D, Sahm F, Jones DTW, Schrimpf D, Sill M, Schmid S, Hovestadt V, Reuss DE, Koelsche C et al (2018) Practical implementation of DNA methylation and copy-number-based CNS tumor diagnostics: the Heidelberg experience. *Acta Neuropathol* 136: 181-210 Doi 10.1007/s00401-018-1879-y
- 14 Capper D, Zentgraf H, Balss J, Hartmann C, von Deimling A (2009) Monoclonal antibody specific for IDH1 R132H mutation. *Acta Neuropathol* 118: 599-601 Doi 10.1007/s00401-009-0595-z
- 15 Cavalli FMG, Hubner JM, Sharma T, Luu B, Sill M, Zapotocky M, Mack SC, Witt H, Lin T, Shih DJH et al (2018) Heterogeneity within the PF-EPN-B ependymoma subgroup. *Acta Neuropathol* 136: 227-237 Doi 10.1007/s00401-018-1888-x
- 16 Chetty R, Pillay P, Jaichand V (1998) Cytokeratin expression in adrenal pheochromocytomas and extra-adrenal paragangliomas. *J Clin Pathol* 51: 477-478 Doi 10.1136/jcp.51.6.477
- 17 Chmielecki J, Crago AM, Rosenberg M, O'Connor R, Walker SR, Ambrogio L, Auclair D, McKenna A, Heinrich MC, Frank DA et al (2013) Whole-exome sequencing identifies a recurrent NAB2-STAT6 fusion in solitary fibrous tumors. *Nat Genet* 45: 131-132 Doi 10.1038/ng.2522
- 18 Demicco EG, Harms PW, Patel RM, Smith SC, Ingram D, Torres K, Carskadon SL, Camelo-Piragua S, McHugh JB, Siddiqui J et al (2015) Extensive survey of STAT6 expression in a large series of mesenchymal tumors. *Am J Clin Pathol* 143: 672-682 Doi 10.1309/AJCPN25NJTOUNPNF
- 19 Demicco EG, Wani K, Ingram D, Wagner M, Maki RG, Rizzo A, Meeker A, Lazar AJ, Wang WL (2018) TERT promoter mutations in solitary fibrous tumour. *Histopathology* 73: 843-851 Doi 10.1111/his.13703
- 20 Deng MY, Sill M, Sturm D, Stichel D, Witt H, Ecker J, Wittmann A, Schittenhelm J, Ebinger M, Schuhmann M et al (2020) Diffuse glioneuronal tumour with

- oligodendroglioma-like features and nuclear clusters (DGONC) - a molecularly defined glioneuronal CNS tumour class displaying recurrent monosomy 14. *Neuropathol Appl Neurobiol* 46: 422-430 Doi 10.1111/nan.12590
- 21 Di Stefano AL, Guyon D, Sejean K, Feuvret L, Villa C, Berzero G, Desforges Bullet V, Halimi E, Boulin A, Baussart Bet al (2020) Medical debulking with BRAF/MEK inhibitors in aggressive BRAF-mutant craniopharyngioma. *Neurooncol Adv* 2: vdaa141 Doi 10.1093/noajnl/vdaa141
- 22 Ellison DW, Aldape KD, Capper D, Fouladi M, Gilbert MR, Gilbertson RJ, Hawkins C, Merchant TE, Pajtler K, Venneti Set al (2020) cIMPACT-NOW update 7: advancing the molecular classification of ependymal tumors. *Brain Pathol* 30: 863-866 Doi 10.1111/bpa.12866
- 23 Ellison DW, Hawkins C, Jones DTW, Onar-Thomas A, Pfister SM, Reifenberger G, Louis DN (2019) cIMPACT-NOW update 4: diffuse gliomas characterized by MYB, MYBL1, or FGFR1 alterations or BRAF(V600E) mutation. *Acta Neuropathol* 137: 683-687 Doi 10.1007/s00401-019-01987-0
- 24 Ellison DW, Kocak M, Figarella-Branger D, Felice G, Catherine G, Pietsch T, Frappaz D, Massimino M, Grill J, Boyett JMet al (2011) Histopathological grading of pediatric ependymoma: reproducibility and clinical relevance in European trial cohorts. *J Negat Results Biomed* 10: 7 Doi 10.1186/1477-5751-10-7
- 25 Fernandez AF, Assenov Y, Martin-Subero JI, Balint B, Siebert R, Taniguchi H, Yamamoto H, Hidalgo M, Tan AC, Galm Oet al (2012) A DNA methylation fingerprint of 1628 human samples. *Genome Res* 22: 407-419 Doi 10.1101/gr.119867.110
- 26 Fishbein L, Leshchiner I, Walter V, Danilova L, Robertson AG, Johnson AR, Lichtenberg TM, Murray BA, Ghayee HK, Else Tet al (2017) Comprehensive Molecular Characterization of Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Cancer Cell* 31: 181-193 Doi 10.1016/j.ccell.2017.01.001
- 27 Gonzalez Castro LN, Wesseling P (2021) The cIMPACT-NOW updates and their significance to current neuro-oncology practice. *Neurooncol Pract* 8: 4-10 Doi 10.1093/nop/npaa055
- 28 Holsken A, Sill M, Merkle J, Schweizer L, Buchfelder M, Flitsch J, Fahlbusch R, Metzler M, Kool M, Pfister SMet al (2016) Adamantinomatous and papillary craniopharyngiomas are characterized by distinct epigenomic as well as mutational and transcriptomic profiles. *Acta Neuropathol Commun* 4: 20 Doi 10.1186/s40478-016-0287-6
- 29 Hovestadt V, Jones DT, Picelli S, Wang W, Kool M, Northcott PA, Sultan M, Stachurski K, Ryzhova M, Warnatz HJet al (2014) Decoding the regulatory landscape of

- medulloblastoma using DNA methylation sequencing. *Nature* 510: 537-541 Doi 10.1038/nature13268
- 30 Hovestadt V, Remke M, Kool M, Pietsch T, Northcott PA, Fischer R, Cavalli FM, Ramaswamy V, Zapatka M, Reifenberger G et al (2013) Robust molecular subgrouping and copy-number profiling of medulloblastoma from small amounts of archival tumour material using high-density DNA methylation arrays. *Acta Neuropathol* 125: 913-916 Doi 10.1007/s00401-013-1126-5
- 31 Jones DT, Jager N, Kool M, Zichner T, Hutter B, Sultan M, Cho YJ, Pugh TJ, Hovestadt V, Stutz AM et al (2012) Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma. *Nature* 488: 100-105 Doi 10.1038/nature11284
- 32 Khaddour K, Chicoine MR, Huang J, Dahiya S, Anstas G (2020) Successful Use of BRAF/MEK Inhibitors as a Neoadjuvant Approach in the Definitive Treatment of Papillary Craniopharyngioma. *J Natl Compr Canc Netw* 18: 1590-1595 Doi 10.6004/jnccn.2020.7624
- 33 Kim JE, Kim JH, Kim OL, Paek SH, Kim DG, Chi JG, Jung HW (2004) Surgical treatment of symptomatic Rathke cleft cysts: clinical features and results with special attention to recurrence. *J Neurosurg* 100: 33-40 Doi 10.3171/jns.2004.100.1.0033
- 34 Koelsche C, Schrimpf D, Stichel D, Sill M, Sahm F, Reuss DE, Blattner M, Worst B, Heilig CE, Beck K et al (2021) Sarcoma classification by DNA methylation profiling. *Nat Commun* 12: 498 Doi 10.1038/s41467-020-20603-4
- 35 Koelsche C, Schweizer L, Renner M, Warth A, Jones DT, Sahm F, Reuss DE, Capper D, Knosel T, Schulz B et al (2014) Nuclear relocation of STAT6 reliably predicts NAB2-STAT6 fusion for the diagnosis of solitary fibrous tumour. *Histopathology* 65: 613-622 Doi 10.1111/his.12431
- 36 Koelsche C, Wohrer A, Jeibmann A, Schittenhelm J, Schindler G, Preusser M, Lasitschka F, von Deimling A, Capper D (2013) Mutant BRAF V600E protein in ganglioglioma is predominantly expressed by neuronal tumor cells. *Acta Neuropathol* 125: 891-900 Doi 10.1007/s00401-013-1100-2
- 37 Letouze E, Martinelli C, Lorient C, Burnichon N, Abermil N, Ottolenghi C, Janin M, Menara M, Nguyen AT, Benit P et al (2013) SDH mutations establish a hypermethylator phenotype in paraganglioma. *Cancer Cell* 23: 739-752 Doi 10.1016/j.ccr.2013.04.018
- 38 Louis DN, Wiestler O, Cavenee W (2007) World Health Organization classification of tumours of the central nervous system IARC: Lyon, France. .
- 39 Louis DN, Aldape K, Brat DJ, Capper D, Ellison DW, Hawkins C, Paulus W, Perry A, Reifenberger G, Figarella-Branger D et al (2017) Announcing cIMPACT-NOW: the Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy. *Acta Neuropathol* 133: 1-3 Doi 10.1007/s00401-016-1646-x

- 40 Louis DN, Ellison DW, Brat DJ, Aldape K, Capper D, Hawkins C, Paulus W, Perry A, Reifenberger G, Figarella-Branger D et al (2019) cIMPACT-NOW: a practical summary of diagnostic points from Round 1 updates. *Brain Pathol* 29: 469-472 Doi 10.1111/bpa.12732
- 41 Louis DN, Giannini C, Capper D, Paulus W, Figarella-Branger D, Lopes MB, Batchelor TT, Cairncross JG, van den Bent M, Wick W et al (2018) cIMPACT-NOW update 2: diagnostic clarifications for diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant and diffuse astrocytoma/anaplastic astrocytoma, IDH-mutant. *Acta Neuropathol* 135: 639-642 Doi 10.1007/s00401-018-1826-y
- 42 Louis DN, Oh W, Wiestler OD, Capper D. World Health Organization Histological Classification of Tumours of the Central Nervous System. International Agency for Research on Cancer, France. International Agency for Research on Cancer, France; 2016.:
- 43 Louis DN, Wesseling P, Aldape K, Brat DJ, Capper D, Cree IA, Eberhart C, Figarella-Branger D, Fouladi M, Fuller GN et al (2020) cIMPACT-NOW update 6: new entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading. *Brain Pathol* 30: 844-856 Doi 10.1111/bpa.12832
- 44 Louis DN, Wesseling P, Paulus W, Giannini C, Batchelor TT, Cairncross JG, Capper D, Figarella-Branger D, Lopes MB, Wick W et al (2018) cIMPACT-NOW update 1: Not Otherwise Specified (NOS) and Not Elsewhere Classified (NEC). *Acta Neuropathol* 135: 481-484 Doi 10.1007/s00401-018-1808-0
- 45 Lu J, Wood D, Ingley E, Koks S, Wong D (2021) Update on genomic and molecular landscapes of well-differentiated liposarcoma and dedifferentiated liposarcoma. *Mol Biol Rep*: Doi 10.1007/s11033-021-06362-5
- 46 Machado I, Morales GN, Cruz J, Lavernia J, Giner F, Navarro S, Ferrandez A, Llombart-Bosch A (2020) Solitary fibrous tumor: a case series identifying pathological adverse factors-implications for risk stratification and classification. *Virchows Arch* 476: 597-607 Doi 10.1007/s00428-019-02660-3
- 47 Mamilla D, Manukyan I, Fetsch PA, Pacak K, Miettinen M (2020) Immunohistochemical distinction of paragangliomas from epithelial neuroendocrine tumors-gangliocytic duodenal and cauda equina paragangliomas align with epithelial neuroendocrine tumors. *Hum Pathol* 103: 72-82 Doi 10.1016/j.humpath.2020.07.010
- 48 Mirian C, Duun-Henriksen AK, Juratli T, Sahm F, Spiegl-Kreinecker S, Peyre M, Biczok A, Tonn JC, Goutagny S, Bertero L et al (2020) Poor prognosis associated with TERT gene alterations in meningioma is independent of the WHO classification: an individual patient data meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 91: 378-387 Doi 10.1136/jnnp-2019-322257

- 49 Moran S, Martinez-Cardus A, Sayols S, Musulen E, Balana C, Estival-Gonzalez A, Moutinho C, Heyn H, Diaz-Lagares A, de Moura MC et al (2016) Epigenetic profiling to classify cancer of unknown primary: a multicentre, retrospective analysis. *Lancet Oncol* 17: 1386-1395 Doi 10.1016/S1470-2045(16)30297-2
- 50 Ogawa Y, Watanabe M, Tominaga T (2011) Prognostic factors of operated Rathke's cleft cysts with special reference to re-accumulation and recommended surgical strategy. *Acta Neurochir (Wien)* 153: 2427-2433; discussion 2433 Doi 10.1007/s00701-011-1072-8
- 51 Ogawa Y, Watanabe M, Tominaga T (2013) Rathke's cleft cysts with significant squamous metaplasia--high risk of postoperative deterioration and close origins to craniopharyngioma. *Acta Neurochir (Wien)* 155: 1069-1075 Doi 10.1007/s00701-012-1593-9
- 52 Pajtler KW, Wen J, Sill M, Lin T, Orisme W, Tang B, Hubner JM, Ramaswamy V, Jia S, Dalton JD et al (2018) Molecular heterogeneity and CXorf67 alterations in posterior fossa group A (PFA) ependymomas. *Acta Neuropathol* 136: 211-226 Doi 10.1007/s00401-018-1877-0
- 53 Pajtler KW, Witt H, Sill M, Jones DT, Hovestadt V, Kratochwil F, Wani K, Tatevossian R, Punchihewa C, Johann Pet et al (2015) Molecular Classification of Ependymal Tumors across All CNS Compartments, Histopathological Grades, and Age Groups. *Cancer Cell* 27: 728-743 Doi 10.1016/j.ccell.2015.04.002
- 54 Pan C, Diplas BH, Chen X, Wu Y, Xiao X, Jiang L, Geng Y, Xu C, Sun Y, Zhang Pet et al (2019) Molecular profiling of tumors of the brainstem by sequencing of CSF-derived circulating tumor DNA. *Acta Neuropathol* 137: 297-306 Doi 10.1007/s00401-018-1936-6
- 55 Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL et al (2008) An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321: 1807-1812 Doi 10.1126/science.1164382
- 56 Perrino CM, Ho A, Dall CP, Zynger DL (2017) Utility of GATA3 in the differential diagnosis of pheochromocytoma. *Histopathology* 71: 475-479 Doi 10.1111/his.13229
- 57 Piccioni DE, Achrol AS, Kiedrowski LA, Banks KC, Boucher N, Barkhoudarian G, Kelly DF, Juarez T, Lanman RB, Raymond VM et al (2019) Analysis of cell-free circulating tumor DNA in 419 patients with glioblastoma and other primary brain tumors. *CNS Oncol* 8: CNS34 Doi 10.2217/cns-2018-0015
- 58 Pickles JC, Mankad K, Aizpurua M, Paine SM, Bridges LR, Carceller F, Szychot E, Walker M, Fairchild AR, Mistry Tet et al (2021) A case series of Diffuse Glioneuronal Tumours with Oligodendroglioma-like features and Nuclear Clusters (DGONC). *Neuropathol Appl Neurobiol* 47: 464-467 Doi 10.1111/nan.12680

- 59 Rao M, Bhattacharjee M, Shepard S, Hsu S (2019) Newly diagnosed papillary craniopharyngioma with BRAF V600E mutation treated with single-agent selective BRAF inhibitor dabrafenib: a case report. *Oncotarget* 10: 6038-6042 Doi 10.18632/oncotarget.27203
- 60 Robinson DR, Wu YM, Kalyana-Sundaram S, Cao X, Lonigro RJ, Sung YS, Chen CL, Zhang L, Wang R, Su Fet al (2013) Identification of recurrent NAB2-STAT6 gene fusions in solitary fibrous tumor by integrative sequencing. *Nat Genet* 45: 180-185 Doi 10.1038/ng.2509
- 61 Sabedot T, Malta T, Snyder J, Nelson K, Wells M, deCarvalho A, Mukherjee A, Chitale D, Mosella M, Sokolov Aet al (2021) A serum-based DNA methylation assay provides accurate detection of glioma. *Neuro Oncol*: Doi 10.1093/neuonc/noab023
- 62 Sahm F, Schrimpf D, Jones DT, Meyer J, Kratz A, Reuss D, Capper D, Koelsche C, Korshunov A, Wiestler Bet al (2016) Next-generation sequencing in routine brain tumor diagnostics enables an integrated diagnosis and identifies actionable targets. *Acta Neuropathol* 131: 903-910 Doi 10.1007/s00401-015-1519-8
- 63 Sahm F, Schrimpf D, Olar A, Koelsche C, Reuss D, Bissel J, Kratz A, Capper D, Schefzyk S, Hielscher Tet al (2016) TERT Promoter Mutations and Risk of Recurrence in Meningioma. *J Natl Cancer Inst* 108: Doi 10.1093/jnci/djv377
- 64 Schweizer L, Capper D, Holsken A, Fahlbusch R, Flitsch J, Buchfelder M, Herold-Mende C, von Deimling A, Buslei R (2015) BRAF V600E analysis for the differentiation of papillary craniopharyngiomas and Rathke's cleft cysts. *Neuropathol Appl Neurobiol* 41: 733-742 Doi 10.1111/nan.12201
- 65 Schweizer L, Koelsche C, Sahm F, Piro RM, Capper D, Reuss DE, Pusch S, Habel A, Meyer J, Gock Tet al (2013) Meningeal hemangiopericytoma and solitary fibrous tumors carry the NAB2-STAT6 fusion and can be diagnosed by nuclear expression of STAT6 protein. *Acta Neuropathol* 125: 651-658 Doi 10.1007/s00401-013-1117-6
- 66 Schweizer L, Thierfelder F, Thomas C, Soschinski P, Suwala A, Stichel D, Wefers AK, Wessels L, Misch M, Kim HYet al (2020) Molecular characterization of CNS paragangliomas identifies cauda equina paragangliomas as a distinct tumor entity. *Acta Neuropathol* 140: 893-906 Doi 10.1007/s00401-020-02218-7
- 67 Sekine S, Shibata T, Kokubu A, Morishita Y, Noguchi M, Nakanishi Y, Sakamoto M, Hirohashi S (2002) Craniopharyngiomas of adamantinomatous type harbor beta-catenin gene mutations. *Am J Pathol* 161: 1997-2001 Doi 10.1016/s0002-9440(10)64477-x
- 68 So JS, Epstein JI (2013) GATA3 expression in paragangliomas: a pitfall potentially leading to misdiagnosis of urothelial carcinoma. *Mod Pathol* 26: 1365-1370 Doi 10.1038/modpathol.2013.76

- 69 Stichel D, Ebrahimi A, Reuss D, Schrimpf D, Ono T, Shirahata M, Reifenberger G, Weller M, Hanggi D, Wick W et al (2018) Distribution of EGFR amplification, combined chromosome 7 gain and chromosome 10 loss, and TERT promoter mutation in brain tumors and their potential for the reclassification of IDHwt astrocytoma to glioblastoma. *Acta Neuropathol* 136: 793-803 Doi 10.1007/s00401-018-1905-0
- 70 Stichel D, Schrimpf D, Casalini B, Meyer J, Wefers AK, Sievers P, Korshunov A, Koelsche C, Reuss DE, Reinhardt A et al (2019) Routine RNA sequencing of formalin-fixed paraffin-embedded specimens in neuropathology diagnostics identifies diagnostically and therapeutically relevant gene fusions. *Acta Neuropathol* 138: 827-835 Doi 10.1007/s00401-019-02039-3
- 71 Sturm D, Orr BA, Toprak UH, Hovestadt V, Jones DTW, Capper D, Sill M, Buchhalter I, Northcott PA, Leis I et al (2016) New Brain Tumor Entities Emerge from Molecular Classification of CNS-PNETs. *Cell* 164: 1060-1072 Doi 10.1016/j.cell.2016.01.015
- 72 Thomas C, Soschinski P, Zwaig M, Oikonomopoulos S, Okonechnikov K, Pajtler KW, Sill M, Schweizer L, Koch A, Neumann J et al (2021) The genetic landscape of choroid plexus tumors in children and adults. *Neuro Oncol* 23: 650-660 Doi 10.1093/neuonc/noaa267
- 73 Thomas C, Thierfelder F, Trager M, Soschinski P, Muther M, Edelmann D, Forster A, Geiler C, Kim HY, Filipinski K et al (2021) TERT promoter mutation and chromosome 6 loss define a high-risk subtype of ependymoma evolving from posterior fossa subependymoma. *Acta Neuropathol*: Doi 10.1007/s00401-021-02300-8
- 74 van den Bent MJ (2010) Interobserver variation of the histopathological diagnosis in clinical trials on glioma: a clinician's perspective. *Acta Neuropathol* 120: 297-304 Doi 10.1007/s00401-010-0725-7
- 75 Vogels R, Macagno N, Griewank K, Groenen P, Verdijk M, Fonville J, Kusters B, French CNSSFTHPCC, Dutch CNSSFTHPCC, Figarella-Branger D et al (2019) Prognostic significance of NAB2-STAT6 fusion variants and TERT promoter mutations in solitary fibrous tumors/hemangiopericytomas of the CNS: not (yet) clear. *Acta Neuropathol* 137: 679-682 Doi 10.1007/s00401-019-01968-3
- 76 Wefers AK, Stichel D, Schrimpf D, Coras R, Pages M, Tauziède-Espariat A, Varlet P, Schwarz D, Soylemezoglu F, Pohl U et al (2020) Isomorphic diffuse glioma is a morphologically and molecularly distinct tumour entity with recurrent gene fusions of MYBL1 or MYB and a benign disease course. *Acta Neuropathol* 139: 193-209 Doi 10.1007/s00401-019-02078-w
- 77 WHO Classification of Tumours: Soft Tissue and Bone Tumours (2020). WHO Editorial Board WHO Classification of Tumours: Soft Tissue and Bone Tumours tE---

- 78 Zada G, Lin N, Ojerholm E, Ramkissoon S, Laws ER (2010) Craniopharyngioma and other cystic epithelial lesions of the sellar region: a review of clinical, imaging, and histopathological relationships. *Neurosurg Focus* 28: E4 Doi 10.3171/2010.2.FOCUS09318

DANKSAGUNG

Ich danke meinen Kollegen, die mich auf meinem Weg in die Wissenschaft begleitet haben:

Alexander Younsi, Andreas von Deimling, Anne Thieme, Arend Koch, Christian Hartmann, Christian Kölsche, Christian Thomas, Claudia Vollbrecht, David Capper, David T.W. Jones, David E. Reuss, David A. Solomon, Felix Thierfelder, Felix Sahm, Frank L. Heppner, Frederick Klauschen, Hee-yeong Kim, Jochen Meyer, Jörg Balss, Manfred Dietel, Martin Hasselblatt, Martin Sill, Maximilian von Laffert, Michael Bockmayr, Philipp Seegerer, Rolf Buslei, Rosario Piro, Stefan Pusch, Ulrich Schüller, Werner Stenzel.

Mein besonderer Dank gilt den Organisatoren des BIH Charité Clinician Scientist Programms sowie dem Lenkungsausschuss des Deutschen Konsortium für Translationale Krebsforschung (DKTK) Standort Berlin für die Unterstützung während der vergangenen drei Jahre.

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden, -mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....

Datum

.....

Unterschrift