

Aus dem
CharitéCentrum 15 für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie
Klinik für Neurologie
Direktor: Prof. Dr. Matthias Endres

Habilitationsschrift

Molekulare Heterogenität von Hirntumoren

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Experimentelle Neurologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Dr. med. Philipp Euskirchen
geboren in Bonn

Eingereicht: 06/2020

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

1. Gutachter/in: Prof. Dr. Joachim Steinbach, Frankfurt

2. Gutachter/in: Prof. Dr. Till Acker, Gießen

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1. Molekulare Heterogenität	4
1.2. Zelluläre Heterogenität	5
1.3. Klassifikation von Hirntumoren	6
1.4. Personalisierte Onkologie	6
2. Fragestellung	8
3. Eigene Arbeiten	9
3.1. Bedeutung des Tumorzellgehalts für die Interpretation von Biomarkern	9
3.2. Expression des Transkriptionsfaktors ZEB1 im Kontext zellulärer Heterogenität	20
3.3. Funktionelle Heterogenität von EGFR-Alterationen	36
3.4. Reklassifikation von Astroblastomen anhand molekularer Merkmale	53
3.5. Methylierungsbasierte Klassifikation von Hirntumoren mittels Nanopore-Sequenzierung	63
4. Diskussion	78
4.1. Sensitivität und quantitative Interpretation diagnostischer Tests	78
4.2. Gezielte Therapie, funktionelle Heterogenität und Therapieresistenz	79
4.3. Entitätenbildung und Diagnosestellung in der Neuroonkologie	80
5. Zusammenfassung	83
A. Danksagung	92
B. Eidesstattliche Erklärung	93

Abkürzungen

DNA deoxyribunleic acid

EGFR epidermal growth factor receptor

EMT epithelial-mesenchymale Transition

FISH Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

GBM glioblastoma

GFAP glial fibrillary acidic protein

MAPK mitogen-activated protein kinase

MEK mitogen-activated protein kinase kinase

MGMT O-6-methylguanine-DNA methyltransferase

PCR polymerase chain reaction

TERT telomerase reverse transcriptase

TMZ Temozolomid

WHO World Health Organization

1. Einleitung

Solide Tumore sind komplexe Ökosysteme und bestehen neben den Tumorzellen selbst aus zahlreichen anderen Zelltypen (Stroma, Endothel, Immunzellen). Neben dieser zellulären Heterogenität unterscheiden sich Tumorzellen hinsichtlich molekularer Veränderungen. Diese molekulare Heterogenität kann sich innerhalb eines Tumors (intratumorale Heterogenität) oder zwischen von derselben Tumorentität betroffenen Individuen (intertumorale Heterogenität) manifestieren. Die Summe dieser Variabilität hat weitreichende Konsequenzen für die Diagnose und Therapie von Krebserkrankungen im klinischen Alltag. Das Verständnis der Tumorerheterogenität ist Grundlage und Grundvoraussetzung einer personalisierten Medizin. Die hier vorgestellten Arbeiten zu Hirntumoren sollen einen Beitrag zur Translation dieses Wissens in den klinische Neuroonkologie leisten.

1.1. Molekulare Heterogenität

Im Kontext zahlreicher Studien zur genetischen Charakterisierung von Krebserkrankungen meint Tumorerheterogenität implizit meist die molekulare Heterogenität von Tumoren. Ausgangspunkt ist hier die einfache Beobachtung, dass nicht alle Tumoren einer (meist histologisch definierten) Entität die gleichen genetischen Veränderungen tragen. Hierbei wird hinsichtlich der funktionellen Bedeutung für die Pathogenese zwischen Treibermutationen (engl. *driver mutations*) und Begleitmutationen (engl. *passenger mutations*) unterschieden. Genetische Heterogenität lässt sich auf verschiedenen Ebenen definieren:

Zwar finden sich innerhalb einer Entität häufig wiederkehrende Veränderungen eines Gens, nur selten sind jedoch Alterationen eines einzelnen Gens in allen untersuchten Fällen einer Tumorentität zu finden. Hierzu seien beispielhaft das kleinzellige Bronchialkarzinom mit ubiquitären Mutationen in *RB1* und *TP53* (George et al., 2015) und das Oligodendrogliom mit pathognomonischer *IDH*-Mutation und 1p/19q-Kodeletion genannt. Trotz Heterogenität auf Ebene einzelner Gene findet sich jedoch eine funktionelle Verwandtschaft, z.B. durch Zugehörigkeit der beobachteten Genmutationen zu einem gemeinsamen Signalweg. Beispielsweise findet sich in pilozytischen Astrozytomen immer eine Aktivierung des MAPK-Signalwegs (Jones et al., 2013), wenn auch durch unterschiedliche genomische Alterationen (*BRAF*-Fusion, *FGFR1*-Mutation etc.).

Ebenso können die Punktmutationen innerhalb eines Gens rekurrent oder divers sein. Dabei zeigt sich bei onkogenen Veränderungen (engl. *gain of function*) meist eine Konzentration auf einzelne funktionelle Domänen oder gar einzelne Aminosäuren (sog. *hotspot mutations*) eines Gens, während bei inaktivierenden Mutationen (engl. *loss of function*) in Tumorsuppressoren häufig eine breite Streuung über die kodierende Sequenz beobachtet wird.

Auch innerhalb eines individuellen Tumors sowie zwischen Primärtumor und zugehörigen Metastasen finden sich all diese Formen genomischer Heterogenität. Es wird unterschieden, ob Mutationen in allen, einigen und nur einzelnen Absiedelungen oder Bereichen eines Tumors auftreten (engl. *common, shared and private mutations*). Ähnlich kann eine Unterscheidung in *klonale*, d.h. in der Gesamtheit der Tumorzellen vorhandenen, und *subklonale* Mutationen erfolgen. So lässt sich auch innerhalb eines einzelnen Neoplasmas ein „phylogenetischer Stammbaum“ ableiten (Gerlinger et al., 2012). Diese intratumorale Heterogenität hat erhebliche Bedeutung für die Evolution der individuellen Erkrankung über die Zeit und unter Therapie und zahlreiche verschiedene Muster der Evolution können beobachtet werden (Maley et al., 2017).

1.2. Zelluläre Heterogenität

Die molekulare Heterogenität betrifft vor allem die Tumorzellen selbst. Jedoch finden sich in soliden Tumoren in stark veränderlicher, häufig jedoch charakteristischer Zusammensetzung zahlreiche nicht-neoplastische Zellpopulationen. In Hirntumoren sind dies entzündliche (Mikroglia, Makrophagen, Lymphozyten) und vaskuläre (Endothelzellen, Perizyten) Zelltypen sowie das ortsständige Normalgewebe, teils in reaktiven Formen (Astrozyten, Oligodendrozyten, Neurone). Zwischen den meisten dieser Zelltypen und Tumorzellen sind funktionell relevante und teils mechanistisch aufgeklärte Interaktionen beschrieben worden.

So soll beispielsweise elektrische neuronale Aktivität das Wachstum maligner Gliome durch Ausschüttung von Neuroligin 3 (Venkatesh et al., 2015) befördern, Astrozyten unterstützen die Metastasierung von Karzinomen durch parakrine Signalwege mittels *gap junctions* (Chen et al., 2016) und tumor-assoziierte Mikroglia und Makrophagen sezernieren Interleukine mit protumorigenen Effekten (Hambardzumyan et al., 2015).

Dabei ergeben sich in einzelnen Entitäten typische Muster zellulärer Zusammensetzung. Optikusgliome bei Patienten mit Neurofibromatose, Typ I zeigen beispielsweise eine charakteristische Infiltration durch aktivierte Mikroglia (Klein & Roggendorf, 2001).

1.3. Klassifikation von Hirntumoren

Krebserkrankungen werden seit einem guten Jahrhundert durch histologische Merkmale definiert und unterschieden. Unzulänglichkeiten in der rein histologischen Definition von Tumorerkrankungen spiegeln sich jedoch im Spektrum der definierten Entitäten und über die Historie offizieller Klassifikationen wieder.

Mit der Revision der WHO Klassifikation von Tumoren des Zentralnervensystems im Jahr 2016 (Louis et al., 2016) erhielt erstmals das Konzept einer *integrierten* Diagnose Einzug, welche histomorphologische und molekulare Kriterien berücksichtigt. Als herausragendes Beispiel sei die Differenzierung niedriggradiger diffuser Gliome in Astrozytome und Oligodendrogliome mithilfe molekularer Marker genannt. Astrozytome sind durch fortsatztragende astrozytäre Tumorzellen mit länglichen Kernen gekennzeichnet, dem gegenübergestellt ist die Morphologie des Oligodendroglioms mit runden Nuclei und perinukleärem Halo (sogenannte "Spiegelestruktur"), Mikroverkalkungen und kapillärem Netzwerk. Oft sind jedoch Oligoastrozytome (oder Mischgliome) mit Merkmalen beider Varianten beschrieben worden. Ebenso finden sich immer wieder klinisch aggressive Verläufe, ohne dass sich Zeichen der Anaplasie, Nekrosen und Gefäßproliferationen als Merkmale eines Glioblastoms zeigen.

Erst die Entdeckung von Mutationen im *IDH1*-Gen (und seltener *IDH2*) (Parsons et al., 2008) und der 1p/19q-Kodeletion haben eine scharfe Trennung zwischen den prognostisch günstigen IDH-mutierten und 1p/19q-kodeletierten Oligodendrogliomen und den IDH-mutierten, jedoch nicht 1p/19q-kodeletierten Astrozytomen ermöglicht (Cancer Genome Atlas Research Network et al., 2015). Diffuse IDH-Wildtyp-Gliome zeigen dagegen trotz niedriggradiger Histologie meist ein aggressives Verhalten und entsprechen bei Nachweis typischer Veränderungen (Zugewinn Chromosom 7, Verlust Chromosom 10, EGFR-Amplifikation, TERT-Promoter-Mutation) meist einem Glioblastom, IDH-Wildtyp (Stichel et al., 2018).

Die Stratifizierung anhand dieser beiden Parameter führt zu prognostisch deutlich homogeneren Entitäten und demonstriert eindrücklich die Überlegenheit der integrierten Diagnose (Eckel-Passow et al., 2015).

1.4. Personalisierte Onkologie

Während die systematische Kartierung der genomischen Veränderungen in Hirntumoren zunehmend zur Restrukturierung und Neubildungen von Entitäten führt, meint der Begriff der personalisierten Medizin in der Onkologie eine individualisierte Behandlung in Abhängigkeit des Nachweises spezifischer molekularer Alterationen innerhalb einer Entität. Dabei sind die oben skizzierten Variablen der Heterogenität relevant für die Auswahl, Wirksamkeit und Resistenzentwicklung von Therapien.

Besondere Bedeutung kommt den gezielten Therapien (engl. *targeted therapies*) zu. Entwicklung und Wirkmechanismus dieser Pharmakotherapien sind ausgerichtet auf ein Zielmolekül, welches bei der jeweiligen Erkrankung verändert ist, vorwiegend oder ausschließlich auf entitätsspezifischen Zellen exprimiert wird oder einem aktivierten Signalweg zugehörig ist. Dieser erkrankungsspezifische Tropismus kann durch spezifische Proteinveränderungen als Zielstruktur (z.B. mutationsspezifische BRAF-Inhibitoren), Oberflächenantigene (z.B. B-Zell-depletierende Antikörper bei Lymphomen) oder selektive Hemmung von Schlüsselproteinen eines Signalwegs (z.B. MEK-Inhibitoren) erreicht werden.

Das Fortschreiten einer Tumorerkrankung bringt eine Evolution der molekularen Zielstrukturen mit sich und führt häufig zu einer erworbenen Therapieresistenz unter der Behandlung. Wichtige Faktoren für die Wirksamkeit einer gezielten Therapie sind demnach

- die Klonalität von Zielmutationen,
- ein hohes Verhältnis von Expression oder Aktivität der Zielstrukturen im Vergleich von Tumor- zu Normalgewebe im Sinne eines „Alleinstellungsmerkmals“, sowie
- die Abhängigkeit von der Aktivität einer Zielstruktur im Sinner einer *oncogene addiction*.

Aufgrund der empirischen Tumorheterogenität kommt der Auswahl einer gezielten Therapie und der dafür zugrundeliegenden molekularen Diagnostik eine zentrale Rolle zu, um eine *primäre* Therapieresistenz zu vermeiden.

In der Neuroonkologie kommen gezielte Therapien gegenwärtig fast ausschließlich im Studienkontext oder im Rahmen individueller Heilversuche zur Anwendung. Entitätsspezifische Zulassungen gibt es in Deutschland nicht. Erstmals besteht seit Kurzem jedoch eine *tumoragnostische* Zulassung für den NTRK-Inhibitor Larotrectinib. NTRK-Translokationen finden sich häufig bei infantilen Gliomen (Stucklin et al., 2019; Wu et al., 2014), so dass sich hier erste Indikationen ergeben. Darüber hinaus zeigen klinische Studien beispielsweise eine Wirksamkeit von BRAF-Inhibitoren bei pleomorphen Xanthoastrozytomen (Kaley et al., 2018).

Neben der gezielten Therapie wird jedoch auch in der Neuroonkologie eine individualisierte konventionelle (zytostatische und Radio-)Therapie anhand prädiktiver Biomarker durchgeführt. Dazu gehört der Methylierungsstatus des *MGMT*-Promoters beim IDH-Wildtyp-Glioblastom, der als Prädiktor für ein Ansprechen auf eine alkylierende Chemotherapie gilt (Wick et al., 2014).

2. Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, relevante Determinanten der komplexen Heterogenität von Hirntumoren zu erfassen und für die klinische Anwendung nutzbar zu machen.

- Welche Konsequenzen hat die Beimischung nicht-maligner Zellen in einem soliden Tumor für die Aussagekraft von Biomarkern und diagnostischen Tests?
- Wie kann molekulare Diagnostik zur Entitätenbildung und diagnostischen Sicherheit beitragen?
- Wie können (epi)genetische Veränderungen schnell und zuverlässig getestet werden, um erweiterte molekulare Diagnostik in die klinische Routine zu integrieren?

3. Eigene Arbeiten

3.1. Bedeutung des Tumorzellgehalts für die Interpretation von Biomarkern

Ein lange bekanntes Phänomen bei Glioblastomen ist die Infiltration des soliden Tumors durch Immunzellen (Morantz et al., 1979), vor allem Mikroglia und Makrophagen. Zahlreiche molekulare Mechanismen der Chemotaxis von Immunzellen durch Tumorzellen als auch der von den Immunzellen ausgehenden protumorigenen Signalen sind beschrieben und legen eine positive Rückkopplung zwischen beiden Zellpopulationen nahe, die das Tumorwachstum begünstigt (Hambardzumyan et al., 2015). Diese zelluläre Heterogenität ist jedoch wenig untersucht hinsichtlich ihrer klinischen Bedeutung sowie der Implikationen für diagnostische Tests.

In der folgenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Tumorzellgehalt (engl. *tumor purity*) als reziprokes Maß einer Infiltration durch Immunzellen ein positiv prognostischer Marker für das Gesamtüberleben in Glioblastomen ist.

Zunächst wurde untersucht, ob die Variabilität des Tumorzellgehalts die Interpretation der MGMT-Promotermethylierung, einem wichtiger prädiktiven Biomarker für das Ansprechen auf eine alkylierende Chemotherapie (Wick et al., 2014), beeinflusst. Dafür wurde zunächst eine allelspezifische quantitative PCR für Hotspot-Mutationen im TERT-Promoter etabliert. Mutationen an einem von zwei Positionen (C128T, C250T) kommen in 50 bis 80% der Glioblastome (Bell et al., 2016; Killela et al., 2013; Koelsche et al., 2013) sowie nahezu 100% der Oligodendrogliome vor (Cancer Genome Atlas Research Network et al., 2015; Eckel-Passow et al., 2015). Da diese Mutationen als klonal gelten (Suzuki et al., 2015) und regelhaft heterozygot auftreten, kann die mutierte Allelfrequenz (engl. *mutant allele frequency*, *MAF*) als Surrogatmarker des Tumorzellgehalts einer Gewebeprobe herangezogen werden.

Damit konnte gezeigt werden, dass die methylierte Allelfrequenz des MGMT-Promoters, wie zu erwarten, direkt mit dem Tumorzellgehalt korreliert. Dies hat zum einen mögliche Konsequenzen für die Sensitivität der Bestimmung der MGMT-Promoterstatus bei Tumoren mit niedrigem Tumorzellgehalt durch falsch-negative Ergebnisse. Zum anderen interpretieren mehrere Autoren das Maß der Promotermethylierung quantitativ und schreiben diesem einen positiv prognostischen Wert zu. (Dunn et al., 2009; Hsu et al., 2015). Diese Interpretation muss vor dem Hintergrund der Kollinearität mit dem

Tumorzellgehalt kritisch interpretiert werden. Vielmehr konnte der Tumorzellgehalt in Metaanalyse einer unabhängigen Kohorte (Brennan et al., 2013) als unabhängiger prognostischer Faktor identifiziert werden.

Darüber hinaus konnte eine regionale Heterogenität des Tumorzellgehalts beobachtet werden: Im Frontallappen gelegene Tumoren zeichnen sich durch einen signifikant höheren Tumorzellgehalt aus.

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstract der Arbeit:

Schulze Heuling, E., Knab, F., Radke, J., Eskilsson, E., Martinez-Ledesma, E., Koch, A., Czabanka, M., Dieterich, C., Verhaak, R. G., Harms, C., **Euskirchen, P.** (2017). Prognostic Relevance of Tumor Purity and Interaction with MGMT Methylation in Glioblastoma. *Molecular Cancer Research*, 15(5), 532–540. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0322>

„Promoter methylation status of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), a DNA repair enzyme, is a critical biomarker in glioblastoma (GBM), as treatment decisions and clinical trial inclusion rely on its accurate assessment. However, interpretation of results is complicated by poor interassay reproducibility as well as a weak correlation between methylation status and expression levels of MGMT. This study systematically investigates the influence of tumor purity on tissue subjected to MGMT analysis. A quantitative, allele-specific real-time PCR (qAS-PCR) assay was developed to determine genotype and mutant allele frequency of telomerase promoter (pTERT) mutations as a direct measure of tumor purity. We studied tumor purity, pTERT mutation by Sanger sequencing, MGMT methylation by pyrosequencing, IDH1 mutation status, and clinical parameters in a cohort of high-grade gliomas (n = 97). The qAS-PCR reliably predicted pTERT genotype and tumor purity compared with independent methods. Tumor purity positively and significantly correlated with the extent of methylation in MGMT methylated GBMs. Extent of MGMT methylation differed significantly with respect to pTERT mutation hotspot (C228T vs. C250T). Interestingly, frontal lobe tumors showed greater tumor purity than those in other locations. Above all, tumor purity was identified as an independent prognostic factor in GBM. In conclusion, we determined mutual associations of tumor purity with MGMT methylation and pTERT mutations and found that the extent of MGMT methylation reflects tumor purity. In turn, tumor purity is prognostic in IDH1 wild-type GBM. Implications: Tumor purity is an independent prognostic marker in glioblastoma and is associated with the extent of MGMT methylation.“

3.2. Expression des Transkriptionsfaktors ZEB1 im Kontext zellulärer Heterogenität

In Karzinomen kommt der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) eine bedeutende Rolle als Progressionsmodell und Mechanismus für die Aussaat von Metastasen zuteil (Thiery et al., 2009). Auf molekularer Ebene wird dem Transkriptionsfaktor ZEB1 dabei eine EMT-aktivierende Funktion zugeschrieben (Wellner et al., 2009).

In der folgenden Arbeit wurde die Expression von ZEB1 in Gliomen untersucht. Überraschend und im Gegensatz zu Vorarbeiten anderer Autoren wurde dabei eine ubiquitäre Expression in Tumorzellen beobachtet: Quantitative immunhistochemische Untersuchungen auf Einzelzellniveau an humanen Biopsien zeigen, dass ZEB1 in allen untersuchten glialen Tumorentitäten (Astrozytome, Oligodendrogliome, Glioblastom) intratumoral in der großen Mehrheit der Tumorzellen und intertumoral in nahezu allen untersuchten Gewebeproben exprimiert wird. In Zelllinien unterschiedlicher transkriptioneller Subtypen (Verhaak et al., 2010) wurde eine ZEB1 Expression immunocytochemisch ubiquitär beobachtet.

Hinweise auf eine EMT-ähnliche Mobilisierung invasiver Tumorzellen durch ZEB1-Aktivierung konnten damit nicht bestätigt werden. Die beobachtete Variabilität der ZEB1-Expression in Tumorzellen ließ sich vielmehr auf eine unterschiedliche zelluläre Zusammensetzung zurückführen, da infiltrierende Mikroglia und Makrophagen ZEB1 nicht exprimieren. Wie in der vorherigen Arbeit kommt der zellulären Heterogenität hier Bedeutung als Störfaktor hinsichtlich der Interpretation von Meßergebnissen, z.B. der Genexpression, in gemischtzelligen Geweben (*bulk samples*) zu.

Unterschiede im ZEB1 *labelling index*, d.h. dem relativen Anteil ZEB1-exprimierender Zellen, zwischen Glioblastomen verschiedener Subtypen (IDH^{wt}EGFR^{ampl} vs. IDH^{wt}EGFR^{wt} vs. IDH^{mut}) liefern jedoch indirekte Hinweise auf eine unterschiedliche zelluläre Komposition dieser Subtypen. Zwischenzeitlich haben mehrere Arbeiten solche Genotyp-Phänotyp-Assoziationen bestätigt (Amankulor et al., 2017; Kaffes et al., 2019; Martinez-Lage et al., 2019; Wang et al., 2017). In IDH-mutierten Gliomen herrscht beispielsweise eine immunsuppressive Mikroumgebung vor, welche wahrscheinlich mediiert ist durch den Onkometaboliten 2-Hydroxyglutarat (Bunse et al., 2018), der als Folge der Genmutation in IDH1 oder IDH2 im Tumorgewebe angereichert wird.

Die bezüglich der Grundhypothese eines relevanten EMT-Mechanismus als Negativergebnis zu wertende Arbeit illustriert damit die Bedeutung zellulärer Heterogenität auf Expressionsstudien in Tumorgeweben.

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstract der Arbeit:

Euskirchen, P.*, Radke, J.*, Schmidt, M. S., Heuling, E. S., Kadikowski, E., Maricos, M., Knab, F., Grittner, U., Zerbe, N., Czabanka, M., Dieterich, C., Miletic, H., Mørk, S., Koch, A., Endres, M., Harms, C. (2017). Cellular heterogeneity contributes to subtype-specific expression of ZEB1 in human glioblastoma. PLOS ONE, 12(9), e0185376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185376>

„The transcription factor ZEB1 has gained attention in tumor biology of epithelial cancers because of its function in epithelial-mesenchymal transition, DNA repair, stem cell biology and tumor-induced immunosuppression, but its role in gliomas with respect to invasion and prognostic value is controversial. We characterized ZEB1 expression at single cell level in 266 primary brain tumors and present a comprehensive dataset of high grade gliomas with Ki67, p53, IDH1, and EGFR immunohistochemistry, as well as EGFR FISH. ZEB1 protein expression in glioma stem cell lines was compared to their parental tumors with respect to gene expression subtypes based on RNA-seq transcriptomic profiles. ZEB1 is widely expressed in glial tumors, but in a highly variable fraction of cells. In glioblastoma, ZEB1 labeling index is higher in tumors with EGFR amplification or IDH1 mutation. Co-labeling studies showed that tumor cells and reactive astroglia, but not immune cells contribute to the ZEB1 positive population. In contrast, glioma cell lines constitutively express ZEB1 irrespective of gene expression subtype. In conclusion, our data indicate that immune infiltration likely contributes to differential labelling of ZEB1 and confounds interpretation of bulk ZEB1 expression data.“

3.3. Funktionelle Heterogenität von EGFR-Alterationen

Eine Amplifikation des EGFR Gens wird in etwa der Hälfte der Glioblastome beobachtet (Brennan et al., 2013) und ist damit eine der häufigsten genetischen Alterationen in dieser Entität. In der folgenden Studie wurde die Genotyp-Phänotyp-Beziehung zwischen EGFR-Amplifikation, -Expression und -Aktivierung und Tumorangiogenese untersucht.

In humanen Biopsien und *in vivo* Experimenten lassen sich zwei Phänotypen unterscheiden: In EGFR-amplifizierten Glioblastomen dominiert ein invasiver Phänotyp, in EGFR-negativen Tumoren wird die Histomorphologie durch Angiogenese mit Gefäßproliferation, Pseudopalisadierung und Nekrosen bestimmt. Ein kausaler Zusammenhang zwischen EGFR-Aktivität und Invasivität und Angiogenese konnte in zwei unterschiedlichen Tiermodellen bestätigt werden.

Zudem deuteten sich funktionelle Unterschiede zwischen der Expression des EGFR-Wildtyp und der häufigen EGFRVIII-Mutante an, bei der die Exone 2-8 deletiert sind und eine konstitutionelle Aktivierung resultiert. Während die Expression des EGFR-Wildtyps von einem invasiven Phänotyp begleitet wird, ist die Expression der Mutante mit einem Wechsel zum angiogenetischen Phänotyp vergesellschaftet. Dies konnte in einer späteren Studie bestätigt werden (Eskilsson et al., 2016).

Es können also Veränderungen im selben Gen unterschiedliche funktionelle Konsequenzen nach sich ziehen.

Interessanterweise sind Alterationen von EGFR auch durch eine hohe örtliche Heterogenität gekennzeichnet: Amplifikationen der Onkogene EGFR, PDGFRA und/oder MET wurden in sich gegenseitig ausschließender Weise in Zellen desselben Tumors beobachtet, dabei zeigt sich in unterschiedlichen Regionen eine Dominanz einer der Alterationen (Snuderl et al., 2011). Darüber hinaus treten EGFR-Amplifikationen als extrachromosomale, zirkuläre DNA auf, dabei werden aktivierende Enhancer-Elemente eingeschlossen (Morton et al., 2019). Die dynamischen Vererbungsmuster extrachromosomaler Elemente begünstigen eine schnelle Tumormikroevolution (de Carvalho et al., 2018).

Diese strukturellen, örtlichen und funktionellen Dimensionen intratumoraler Heterogenität (Furnari et al., 2015) sind wahrscheinliche Ursachen der beobachteten Therapieresistenz von Glioblastomen gegenüber verschiedensten Klassen von EGFR-gerichteten Therapien, so dass bisherige klinische Studien der Phasen II/III keinen Überlebensvorteil in dieser Entität haben zeigen können (Eskilsson et al., 2018; Touat et al., 2017; Verhaak et al., 2019).

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstract der Arbeit:

Talasila, K. M., Soentgerath, A., **Euskirchen, P.**, Rosland, G. V., Wang, J., Huszthy, P. C., Prestegarden, L., Skaftnesmo, K. O., Sakariassen, P. Ø., Eskilsson, E., Stieber, D., Keunen, O., Brekka, N., Moen, I., Nigro, J. M., Vintermyr, O. K., Lund-Johansen, M., Niclou, S., Mørk, S. J., Enger, P. Ø., Bjerkvig, R., Miletic, H. (2013). EGFR wild-type amplification and activation promote invasion and development of glioblastoma independent of angiogenesis. *Acta Neuropathologica*, 125(5), 683–698. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1101-1>

„Angiogenesis is regarded as a hallmark of cancer progression and it has been postulated that solid tumor growth depends on angiogenesis. At present, however, it is clear that tumor cell invasion can occur without angiogenesis, a phenomenon that is particularly evident by the infiltrative growth of malignant brain tumors, such as glioblastomas (GBMs). In these tumors, amplification or overexpression of wild-type (wt) or truncated and constitutively activated epidermal growth factor receptor (EGFR) are regarded as important events in GBM development, where the complex downstream signaling events have been implicated in tumor cell invasion, angiogenesis and proliferation. Here, we show that amplification and in particular activation of wild-type EGFR represents an underlying mechanism for non-angiogenic, invasive tumor growth. Using a clinically relevant human GBM xenograft model, we show that tumor cells with EGFR gene amplification and activation diffusely infiltrate normal brain tissue independent of angiogenesis and that transient inhibition of EGFR activity by cetuximab inhibits the invasive tumor growth. Moreover, stable, long-term expression of a dominant-negative EGFR leads to a mesenchymal to epithelial-like transition and induction of angiogenic tumor growth. Analysis of human GBM biopsies confirmed that EGFR activation correlated with invasive/non-angiogenic tumor growth. In conclusion, our results indicate that activation of wild-type EGFR promotes invasion and glioblastoma development independent of angiogenesis, whereas loss of its activity results in angiogenic tumor growth.“

3.4. Reklassifikation von Astroblastomen anhand molekularer Merkmale

Astroblastome sind seltene gliale Tumore, die vorwiegend bei Kindern auftreten. Sie sind histologisch definiert als GFAP-exprimierende Tumore mit perivaskulärer Pseudorosettenbildung um häufig hyalin sklerosierte Gefäße (Louis et al., 2016). Jedoch kann auch in anderen Entitäten eine perivaskuläre Gruppierung von Tumorzellen imponieren, z.B. bei Ependymomen. Die klinischen Verläufe bei Astroblastomen sind zudem ausgesprochen variabel, wodurch früh Zweifel entstanden sind, ob es sich um eine eigenständige Entität handelt. Eine molekulare Charakterisierung hat bei zahlreichen Entitäten dazu beitragen können, diese Widersprüche aufzulösen.

In der folgenden Arbeit wurde eine Kohorte vorwiegend adulter Patienten mit Astroblastom mittels Panel-Sequenzierung, Methylierungsanalyse und Transkriptom-Sequenzierung untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese Tumore molekulare Signaturen anderer gut definierter Entitäten tragen. Es fielen drei Gruppen mit jeweils hoher Ähnlichkeit zu pleomorphen Xanthoastrozytomen (PXA), hochgradigen Gliomen (high grade glioma, HGG) sowie höhergradig neuroepithelialen Tumoren mit MN1-Alterationen (HGNET-MN1) auf. Letztere Entität wurde kürzlich als molekular homogene Gruppe mit rekurrenten Veränderungen im MN1-Gen beschrieben und präsentiert sich in etwa 50% der Fälle histologisch als Astroblastom (Sturm et al., 2016).

In unserer Serie vorwiegend adoleszenter und adulter Patienten wurde nur ein Fall dieser Gruppe zugeordnet. Die übrigen Fälle scheinen vielmehr etwa zur Hälfte der PXA- bzw. HGG-Gruppe zugehörig. Entscheidend ist, dass diese Reklassifizierung die unterschiedlichen klinischen Verläufe zu erklären vermag: PXA-ähnliche Astroblastome zeigen einen gutartigen klinischen Verlauf, während Tumoren der HGG-Gruppe mit einer signifikant kürzeren Gesamtüberlebenszeit vergesellschaftet sind.

Zusammenfassend erlaubt eine molekulare Charakterisierung eine Reklassifikation von Astroblastomen zu bekannten und molekular gut definierten Entitäten. Die Definition des Astroblastoms anhand histologischer Kriterien muss daher infrage gestellt werden. Wichtig ist, dass die hohe Prävalenz von Mutationen im MAPK-Signalweg in der PXA-Gruppe eine Rationale für eine gezielte Therapie mit BRAF- und MEK-Inhibitoren bietet (Hussain et al., 2018; Kaley et al., 2018; Touat et al., 2019).

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstract der Arbeit:

Boisseau, W.*, **Euskirchen, P.***, Mokhtari, K., Dehais, C., Touat, M., Hoang-Xuan, K., Sanson, M., Capelle, L., Nouet, A., Karachi, C., Bielle, F., Guégan, J., Marie, Y., Martin-Duverneuil, N., Taillandier, L., Rousseau, A., Delattre, J.-Y., Idbaih, A. (2019). Molecular Profiling Reclassifies Adult Astroblastoma into Known and Clinically Distinct Tumor Entities with Frequent Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Alterations. *The Oncologist*, 24(12), 1584–1592. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2019-0223>

„BACKGROUND: Astroblastoma (ABM) is a rare glial brain tumor. Recurrent meningioma 1 (MN1) alterations have been recently identified in most pediatric cases. Adolescent and adult cases, however, remain molecularly poorly defined. MATERIALS AND METHODS: We performed clinical and molecular characterization of a retrospective cohort of 14 adult and 1 adolescent ABM.

RESULTS: Strikingly, we found that MN1 fusions are a rare event in this age group (1/15). Using methylation profiling and targeted sequencing, most cases were reclassified as either pleomorphic xanthoastrocytomas (PXA)-like or high-grade glioma (HGG)-like. PXA-like ABM show BRAF mutation (6/7 with V600E mutation and 1/7 with G466E mutation) and CD34 expression. Conversely, HGG-like ABM harbored specific alterations of diffuse midline glioma (2/5) or glioblastoma (GBM; 3/5). These latter patients showed an unfavorable clinical course with significantly shorter overall survival ($p = .021$). Mitogen-activated protein kinase pathway alterations (including FGFR fusion, BRAF and NF1 mutations) were present in 10 of 15 patients and overrepresented in the HGG-like group (3/5) compared with previously reported prevalence of these alterations in GBM and diffuse midline glioma.

CONCLUSION: We suggest that gliomas with astroblastic features include a variety of molecularly sharply defined entities. Adult ABM harboring molecular features of PXA and HGG should be reclassified. Central nervous system high-grade neuroepithelial tumors with MN1 alterations and histology of ABM appear to be uncommon in adults. Astroblastic morphology in adults should thus prompt thorough molecular investigation aiming at a clear histomolecular diagnosis and identifying actionable drug targets, especially in the mitogen-activated protein kinase pathway.“

3.5. Methylierungsbasierte Klassifikation von Hirntumoren mittels Nanopore-Sequenzierung

Am Beispiel des Astroblastoms ist deutlich geworden, dass eine Klassifikation von Tumorentitäten ausschließlich anhand histomorphologischer Merkmale nicht ausreichend ist. Diese Erkenntnis hat zur Einführung des Konzept einer integrierten Diagnose in der aktuellen WHO-Klassifikation von ZNS-Tumoren (Louis et al., 2016) geführt, welche histologische und molekulare Kriterien zur Definition und Differenzierung von Tumorentitäten heranzieht.

Davon unabhängig hat die Methode der methylierungs-basierten Klassifikation eine völlig neue Sicht auf die Diagnostik von Tumoren ermöglicht. Dazu werden entitätenspezifische Muster der 5'-Methylierung von Cytosinen (5mC) genutzt. Der Methylierungsstatus in CpG-Kontexten wird dabei in Tumor-DNA genomweit bestimmt, bisher meist mittels Hybridisierungs-Microarrays. Anschließend erfolgt mittels Algorithmen maschinellen Lernens und einem Referenzdatensatz die Klassifikation einer unbekannt Probe. Mit dieser Methode konnten zunächst die klinisch relevanten Subtypen des Medulloblastoms zuverlässig bestimmt werden (Hovestadt et al., 2013). Die Generierung umfangreicher und kuratierter Referenzdaten ermöglicht aktuell eine Klassifikation nahezu aller bekannten Hirntumoren anhand des Methylierungsprofils (Capper et al., 2018). Methylierungsmerkmale erlauben auch eine Klassifikation bei Hirnmetastasen oder Krebserkrankungen mit unbekanntem Primärtumor (engl. *cancer of unknown primary, CUP*) (Moran et al., 2016; Orozco et al., 2018).

Nachteil der technologisch weitgehend überholten Microarrays ist jedoch die aufwendige Probenvorbereitung und die daraus resultierende lange Durchführungszeit des Tests sowie hohe Anschaffungskosten. Diese Nachteile werden in der folgenden Arbeit durch Einsatz der Genomsequenzierung mittels Nanoporen umgangen. Der beschriebene Ansatz ermöglicht Probenvorbereitung, Sequenzierung und Datenanalyse in weniger als 24 Stunden. Damit wird eine zeitnahe integrierte Diagnose möglich und perspektivisch sogar eine intraoperative Klassifikation denkbar. Demonstriert wird die Anwendung zur (Sub-)Klassifikationen von Gliomen und Medulloblastomen sowie eine Zuordnung von Hirnmetastasen zum Primärtumor.

Darüber hinaus ermöglichen dieselben Daten die Bestimmung eines Kopienzahlprofils (engl. *copy number profile*), die Identifikation diagnostisch oder präzisionstherapeutisch relevanter fokaler Amplifikationen und Deletionen (EGFR-Amplifikation, 1p/19q-Verlust) sowie die Rekonstruktion der Struktur extrachromosomaler zirkulärer DNA-Elemente ("double minutes").

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstract der Arbeit:

Euskirchen, P., Bielle, F., Labreche, K., Kloosterman, W. P., Rosenberg, S., Daniau, M., Schmitt, C., Masliah-Planchon, J., Bourdeaut, F., Dehais, C., Marie, Y., Delattre, J.-Y., Idbaih, A. (2017). Same-day genomic and epigenomic diagnosis of brain tumors using real-time nanopore sequencing. *Acta Neuropathologica*, 134(5), 691–703. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1743-5>

„Molecular classification of cancer has entered clinical routine to inform diagnosis, prognosis, and treatment decisions. At the same time, new tumor entities have been identified that cannot be defined histologically. For central nervous system tumors, the current World Health Organization classification explicitly demands molecular testing, e.g., for 1p/19q-codeletion or IDH mutations, to make an integrated histomolecular diagnosis. However, a plethora of sophisticated technologies is currently needed to assess different genomic and epigenomic alterations and turnaround times are in the range of weeks, which makes standardized and widespread implementation difficult and hinders timely decision making. Here, we explored the potential of a pocket-size nanopore sequencing device for multimodal and rapid molecular diagnostics of cancer. Low-pass whole genome sequencing was used to simultaneously generate copy number (CN) and methylation profiles from native tumor DNA in the same sequencing run. Single nucleotide variants in IDH1, IDH2, TP53, H3F3A, and the TERT promoter region were identified using deep amplicon sequencing. Nanopore sequencing yielded 0.1X genome coverage within 6 h and resulting CN and epigenetic profiles correlated well with matched microarray data. Diagnostically relevant alterations, such as 1p/19q codeletion, and focal amplifications could be recapitulated. Using ad hoc random forests, we could perform supervised pan-cancer classification to distinguish gliomas, medulloblastomas, and brain metastases of different primary sites. Single nucleotide variants in IDH1, IDH2, and H3F3A were identified using deep amplicon sequencing within minutes of sequencing. Detection of TP53 and TERT promoter mutations shows that sequencing of entire genes and GC-rich regions is feasible. Nanopore sequencing allows same-day detection of structural variants, point mutations, and methylation profiling using a single device with negligible capital cost. It outperforms hybridization-based and current sequencing technologies with respect to time to diagnosis and required laboratory equipment and expertise, aiming to make precision medicine possible for every cancer patient, even in resource-restricted settings.“

4. Diskussion

Die hier aufgeführten Arbeiten sollen zum Verständnis der tumorbiologischen Grundlagen und deren Konsequenzen für die Diagnostik und Therapie von Hirntumoren beitragen. Die Präzisionsonkologie birgt großes Potential für die Verbesserung der Versorgung von Krebspatienten. Gleichzeitig stellt sie Herausforderungen an die diagnostischen Tests, deren Interpretation und die Wahl der Therapie einschließlich des Designs klinischer Studien.

4.1. Sensitivität und quantitative Interpretation diagnostischer Tests

Die intratumorale, zelluläre Heterogenität beeinflusst die Interpretierbarkeit solcher diagnostischer Tests, welche Proben aus Tumorgewebe als Ganzem (engl. *bulk tumor*) untersuchen. Dazu zählen beispielsweise übliche Methoden der DNA-Sequenzierung, welche darauf zielen das Vorliegen einer Mutation nachzuweisen oder auszuschließen. Die Sensitivität hängt erheblich vom Tumorzellgehalt des für die DNA-Extraktion verwendeten Gewebes ab. Am Beispiel der MGMT-Promotermethylierung beim Glioblastom (siehe Abschnitt 3.1) konnte gezeigt werden, dass der Tumorzellgehalt stark variiert. Die qualitative Interpretation der MGMT-Promotermethylierung mittels Pyrosequenzierung und üblicher Grenzwerte stellte sich als weitgehend robust heraus, während die quantitative Interpretation, welche einige Autoren ebenfalls prognostisch werten, stark abhängig vom Tumorzellgehalt, so dass das Testergebnis auch ein Surrogatmarker desselbigen ist. In Glioblastomen wird der Tumorzellgehalt maßgeblich durch die Infiltration von Immunzellen, v.a. Makrophagen und Mikroglia, mitbestimmt. In der Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass Immuninfiltration wiederum ein unabhängiger prognostischer Faktor ist.

Zusammenfassend zeigt sich ein komplexes Zusammenspiel zwischen Faktoren der zellulären Heterogenität von Tumoren und den Testergebnissen vieler Methoden, die aktuell in der klinischen Routine eingesetzt werden. Einzelzell- und *in situ*-Methoden können die intrazelluläre Heterogenität berücksichtigen, solange sie die relevanten Zellpopulationen unterscheiden können. Klassische histologische Methoden einschließlich der Immunhistochemie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) sind hier geeignet, jedoch ist beispielsweise die histologische Abschätzung des Tumorzellgehalts

anhand des HE-Schnitts ungenau (Aran et al., 2015). Die Einzelzell-RNA-Sequenzierung (scRNA-seq) birgt großes Potential zur Differenzierung und Phänotypisierung von Tumoren, ist jedoch gegenwärtig zu aufwendig für die klinische Routineanwendung. Der Tumorzellgehalt stellt jedoch einen wichtigen Kontrollparameter für die Interpretation molekularer Befunde im Rahmen spezialisierter Tumorkonferenzen dar (Heining et al., 2017; Ortiz et al., 2016).

4.2. Gezielte Therapie, funktionelle Heterogenität und Therapieresistenz

Aufgrund der hohen Prävalenz von EGFR-Amplifikationen beim Glioblastom sind zahlreiche Studien zur gezielten Therapie durchgeführt worden. Die Ergebnisse bisher sämtlicher Phase III-Studien zur Wirksamkeit von EGFR-Inhibitoren (Brandes et al., 2008; Eskilsson et al., 2018) waren jedoch negativ. Bei frühen Studien mögen fehlende Selektion von Patienten mit nachgewiesener Amplifikation von EGFR noch eine eventuelle Wirksamkeit maskiert haben. Auch kommen in Glioblastomen vorwiegend strukturelle Veränderungen der extrazellulären Domänen von EGFR vor, welche zu einer konstitutionellen Aktivierung führen, wohingegen in beispielsweise beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom Mutationen der Kinase-Domäne dominieren. EGFR-Inhibitoren wie Erlotinib inhibieren die Aktivierung der Kinase und zeigen bereits *in vitro* keine Wirksamkeit bei Glioblastomen (Vivanco et al., 2012). Doch auch aktuelle Studien mit strenger Selektion und modernen Wirkstoffen jenseits der ersten Generation von EGFR-Inhibitoren konnten keine Überlebensvorteile nachweisen (Touat et al., 2017).

Die hier vorgestellte Arbeit zu phänotypischen Unterschieden zwischen *EGFR*-Wildtyp und vIII-Mutante (siehe Abschnitt 3.3) eröffnet einen weiteren möglichen Resistenzmechanismus, der in der funktionellen intratumoralen Heterogenität von EGFR zu verorten ist. Diese und andere Arbeiten (Bonavia et al., 2012; Eskilsson et al., 2016) konnten zeigen, dass Amplifikationen des EGFR-Wildtyps ein proinvasives Tumorwachstum fördert, wohingegen die EGFRvIII-Variante zu vermehrter Angiogenese führt. Dies mag unter dem Druck einer (selektiven) Therapie zu einer Selektion des jeweils anderen Phänotypen führen. *In situ* Methoden haben schon früh eine Heterogenität auf dem Level der Amplifikation nachweisen können. In einem einzelnen Tumor koexistieren Zellen mit und ohne *EGFR*-Amplifikation sowie Amplifikation von *PGFRA*, einem weiteren Rezeptor-Tyrosinkinase. Darüber hinaus scheint EGFRvIII innerhalb EGFR-amplifizierten Tumorzellen häufig subklonal (Brennan et al., 2013; O'Rourke et al., 2017) zu sein und eine EGFR-gerichtete Therapie kann zu einer dynamischen Regulation von EGFR(vIII)-Amplifikationen führen (Nathanson et al., 2014).

Zusammenfassend zeigt sich am Beispiel der EGFR-gerichteten Therapie ein komplexes Zusammenspiel zahlreicher Faktoren primärer und erworbener Resistenz. Die Heterogenität von

EGFR-Alterationen prägt auch die phänotypische Vielfalt von Glioblastomen durch differentielle Mediation von Invasion und Angiogenese.

4.3. Entitätenbildung und Diagnosestellung in der Neuroonkologie

Die Schwächen einer rein histologischen Diagnosestellung von Hirntumoren wird an den Arbeiten zur molekularen Heterogenität von Astroblastomen illustriert (siehe Abschnitt 3.4). In einer Serie dieser seltenen Entität bei Erwachsenen konnte gezeigt werden, dass eine Reihe molekular gut definierter Entitäten histologisch ähnlich oder identisch imponieren können. Dazu gehörten in dieser Serie insbesondere Glioblastome und pleomorphe Xanthoastrozytome. Dahingegen fand sich in dieser adulten Serie nur ein einzelner Fall eines höhergradigen neuroepithelialen Tumors mit MN1-Alteration (Sturm et al., 2016), das als häufigstes molekulares Korrelat von Tumoren mit astroblastärer Histologie (bei Kindern und Jugendlichen) gilt. Diese Ergebnisse decken sich mit mehreren anderen Serien zur molekularen Charakterisierung von Astroblastomen, welche übereinstimmend bei Kindern vorwiegend MN1-alterierte Tumoren und eine Reklassifikation adulter Astroblastome in Entitäten mit Häufung von BRAF- oder MAPK-Signalweg-Mutationen beschreiben (Bale et al., 2016; Hirose et al., 2018; Lehman et al., 2017; Lehman et al., 2019; Wood et al., 2018). Für zukünftige Revisionen der WHO-Klassifikation von ZNS-Tumoren wird bereits eine integrierte Definition des Astroblastoms mit zwingendem Nachweis einer MN1-Alteration diskutiert (Louis et al., 2020).

Die Diskrepanz in histomorphologischen versus molekularen Ansätzen zur Definition von Tumorentitäten wird an diesem Beispiel deutlich. Das Spektrum der Divergenz von Histomorphologie und molekularer Identität lässt sich vereinfacht wie folgt verallgemeinern:

- histologisch homogen, molekular heterogen (1:n)
z.B. *Glioblastom, IDH-Wildtyp vs. diffuses Mittelliniengliom, H3 K27M-mutiert*
- histologisch heterogen, molekular homogen (n:1)
z.B. *anaplastisches Astrozytom mit piloiden Eigenschaften (Reinhardt et al., 2018)*
- histologisch heterogen, molekular heterogen (n:n)
z.B. *Meningeome (Sahm et al., 2017)*

Diese Beziehungen werfen Fragen hinsichtlich der Nomenklatur und Taxonomie von Hirntumoren auf und haben bereits zu relevanten Neudefinitionen von Entitäten geführt, z.B. der diffusen Gliome. Von besonderer Bedeutung sind die klinischen Konsequenzen, die aus diesem Wissen hervorgehen. Die Reklassifikation histologisch unscharfer in histomolekular distinkte Entitäten hat retrospektiv Konsequenzen für die Interpretation von klinischen Studien. Beispielsweise sind für Randomisierungen

in Therapiestudien niedriggradiger Gliome vor Berücksichtigung von IDH-Status und 1p/19q-Kodeletion erhebliche Verzerrungen möglich, so dass die Interpretation dieser Daten, welche auch Grundlage der aktuellen Behandlungsleitlinien sind, in Kenntnis der aktuellen Entitätendefinition erheblich eingeschränkt ist. Die immer präzisere Differenzierung von Entitäten ist jedoch auch eine Herausforderung für das Design zukünftiger klinischer Studien, da es bei zunehmender Binnenstratifizierung immer schwieriger wird, ausreichend große Patientenkollektive zu rekrutieren.

Die Klassifizierung von Hirntumoren anhand von Merkmalen der genomweiten DNA-Methylierung bietet hier das Potential eines systematisch neuen, zur Histologie komplementären diagnostischen Ansatzes. Die Eleganz der Methode besteht in der Möglichkeit einer hypothesefreien Klassifikation mit einem einzigen Test. Darüber hinaus können bereits erhobene Methylierungsprofile bei Vorliegen aktualisierter Referenzdaten, beispielsweise bei Neubeschreibung einer Entität, erneut klassifiziert werden (*in silico* Wiederholung des Tests). Gleichzeitig muss bei allen Formen supervidierten Lernens berücksichtigt werden, dass eine Klassifikation naturgemäss nur innerhalb der Referenzklassen erfolgen kann und der Algorithmus "blind" für nicht enthaltene Klassen, z.B. Nicht-ZNS-Tumore oder gar nichtneoplastische Differenzialdiagnosen, ist.

In der vorliegenden Arbeit wird die Implementierung der methylierungsbasierten Klassifikation mittels Nanopore-Sequenzierung anstelle der bisher üblichen Hybridisierungs-Microarrays beschrieben (siehe Abschnitt 3.5). Diese neue Sequenzieretechnologie erlaubt eine sehr schnelle und kostengünstige Testung und kann auf identische Referenzdaten zur Klassifikation (Capper et al., 2018) zurückgreifen. Die Testdauer kann dadurch von > 1 Woche auf unter 24 Stunden erheblich reduziert werden. Darüber hinaus können Kopienzahlveränderungen und genomische Bruchpunkte identifiziert werden. Somit sind Szenarien einer Integration der Methylomdiagnostik zur prätherapeutischen Diagnosesicherung, Identifikation therapeutischer Targets vor Beginn der Erstlinientherapie und zur raschen molekularen Stratifizierung für klinische Studien denkbar.

Zusammenfassend erlauben Signaturen intertumoraler molekularer Heterogenität eine präzise Neudefinition, Reklassifikation und Differenzierung von Hirntumorenentitäten. Gleichzeitig erfordert diese Reorganisation der Taxonomie von Hirntumoren eine Neubewertung klinischer Studienergebnisse einschließlich der Wirksamkeit von Therapien. Die methylierungsbasierte Klassifikation erlaubt eine Translation dieses Wissen in die klinische Diagnostik.

Zusätzlich erlaubt die skizzierte Methode eine Bruchpunktanalyse und *de novo* Assemblierung von extrachromosomalen DNA-Amplifikationen, welche durch bei der Nanoporen-Sequenzierung gewonnenen langen Reads bis > 100kb erleichtert wird. Damit wird auch eine Charakterisierung der oben skizzierten Heterogenität von strukturellen EGFR-Alterationen einschließlich Nachweis der EGFRvIII-Variante möglich.

Schließlich kann mittels bioinformatischer Methoden aus dem Kopienzahlprofil eine Modellbildung und Abschätzung von Ploidität und Tumorzellgehalt erfolgen (Carter et al., 2012; Poell et al., 2019), so dass mit einer einzelnen Methode eine Vielzahl der in dieser Arbeit diskutierten Parameter von Tumorerogenität erfasst werden kann.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Determinanten molekularer und zellulärer Heterogenität hinsichtlich ihrer Bedeutung für die klinische Neuroonkologie untersucht.

Tumorzellgehalt wurde als prognostischer Marker in Glioblastomen identifiziert und deutet auf eine klinisch bedeutsame Rolle der Immuninfiltration hin. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Untersuchung der Methylierung des MGMT-Promoters ausreichend robust gegenüber Schwankungen des Tumorzellgehalts ist.

Die Charakterisierung des Transkriptionsfaktors ZEB1 hingegen stellte sich nach Berücksichtigung der zellulären Komposition nicht weiter als prognostisch relevant heraus. Umfassende molekulare Charakterisierung seltener Astroblastome erlaubte eine Reklassifikation in bekannte, molekular gut definierte Entitäten und zeigt die Schwächen einer rein histologischen Diagnose auf.

Ein Zusammenhang zwischen EGFR-Amplifikationen, Invasion und Angiogenese in Glioblastomen konnte experimentell *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden.

Die methylierungsbasierte Klassifikation mittels Nanopore-Sequenzierung erlaubt eine zeitnahe und hypothesenfreie Identifikation von Tumoridentitäten aus nativen DNA-Proben durch Vergleich eines genomweiten Methylierungsprofil mit Referenzprofilen nahezu aller bekannter Hirntumoren unter Anwendung Methoden maschinellen Lernens. Darüber hinaus erlaubt die Methode die Bestimmung von Kopienzahlveränderungen und strukturelle Charakterisierung extrachromosomaler DNA-Amplifikationen.

Literaturverzeichnis

- Amankulor, N. M., Kim, Y., Arora, S., Kargl, J., Szulzewsky, F., Hanke, M., Margineantu, D. H., Rao, A., Bolouri, H., Delrow, J., Hockenbery, D., Houghton, A. M. & Holland, E. C. (2017). Mutant IDH1 regulates the tumor-associated immune system in gliomas. *Genes & Development*, *31*(8), 774–786. <https://doi.org/10.1101/gad.294991.116>
- Aran, D., Sirota, M. & Butte, A. J. (2015). Systematic pan-cancer analysis of tumour purity. *Nature Communications*, *6*, 8971. <https://doi.org/10.1038/ncomms9971>
- Bale, T. A., Abedalthagafi, M., Bi, W. L., Kang, Y. J., Merrill, P., Dunn, I. F., Dubuc, A., Charbonneau, S. K., Brown, L., Ligon, A. H., Ramkissoon, S. H. & Ligon, K. L. (2016). Genomic characterization of recurrent high-grade astroblastoma. *Cancer Genetics*, *209*(7-8), 321–330. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2016.06.002>
- Bell, R. J. A., Rube, H. T., Xavier-Magalhães, A., Costa, B. M., Mancini, A., Song, J. S. & Costello, J. F. (2016). Understanding TERT Promoter Mutations: A Common Path to Immortality. *Molecular Cancer Research*, *14*(4), 315–323. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0003>
- Bonavia, R., Inda, M. M., Vandenberg, S., Cheng, S.-Y., Nagane, M., Hadwiger, P., Tan, P., Sah, D. W. Y., Cavenee, W. K. & Furnari, F. B. (2012). EGFRvIII promotes glioma angiogenesis and growth through the NF- κ B, interleukin-8 pathway. *Oncogene*, *31*(36), 4054–4066. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.563>
- Brandes, A. A., Franceschi, E., Tosoni, A., Hegi, M. E. & Stupp, R. (2008). Epidermal growth factor receptor inhibitors in neuro-oncology: hopes and disappointments. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *14*(4), 957–960. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1810>
- Brennan, C. W., Verhaak, R. G. W., McKenna, A., Campos, B., Noushmehr, H., Salama, S. R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J. Z., Berman, S. H., Beroukhi, R., Bernard, B., Wu, C.-J., Genovese, G., Shmulevich, I., Barnholtz-Sloan, J., Zou, L., Vegesna, R., Shukla, S. A., . . . TCGA Research Network. (2013). The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell*, *155*(2), 462–477. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.034>
- Bunse, L., Pusch, S., Bunse, T., Sahm, F., Sanghvi, K., Friedrich, M., Alansary, D., Sonner, J. K., Green, E., Deumelandt, K., Kilian, M., Neftel, C., Uhlig, S., Kessler, T., von Landenberg, A., Berghoff, A. S., Marsh, K., Steadman, M., Zhu, D., . . . Platten, M. (2018). Suppression of antitumor T cell immunity by the oncometabolite (R)-2-hydroxyglutarate. *Nature Medicine*, *24*(8), 1192–1203. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0095-6>
- Cancer Genome Atlas Research Network, Brat, D. J., Verhaak, R. G. W., Aldape, K. D., Yung, W. K. A., Salama, S. R., Cooper, L. A. D., Rheinbay, E., Miller, C. R., Vitucci, M., Morozova, O., Robertson, A. G., Noushmehr, H., Laird, P. W., Cherniack, A. D., Akbani, R., Huse, J. T., Ciriello, G., Poisson, L. M., . . . Zhang, J. (2015). Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *The New England Journal of Medicine*, *372*(26), 2481–2498. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1402121>

- Capper, D., Jones, D. T. W., Sill, M., Hovestadt, V., Schrimpf, D., Sturm, D., Koelsche, C., Sahm, F., Chavez, L., Reuss, D. E., Kratz, A., Wefers, A. K., Huang, K., Pajtler, K. W., Schweizer, L., Stichel, D., Olar, A., Engel, N. W., Lindenberg, K., . . . Pfister, S. M. (2018). DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature*, *555*(7697), 469–474. <https://doi.org/10.1038/nature26000>
- Carter, S. L., Cibulskis, K., Helman, E., McKenna, A., Shen, H., Zack, T., Laird, P. W., Onofrio, R. C., Winckler, W., Weir, B. A., Beroukhi, R., Pellman, D., Levine, D. A., Lander, E. S., Meyerson, M. & Getz, G. (2012). Absolute quantification of somatic DNA alterations in human cancer. *Nature Biotechnology*, *30*(5), 413–421. <https://doi.org/10.1038/nbt.2203>
- Chen, Q., Boire, A., Jin, X., Valiente, M., Er, E. E., Lopez-Soto, A., Jacob, L. S., Patwa, R., Shah, H., Xu, K., Cross, J. R. & Massagué, J. (2016). Carcinoma–astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer. *Nature*, *533*(7604), 493–498. <https://doi.org/10.1038/nature18268>
- de Carvalho, A. C., Kim, H., Poisson, L. M., Winn, M. E., Mueller, C., Cherba, D., Koeman, J., Seth, S., Protopopov, A., Felicella, M., Zheng, S., Multani, A., Jiang, Y., Zhang, J., Nam, D.-H., Petricoin, E. F., Chin, L., Mikkelsen, T. & Verhaak, R. G. W. (2018). Discordant inheritance of chromosomal and extrachromosomal DNA elements contributes to dynamic disease evolution in glioblastoma. *Nature Genetics*, *50*(5), 708–717. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0105-0>
- Dunn, J., Baborie, A., Alam, F., Joyce, K., Moxham, M., Sibson, R., Crooks, D., Husband, D., Shenoy, A., Brodbelt, A., Wong, H., Liloglou, T., Haylock, B. & Walker, C. (2009). Extent of MGMT promoter methylation correlates with outcome in glioblastomas given temozolomide and radiotherapy. *British Journal of Cancer*, *101*(1), 124–131. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605127>
- Eckel-Passow, J. E., Lachance, D. H., Molinaro, A. M., Walsh, K. M., Decker, P. A., Sicotte, H., Pekmezci, M., Rice, T., Kosel, M. L., Smirnov, I. V., Sarkar, G., Caron, A. A., Kollmeyer, T. M., Praska, C. E., Chada, A. R., Halder, C., Hansen, H. M., McCoy, L. S., Bracci, P. M., . . . Jenkins, R. B. (2015). Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. *The New England Journal of Medicine*, *372*(26), 2499–2508. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1407279>
- Eskilsson, E., Røslund, G. V., Solecki, G., Wang, Q., Harter, P. N., Graziani, G., Verhaak, R. G. W., Winkler, F., Bjerkvig, R. & Miletic, H. (2018). EGFR heterogeneity and implications for therapeutic intervention in glioblastoma. *Neuro-Oncology*, *20*(6), 743–752. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now191>
- Eskilsson, E., Rosland, G. V., Talasila, K. M., Knappskog, S., Keunen, O., Sottoriva, A., Foerster, S., Solecki, G., Taxt, T., Jirik, R., Fritah, S., Harter, P. N., Vålk, K., Al Hossain, J., Joseph, J. V., Jahedi, R., Saed, H. S., Piccirillo, S. G., Spiteri, I., . . . Miletic, H. (2016). EGFRvIII mutations can emerge as late and heterogenous events in glioblastoma development and promote angiogenesis through Src activation. *Neuro-Oncology*, *18*(12), 1644–1655. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now113>
- Furnari, F. B., Cloughesy, T. F., Cavenee, W. K. & Mischel, P. S. (2015). Heterogeneity of epidermal growth factor receptor signalling networks in glioblastoma. *Nature Reviews Cancer*, *15*(5), 302–310. <https://doi.org/10.1038/nrc3918>
- George, J., Lim, J. S., Jang, S. J., Cun, Y., Ozretić, L., Kong, G., Leenders, F., Lu, X., Fernández-Cuesta, L., Bosco, G., Müller, C., Dahmen, I., Jahchan, N. S., Park, K.-S., Yang, D., Karnezis, A. N., Vaka, D., Torres, A., Wang, M. S., . . . Thomas, R. K. (2015). Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*, *524*(7563), 47–53. <https://doi.org/10.1038/nature14664>

- Gerlinger, M., Rowan, A. J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., Tarpey, P., Varela, I., Phillimore, B., Begum, S., McDonald, N. Q., Butler, A., Jones, D., Raine, K., Latimer, C., Santos, C. R., . . . Swanton, C. (2012). Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *The New England Journal of medicine*, *366*(10), 883–892. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1113205>
- Hambardzumyan, D., Gutmann, D. H. & Kettenmann, H. (2015). The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nature Neuroscience*, *19*(1), 20–27. <https://doi.org/10.1038/nn.4185>
- Heining, C., Horak, P., Gröschel, S., Glimm, H. & Fröhling, S. (2017). Personalisierte Medizin: Strukturen, Tumorboards, Visionen. *Forum*, *3*(32), 208–216. <https://doi.org/10.1007/s12312-017-0249-3>
- Hirose, T., Nobusawa, S., Sugiyama, K., Amatya, V. J., Fujimoto, N., Sasaki, A., Mikami, Y., Kakita, A., Tanaka, S. & Yokoo, H. (2018). Astroblastoma: a distinct tumor entity characterized by alterations of the X chromosome and MN1 rearrangement. *Brain Pathology*, *28*(5), 684–694. <https://doi.org/10.1111/bpa.12565>
- Hovestadt, V., Remke, M., Kool, M., Pietsch, T., Northcott, P. A., Fischer, R., Cavalli, F. M. G., Ramaswamy, V., Zapatka, M., Reifenberger, G., Rutkowski, S., Schick, M., Bewerunge-Hudler, M., Korshunov, A., Lichter, P., Taylor, M. D., Pfister, S. M. & Jones, D. T. W. (2013). Robust molecular subgrouping and copy-number profiling of medulloblastoma from small amounts of archival tumour material using high-density DNA methylation arrays. *Acta Neuropathologica*, *125*(6), 913–916. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1126-5>
- Hsu, C.-Y., Ho, H.-L., Lin, S.-C., Chang-Chien, Y.-C., Chen, M.-H., Hsu, S. P.-C., Yen, Y.-S., Guo, W.-Y. & Ho, D. M.-T. (2015). Prognosis of glioblastoma with faint MGMT methylation-specific PCR product. *Journal of Neuro-Oncology*, *122*(1), 179–188. <https://doi.org/10.1007/s11060-014-1701-1>
- Hussain, F., Horbinski, C. M., Chmura, S. J., Yamini, B. & Lukas, R. V. (2018). Response to BRAF/MEK Inhibition After Progression With BRAF Inhibition in a Patient With Anaplastic Pleomorphic Xanthoastrocytoma. *The Neurologist*, *23*(5), 163–166. <https://doi.org/10.1097/NRL.000000000000194>
- Jones, D. T. W., Hutter, B., Jäger, N., Korshunov, A., Kool, M., Warnatz, H.-J., Zichner, T., Lambert, S. R., Ryzhova, M., Quang, D. A. K., Fontebasso, A. M., Stütz, A. M., Hutter, S., Zuckermann, M., Sturm, D., Gronych, J., Lasitschka, B., Schmidt, S., Seker-Cin, H., . . . International Cancer Genome Consortium PedBrain Tumor Project. (2013). Recurrent somatic alterations of FGFR1 and NTRK2 in pilocytic astrocytoma. *Nature Genetics*, *45*(8), 927–932. <https://doi.org/10.1038/ng.2682>
- Kaffes, I., Szulzewsky, F., Chen, Z., Herting, C. J., Gabanic, B., Vega, J. E. V., Shelton, J., Switchenko, J. M., Ross, J. L., McSwain, L. F., Huse, J. T., Westermarck, B., Nelander, S., Forsberg-Nilsson, K., Uhrbom, L., Maturi, N. P., Cimino, P. J., Holland, E. C., Kettenmann, H., . . . Hambardzumyan, D. (2019). Human Mesenchymal glioblastomas are characterized by an increased immune cell presence compared to Proneural and Classical tumors. *Oncolmmunology*, *8*(11), e1655360. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1655360>
- Kaley, T., Touat, M., Subbiah, V., Hollebecque, A., Rodon, J., Lockhart, A. C., Keedy, V., Bielle, F., Hofheinz, R.-D., Joly, F., Blay, J.-Y., Chau, I., Puzanov, I., Raje, N. S., Wolf, J., DeAngelis, L. M., Makrutzki, M., Riehl, T., Pitcher, B., . . . Hyman, D. M. (2018). BRAF Inhibition in BRAFV600-Mutant Gliomas: Results From the VE-BASKET Study. *Journal of Clinical Oncology*, *36*(35), 3477–3484. <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.78.9990>

- Killela, P. J., Reitman, Z. J., Jiao, Y., Bettegowda, C., Agrawal, N., Diaz, L. A., Friedman, A. H., Friedman, H., Gallia, G. L., Giovannella, B. C., Grollman, A. P., He, T.-C., He, Y., Hruban, R. H., Jallo, G. I., Mandahl, N., Meeker, A. K., Mertens, F., Netto, G. J., . . . Yan, H. (2013). TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(15), 6021–6026. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303607110>
- Klein, R. & Roggendorf, W. (2001). Increased microglia proliferation separates pilocytic astrocytomas from diffuse astrocytomas: a double labeling study. *Acta Neuropathologica*, *101*(3), 245–248. <https://doi.org/10.1007/s004010000286>
- Koelsche, C., Sahm, F., Capper, D., Reuss, D., Sturm, D., Jones, D. T. W., Kool, M., Northcott, P. A., Wiestler, B., Böhmer, K., Meyer, J., Mawrin, C., Hartmann, C., Mittelbronn, M., Platten, M., Brokinkel, B., Seiz, M., Herold-Mende, C., Unterberg, A., . . . von Deimling, A. (2013). Distribution of TERT promoter mutations in pediatric and adult tumors of the nervous system. *Acta Neuropathologica*, *126*(6), 907–915. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1195-5>
- Lehman, N. L., Hattab, E. M., Mobley, B. C., Usubaliev, A., Schniederjan, M. J., McLendon, R. E., Paulus, W., Rushing, E. J., Georgescu, M.-M., Couce, M., Dulai, M. S., Cohen, M. L., Pierson, C. R., Raisanen, J. M., Martin, S. E., Lehman, T. D., Lipp, E. S., Bonnini, J. M., Al-Abbadi, M. A., . . . Zhao, W. (2017). Morphological and molecular features of astroblastoma, including BRAFV600E mutations, suggest an ontological relationship to other cortical-based gliomas of children and young adults. *Neuro-Oncology*, *19*(1), 31–42. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now118>
- Lehman, N. L., Usubaliev, A., Lin, T., Allen, S. J., Tran, Q. T., Mobley, B. C., McLendon, R. E., Schniederjan, M. J., Georgescu, M.-M., Couce, M., Dulai, M. S., Raisanen, J. M., Al Abbadi, M., Palmer, C. A., Hattab, E. M. & Orr, B. A. (2019). Genomic analysis demonstrates that histologically-defined astroblastomas are molecularly heterogeneous and that tumors with MN1 rearrangement exhibit the most favorable prognosis. *Acta Neuropathologica Communications*, *7*(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0689-3>
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., Deimling, A. v., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P. & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, *131*(6), 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
- Louis, D. N., Wesseling, P., Aldape, K., Brat, D. J., Capper, D., Cree, I. A., Eberhart, C., Figarella-Branger, D., Fouladi, M., Fuller, G. N., Giannini, C., Haberler, C., Hawkins, C., Komori, T., Kros, J. M., Ng, H. K., Orr, B. A., Park, S.-H., Paulus, W., . . . Ellison, D. W. (2020). cIMPACT-NOW update 6: new entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading. *Brain Pathology*. <https://doi.org/10.1111/bpa.12832>
- Maley, C. C., Aktipis, A., Graham, T. A., Sottoriva, A., Boddy, A. M., Janiszewska, M., Silva, A. S., Gerlinger, M., Yuan, Y., Pienta, K. J., Anderson, K. S., Gatenby, R., Swanton, C., Posada, D., Wu, C.-I., Schiffman, J. D., Hwang, E. S., Polyak, K., Anderson, A. R. A., . . . Shibata, D. (2017). Classifying the evolutionary and ecological features of neoplasms. *Nature Reviews Cancer*, *17*(10), 605–619. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.69>
- Martinez-Lage, M., Lynch, T. M., Bi, Y., Cocito, C., Way, G. P., Pal, S., Haller, J., Yan, R. E., Ziober, A., Nguyen, A., Kandpal, M., O'Rourke, D. M., Greenfield, J. P., Greene, C. S., Davuluri, R. V. & Dahmane, N. (2019). Immune landscapes associated with different glioblastoma molecular

- subtypes. *Acta Neuropathologica Communications*, 7(1), 203. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0803-6>
- Moran, S., Martínez-Cardús, A., Sayols, S., Musulén, E., Balañá, C., Estival-Gonzalez, A., Moutinho, C., Heyn, H., Diaz-Lagares, A., de Moura, M. C., Stella, G. M., Comoglio, P. M., Ruiz-Miró, M., Matias-Guiu, X., Pazo-Cid, R., Antón, A., Lopez-Lopez, R., Soler, G., Longo, F., . . . Esteller, M. (2016). Epigenetic profiling to classify cancer of unknown primary: a multicentre, retrospective analysis. *The Lancet. Oncology*, 17(10), 1386–1395. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30297-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30297-2)
- Morantz, R. A., Wood, G. W., Foster, M., Clark, M. & Gollahon, K. (1979). Macrophages in experimental and human brain tumors. Part 2: studies of the macrophage content of human brain tumors. *Journal of Neurosurgery*, 50(3), 305–311. <https://doi.org/10.3171/jns.1979.50.3.0305>
- Morton, A. R., Dogan-Artun, N., Faber, Z. J., MacLeod, G., Bartels, C. F., Piazza, M. S., Allan, K. C., Mack, S. C., Wang, X., Gimple, R. C., Wu, Q., Rubin, B. P., Shetty, S., Angers, S., Dirks, P. B., Sallari, R. C., Lupien, M., Rich, J. N. & Scacheri, P. C. (2019). Functional Enhancers Shape Extrachromosomal Oncogene Amplifications. *Cell*, 179(6), 1330–1341.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.039>
- Nathanson, D. A., Gini, B., Mottahedeh, J., Visnyei, K., Koga, T., Gomez, G., Eskin, A., Hwang, K., Wang, J., Masui, K., Paucar, A., Yang, H., Ohashi, M., Zhu, S., Wykosky, J., Reed, R., Nelson, S. F., Cloughesy, T. F., James, C. D., . . . Mischel, P. S. (2014). Targeted Therapy Resistance Mediated by Dynamic Regulation of Extrachromosomal Mutant EGFR DNA [Publisher: American Association for the Advancement of Science Section: Report]. *Science*, 343(6166), 72–76. <https://doi.org/10.1126/science.1241328>
- O'Rourke, D. M., Nasrallah, M. P., Desai, A., Melenhorst, J. J., Mansfield, K., Morrisette, J. J. D., Martinez-Lage, M., Brem, S., Maloney, E., Shen, A., Isaacs, R., Mohan, S., Plesa, G., Lacey, S. F., Navenot, J.-M., Zheng, Z., Levine, B. L., Okada, H., June, C. H., . . . Maus, M. V. (2017). A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Science Translational Medicine*, 9(399), eaaa0984. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa0984>
- Orozco, J. I. J., Knijnenburg, T. A., Manughian-Peter, A. O., Salomon, M. P., Barkhoudarian, G., Jalas, J. R., Wilmott, J. S., Hothi, P., Wang, X., Takasumi, Y., Buckland, M. E., Thompson, J. F., Long, G. V., Cobbs, C. S., Shmulevich, I., Kelly, D. F., Scolyer, R. A., Hoon, D. S. B. & Marzese, D. M. (2018). Epigenetic profiling for the molecular classification of metastatic brain tumors. *Nature Communications*, 9(1), 4627. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06715-y>
- Ortiz, M. V., Kobos, R., Walsh, M., Slotkin, E. K., Roberts, S., Berger, M. F., Hameed, M., Solit, D., Ladanyi, M., Shukla, N. & Kentsis, A. (2016). Integrating Genomics Into Clinical Pediatric Oncology Using the Molecular Tumor Board at the Memorial Sloan Kettering Cancer Center. *Pediatric blood & cancer*, 63(8), 1368–1374. <https://doi.org/10.1002/pbc.26002>
- Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C.-H., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.-M., Gallia, G. L., Olivi, A., McLendon, R., Rasheed, B. A., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, D. A., Tekleab, H., Diaz, L. A., Jr, . . . Kinzler, K. W. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*, 321(5897), 1807–1812. <https://doi.org/10.1126/science.1164382>

- Poell, J. B., Mendeville, M., Sie, D., Brink, A., Brakenhoff, R. H. & Ylstra, B. (2019). ACE: absolute copy number estimation from low-coverage whole-genome sequencing data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *35*(16), 2847–2849. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty1055>
- Reinhardt, A., Stichel, D., Schrimpf, D., Sahm, F., Korshunov, A., Reuss, D. E., Koelsche, C., Huang, K., Wefers, A. K., Hovestadt, V., Sill, M., Gramatzki, D., Felsberg, J., Reifenberger, G., Koch, A., Thomale, U.-W., Becker, A., Hans, V. H., Prinz, M., . . . Capper, D. (2018). Anaplastic astrocytoma with piloid features, a novel molecular class of IDH wildtype glioma with recurrent MAPK pathway, CDKN2A/B and ATRX alterations. *Acta Neuropathologica*, *136*(2), 273–291. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1837-8>
- Sahm, F., Schrimpf, D., Stichel, D., Jones, D. T. W., Hielscher, T., Schefzyk, S., Okonechnikov, K., Koelsche, C., Reuss, D. E., Capper, D., Sturm, D., Wirsching, H.-G., Berghoff, A. S., Baumgarten, P., Kratz, A., Huang, K., Wefers, A. K., Hovestadt, V., Sill, M., . . . von Deimling, A. (2017). DNA methylation-based classification and grading system for meningioma: a multicentre, retrospective analysis. *The Lancet Oncology*, *18*(5), 682–694. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30155-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30155-9)
- Snuderl, M., Fazlollahi, L., Le, L. P., Nitta, M., Zhelyazkova, B. H., Davidson, C. J., Akhavanfard, S., Cahill, D. P., Aldape, K. D., Betensky, R. A., Louis, D. N. & Iafrate, A. J. (2011). Mosaic amplification of multiple receptor tyrosine kinase genes in glioblastoma. *Cancer cell*, *20*(6), 810–817. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.11.005>
- Stichel, D., Ebrahimi, A., Reuss, D., Schrimpf, D., Ono, T., Shirahata, M., Reifenberger, G., Weller, M., Hänggi, D., Wick, W., Herold-Mende, C., Westphal, M., Brandner, S., Pfister, S. M., Capper, D., Sahm, F. & von Deimling, A. (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 Neuropathologica*, *136*(5), 793–803. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1905-0>
- Stucklin, A. S. G., Ryall, S., Fukuoka, K., Zapotocky, M., Lassaletta, A., Li, C., Bridge, T., Kim, B., Arnoldo, A., Kowalski, P. E., Zhong, Y., Johnson, M., Li, C., Ramani, A. K., Siddaway, R., Nobre, L. F., Antonellis, P. d., Dunham, C., Cheng, S., . . . Hawkins, C. (2019). Alterations in ALK/ROS1/NTRK/MET drive a group of infantile hemispheric gliomas [Number: 1 Publisher: Nature Publishing Group]. *Nature Communications*, *10*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12187-5>
- Sturm, D., Orr, B. A., Toprak, U. H., Hovestadt, V., Jones, D. T. W., Capper, D., Sill, M., Buchhalter, I., Northcott, P. A., Leis, I., Ryzhova, M., Koelsche, C., Pfaff, E., Allen, S. J., Balasubramanian, G., Worst, B. C., Pajtler, K. W., Brabetz, S., Johann, P. D., . . . Kool, M. (2016). New Brain Tumor Entities Emerge from Molecular Classification of CNS-PNETs. *Cell*, *164*(5), 1060–1072. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.015>
- Suzuki, H., Aoki, K., Chiba, K., Sato, Y., Shiozawa, Y., Shiraiishi, Y., Shimamura, T., Niida, A., Motomura, K., Ohka, F., Yamamoto, T., Tanahashi, K., Ranjit, M., Wakabayashi, T., Yoshizato, T., Kataoka, K., Yoshida, K., Nagata, Y., Sato-Otsubo, A., . . . Ogawa, S. (2015). Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. *Nature Genetics*, *47*(5), 458–468. <https://doi.org/10.1038/ng.3273>
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J. & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*, *139*(5), 871–890. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>

- Touat, M., Idbaih, A., Sanson, M. & Ligon, K. L. (2017). Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 28(7), 1457–1472. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx106>
- Touat, M., Younan, N., Euskirchen, P., Fontanilles, M., Mokhtari, K., Dehais, C., Tilleul, P., Rahimian-Aghda, A., Resnick, A., Gimenez-Roqueplo, A.-P., Blons, H., Hoang-Xuan, K., Delattre, J.-Y., Idbaih, A., Laurent-Puig, P. & Sanson, M. (2019). Successful Targeting of an ATG7-RAF1 Gene Fusion in Anaplastic Pleomorphic Xanthoastrocytoma With Leptomeningeal Dissemination. *JCO Precision Oncology*, (3), 1–7. <https://doi.org/10.1200/PO.18.00298>
- Venkatesh, H. S., Johung, T. B., Caretti, V., Noll, A., Tang, Y., Nagaraja, S., Gibson, E. M., Mount, C. W., Polepalli, J., Mitra, S. S., Woo, P. J., Malenka, R. C., Vogel, H., Bredel, M., Mallick, P. & Monje, M. (2015). Neuronal Activity Promotes Glioma Growth through Neuroligin-3 Secretion. *Cell*, 161(4), 803–816. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.012>
- Verhaak, R. G. W., Bafna, V. & Mischel, P. S. (2019). Extrachromosomal oncogene amplification in tumour pathogenesis and evolution. *Nature Reviews Cancer*, 19(5), 283–288. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0128-6>
- Verhaak, R. G. W., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., Miller, C. R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J. P., Alexe, G., Lawrence, M., O’Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B. A., Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., . . . Hayes, D. N. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer cell*, 17(1), 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>
- Vivanco, I., Robins, H. I., Rohle, D., Campos, C., Grommes, C., Nghiemphu, P. L., Kubek, S., Oldrini, B., Chheda, M. G., Yannuzzi, N., Tao, H., Zhu, S., Iwanami, A., Kuga, D., Dang, J., Pedraza, A., Brennan, C. W., Heguy, A., Liau, L. M., . . . Mellinghoff, I. K. (2012). Differential sensitivity of glioma- versus lung cancer-specific EGFR mutations to EGFR kinase inhibitors. *Cancer Discovery*, 2(5), 458–471. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0284>
- Wang, Q., Hu, B., Hu, X., Kim, H., Squatrito, M., Scarpace, L., deCarvalho, A. C., Lyu, S., Li, P., Li, Y., Barthel, F., Cho, H. J., Lin, Y.-H., Satani, N., Martinez-Ledesma, E., Zheng, S., Chang, E., Sauv e, C.-E. G., Olar, A., . . . Verhaak, R. G. W. (2017). Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell*, 32(1), 42–56.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.06.003>
- Wellner, U., Schubert, J., Burk, U. C., Schmalhofer, O., Zhu, F., Sonntag, A., Waldvogel, B., Vannier, C., Darling, D., zur Hausen, A., Brunton, V. G., Morton, J., Sansom, O., Sch uler, J., Stemmler, M. P., Herzberger, C., Hopt, U., Keck, T., Brabletz, S. & Brabletz, T. (2009). The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nature cell biology*, 11(12), 1487–1495. <https://doi.org/10.1038/ncb1998>
- Wick, W., Weller, M., van den Bent, M., Sanson, M., Weiler, M., von Deimling, A., Plass, C., Hegi, M., Platten, M. & Reifenberger, G. (2014). MGMT testing—the challenges for biomarker-based glioma treatment. *Nature Reviews Neurology*, 10(7), 372–385. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2014.100>
- Wood, M. D., Tihan, T., Perry, A., Chacko, G., Turner, C., Pu, C., Payne, C., Yu, A., Bannykh, S. I. & Solomon, D. A. (2018). Multimodal molecular analysis of astroblastoma enables reclassification of most cases into more specific molecular entities. *Brain Pathology*, 28(2), 192–202. <https://doi.org/10.1111/bpa.12561>
- Wu, G., Diaz, A. K., Paugh, B. S., Rankin, S. L., Ju, B., Li, Y., Zhu, X., Qu, C., Chen, X., Zhang, J., Easton, J., Edmonson, M., Ma, X., Lu, C., Nagahawatte, P., Hedlund, E., Rusch, M., Pounds, S.,

Lin, T., ... Baker, S. J. (2014). The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma. *Nature Genetics*, 46(5), 444–450. <https://doi.org/10.1038/ng.2938>

A. Danksagung

Diese Arbeit ist das Ergebnis gemeinsamer Ideen, interdisziplinärer Zusammenarbeit und Anstrengung vieler Beteiligten. Dazu möchte ich meinen Kolleginnen und Kollegen aus (experimenteller) Neurologie, Neurochirurgie, Neuropathologie und Bioinformatik in Berlin und Paris sowie allen Kollaborationspartnern danken.

Prof. Dr. Matthias Endres und Prof. Dr. Christoph Harms danke ich für die stetige Förderung und den gestalterischen Freiraum. Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Ahmed Idbaih und Prof. Dr. Jean-Yves Delattre für eine inspirierende und wertvolle Post Doc-Zeit.

Vor allem aber möchte ich meiner Familie für den Rückhalt und die Unterstützung weit über diese Arbeit hinaus danken.

B. Eidesstattliche Erklärung

gemäß § 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