

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

Habilitationsschrift

Die molekulare Neuropathologie: Moderne Diagnostik der Krankheiten des Nervensystems und der Skelettmuskulatur

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Neuropathologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Josefine Radke

Eingereicht: Februar 2021

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Markus J. Riemenschneider

2. Gutachter: Prof. Dr. Karl H. Plate

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	5
1. Einleitung	8
1.1. Histologische und molekulare Diagnostik in der Neuropathologie.....	8
1.1.1. Immunhistochemie.....	8
1.1.2. Molekularpathologie	9
1.2. Neuroonkologische Erkrankungen.....	10
1.2.1. Primäre Hirntumore	11
1.2.1.1. Glioblastom.....	12
1.2.1.1.1. Glioblastom, IDH-Wildtyp.....	13
1.2.1.1.2. Glioblastom, IDH-mutiert.....	14
1.2.1.1.3. MGMT: Prädiktiver und prognostischer Marker im Glioblastom	16
1.2.2. Sekundäre Hirntumore.....	18
1.3. Neuromuskuläre Erkrankungen.....	20
1.3.1. Myopathien	21
1.3.1.1. Dermatomyositis	22
1.4. Zielsetzung.....	23
2. Eigene Arbeiten.....	24
2.1. Zusammenfassung Publikation Nummer eins:	24
2.1.1. Die Inhibierung von Apelin (APLN) und seines Rezeptors (APLNR) verbessert die Effizienz der antiangiogenen, gegen VEGFA gerichteten Therapie beim Glioblastom und vermindert die Tumorzellinvasion.....	24
2.2. Zusammenfassung Publikation Nummer zwei:.....	42
2.2.1. Die Analyse des prädiktiven MGMT-Status in einer homogenen IDH-Wildtyp-Glioblastom-Kohorte.....	42
2.3. Zusammenfassung Publikation Nummer drei:	53
2.3.1. Die Expression von CD271 begünstigt die Migration von Tumorzellen des malignen Melanoms.	53
2.4. Zusammenfassung Publikation Nummer vier:	68
2.4.1. Die Erweiterung des nosologischen Spektrums der autophagischen vakuolären Myopathie (AVM)	68
2.5. Zusammenfassung Publikation Nummer fünf:	78
2.5.1. Die morphologische und molekulare Charakterisierung neuer, seltener Varianten der Dermatomyositis	78
3. Diskussion.....	90
4. Zusammenfassung	96
5. Literaturangaben.....	98

Danksagung	110
Erklärung.....	111

∞ Für TCR und ATR ∞

Abkürzungen

2-HG	2-Hydroxypentandisäure
ALK	<i>anaplastic lymphoma kinase</i>
αKG	alpha-Ketoglutarat
APLN	Apelin
APLNR	Apelin-Rezeptor
ATRX	<i>alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked</i>
AXL	Tyrosinkinase-Rezeptor AXL
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BRAF	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
BRAFi	BRAF-Inhibitor
CAM	<i>cancer-associated myositis</i>
CCNU	Chlorethyl-Cyclohexyl-Nitroso-Urea
CIMP	<i>glioma-CpG-island methylator phenotype</i>
CLN	<i>ceroid lipofuscinosis, neuronal</i>
cMRT	Kraniale Magnetresonanztomographie
c-Myc	<i>avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
cfDNA	<i>cell free DNA</i>
CpG	<i>5'-C-phosphate-G-3'</i>
CTC	<i>circulating tumor cell</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
CUP	<i>cancer of unknown primary</i>
CXCL10	<i>C-X-C motif chemokine 10</i>
CXCL12	<i>C-X-C motif chemokine 12</i>
CXCR4	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>
CXCR7	<i>C-X-C chemokine receptor type 7</i>

dBiSeq	direkte Bisulfit-Sequenzierung
DM	Dermatomyositis
DANN	<i>deoxyribonucleic acid</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinases</i>
Ets	<i>erythroblast transformation-specific</i>
GBM	Glioblastoma multiforme
Gy	Gray
H&E	Hämatoxylin & Eosin
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
IDH	Isocitratdehydrogenase
ISH	in-situ-Hybridisierung
KOF	Körperoberfläche
Mdm2	<i>mouse double minute 2 homolog</i>
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MGMT	<i>O⁶-methylguanine DNA methyltransferase</i>
MSP	methylierungsspezifische PCR
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
Mut	Mutiert
NCL	neuronal Ceroid-Lipofuszinose
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NGS	<i>next generation sequencing</i>
NOA	Neuroonkologische Arbeitsgemeinschaft
NSCLC	<i>non-small cell lung cancer</i>
NTRK	<i>neurotrophic receptor tyrosine kinase</i>
OS	<i>overall survival</i>

PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD-1	<i>programmed cell death 1</i>
PD-L1	<i>programmed cell death 1 ligand 1</i>
PFS	<i>progression-free survival</i>
PI3K	<i>phosphoinositide 3-kinases</i>
PKB/AKT	<i>protein kinase B</i>
PSQ	Pyrosequenzierung
PXA	Pleomorphes Xanthoastrozytom
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
RET	<i>rearranged during transfection</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROS1	<i>ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase</i>
SDF-1	<i>stromal cell-derived factor 1</i>
SWI/SNF	<i>SWItch/Sucrose non-fermentable</i>
TCF	<i>ternary complex factor</i>
TERT	<i>telomerase reverse transcriptase</i>
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitoren
TMZ	Temozolomid
TP53	<i>tumor protein p53</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT	Wildtyp
XMEA	<i>X-linked myopathy with excessive autophagy</i>
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1. Histologische und molekulare Diagnostik in der Neuropathologie

Die Neuropathologie ist ein eigenständiges Fachgebiet, welches sich mit den Erkrankungen des Nervensystems und der Skelettmuskulatur befasst. Es wird eine makroskopische und mikroskopische Beurteilung von Gewebeproben aus Gehirn, Rückenmark, peripheren Nerven und Skelettmuskulatur, vorgenommen. Die histologische Begutachtung erfolgt dabei an feinen Gewebeschnitten, die mit Hilfe konventioneller Färbungen, wie z.B. der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung) angefärbt werden (1).

Zur weiteren diagnostischen Einordnung erfolgen meist zusätzliche immunhistochemische und molekularpathologische Untersuchungen, die die Diagnose unterstützen sollen.

1.1.1. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie dient der Darstellung definierter gewebespezifischer Antigene. Sie ergänzt die konventionelle histologische Diagnostik. Verschiedene Zellen exprimieren spezifische nukleare, zytoplasmatische oder membranständige Proteine, die mit Hilfe verschiedener Antikörper markiert werden können. Die Antikörper binden an ein Antigen. Die so entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe können mit Hilfe einer Farbreaktion detektiert werden (2). Die Immunhistochemie findet in allen Teilbereichen der Neuropathologie Anwendung und dient in der Diagnostik primärer (hirneigener) und sekundärer Hirntumore der weiteren Einordnung hinsichtlich der Ursprungszelle bzw. des Ursprungsgewebes (3). Hirnmetastasen können so mit Bezug auf ihr Herkunftsorgan näher charakterisiert werden (4). Auch die proliferative Aktivität eines Tumors kann im Rahmen einer immunhistochemischen Markierung des Proliferationsmarkers Ki-67 näher untersucht werden (5). Des Weiteren dient die Immunhistochemie der Charakterisierung von entzündlichen Infiltraten und der Subtypisierung von Lymphomen (6). Auch hier werden die verschiedenen

immunphänotypischen Oberflächenmerkmale der Zellen markiert, was u.a. der Unterscheidung von B- und T-Zellen dient. Auch im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen spielt die Immunhistochemie eine entscheidende diagnostische Rolle: So lassen sich beispielsweise im Hirngewebe betroffener, verstorbener Patient*innen pathologische Proteinablagerungen nachweisen, die eine weitere Einordnung der jeweiligen neurodegenerativen Erkrankung erlauben (7). So finden sich etwa bei der Alzheimer-Erkrankung pathologische Ablagerungen von beta-Amyloid und Tau-Protein (7). Bei Patient*innen mit amyotropher Lateralsklerose (ALS) finden sich dagegen in den motorischen Nervenzellen pathologische Ablagerungen des TDP-43-Proteins (7).

Des Weiteren können durch die Immunhistochemie Patient*innen identifiziert werden, die von einer bestimmten Therapie im Rahmen einer malignen Erkrankung profitieren könnten. Dieses trifft z.B. auf die immunhistochemische Bestimmung von Östrogen- und HER2-Rezeptoren im Brustkrebs oder PD-L1 im malignen Melanom zu.

1.1.2. Molekularpathologie

Die molekularpathologische Diagnostik gewinnt vor allem im Rahmen der personalisierten Medizin an Bedeutung. Nach diesem Konzept werden die individuellen Mutationen eines Tumors analysiert und auf bestimmte Biomarker untersucht (8). Diese weiterführende molekulare Charakterisierung soll den Patient*innen im Sinne der personalisierten Medizin eine bestimmte, auf den Tumor gezielt zugeschnittene Therapie ermöglichen (8-11). Bei diesen Biomarkern kann es sich sowohl um bestimmte Mutationen als auch um eine (Über-) Expression bestimmter Gene handeln, z.B. im Rahmen einer Genfusion (11-14). Ziel des sogenannten „Tumorprofiling“ ist neben der Verlängerung des Gesamtüberlebens dabei auch die Minimierung von Nebenwirkungen (14). Neben entitätsspezifischen Medikamenten gewinnen entitätsübergreifende Substanzen zunehmend an Bedeutung. Die Wirkung der Medikamente hängt dabei also nicht von der Ursprungszelle, sondern vielmehr von den molekulargenetischen Veränderungen des Tumors ab (15, 16).

Es stehen verschiedene Techniken zur Detektion bestimmter Mutationen oder Genfusionen zur Verfügung. Bei der klassischen DNA-Sequenzierung nach Sanger, müssen die einzelnen Exons eines Gens zunächst mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert und anschließend analysiert werden (Kettenabbruch-Synthese). Die Sanger-Sequenzierung wird häufig in der Routineversorgung eingesetzt. Mit Hilfe sogenannter Next Generation Sequencing (NGS)-Technologien können mittlerweile zahlreiche Gene bzw. ganze Genome sequenziert werden. Diese Verfahren kommen bei der molekularen Charakterisierung von Tumoren, aber auch bei der Detektion bisher nicht identifizierter, pathogener Mutationen im Rahmen neurodegenerativer und neuromuskulärer Erkrankungen zum Einsatz.

Neben den genetischen Veränderungen, die die DNA- oder RNA-Sequenz betreffen, lassen sich mit Hilfe der Molekularpathologie auch epigenetische Veränderungen, wie etwa die DNA-Methylierung untersuchen. Die Hypermethylierung der DNA im Promotorbereich eines Gens kann dabei zu einer Inaktivierung der Genexpression führen. Der Nachweis einer Hypermethylierung eines bestimmten Promotorabschnitts kann auch durch eine Pyrosequenzierung untersucht werden. Eine genomweite Methylierungsanalyse kommt sowohl bei der diagnostischen Einordnung als auch bei weiteren Subtypisierungen von Hirntumoren zum Einsatz.

Im weiteren Verlauf der Arbeit soll exemplarisch auf verschiedene Erkrankungen aus den unterschiedlichen Teilbereichen der Neuropathologie eingegangen werden, die mit Hilfe immunhistochemischer und molekularer Untersuchungen charakterisiert werden, um die diagnostische Präzision zu erhöhen und ggf. therapeutische Targets zu identifizieren.

1.2. Neuroonkologische Erkrankungen

Maligne Tumore des zentralen Nervensystems (ZNS) umfassen Neoplasien des Gehirns und Rückenmarks. In Deutschland erkranken jedes Jahr ca. 7000 Patient*innen an einem Tumor des ZNS (17). Unterschieden werden primäre bzw. hirneigene von sekundären ZNS-Neoplasien (18, 19), wobei sekundäre Tumore, also Metastasen, weitaus häufiger auftreten.

Die Behandlung von malignen ZNS-Tumoren erfolgt interdisziplinär, in der Regel im Rahmen einer Kombination aus Chirurgie, Radio- und Chemotherapie (20-22). Nach dem Konzept der personalisierten Medizin werden die individuellen Mutationen des Tumors analysiert und sowohl bei primären als auch bei sekundären ZNS-Neoplasien auf bestimmte Biomarker untersucht (8).

1.2.1. Primäre Hirntumore

Als primäre Hirntumore werden Neoplasien bezeichnet, die aus dem Gewebe bzw. den Zellen des Gehirns oder Rückenmarks, dem sogenannten Neuroepithel, entstehen (18, 19). Primäre Hirntumore sind im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen selten (23). Sie können jedoch in jedem Lebensalter auftreten, sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern (24). Je nachdem, von welchem Gewebe bzw. von welchen Zellen diese Tumore ausgehen, werden verschiedene Hirntumorentitäten unterschieden. Sie lassen sich durch ihre Histologie und distinkte molekulare Veränderungen weiter einordnen. Die standardisierte Erkrankungsrate von Tumoren des ZNS betrug 2016 in Deutschland 5,9 für Frauen bzw. 7,6 für Männer pro 100.000 Einwohner (17) und ist damit etwa mit der Inzidenz von ZNS-Tumoren in den USA vergleichbar (19). Bei Kindern und Jugendlichen sind primäre Hirntumore im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen deutlich häufiger als bei Erwachsenen und mit 23,6% somit für nahezu jede vierte Krebserkrankung verantwortlich. ZNS-Tumore sind damit in dieser Altersgruppe die zweithäufigsten Malignome nach Leukämien mit 29,7% (17, 25).

Es gibt zahlreiche verschiedene Tumorentitäten, die im Rahmen der neuropathologischen Diagnostik histologisch und molekularpathologisch anhand der aktuellen, für die Tumore geltende WHO-Klassifizierung, der sogenannten „*WHO classification of tumors of the central nervous system*“ aus dem Jahr 2016 eingeordnet werden (18). Die WHO-Klassifizierung dient neben der Unterscheidung der Hirntumorentitäten auch deren Einordnung hinsichtlich ihrer Bösartigkeit. Neben den histologischen Kriterien spielen bestimmte genetische und epigenetische Veränderungen eine große Rolle. Sie werden analysiert und in die jeweilige Bewertung einbezogen.

ZNS-Tumore werden in vier Grade der Bösartigkeit eingeteilt, wobei es sich bei Grad I um gutartige, bei Grad II um eher (bzw. eingeschränkt) gutartige, bei Grad III um bösartige und bei Grad IV um sehr bösartige bzw. sehr aggressive Tumore handelt (18).

Bei den Gliomen handelt es sich um die größte Gruppe der primären Hirntumore. Sie machen ca. 60% aller primären Tumore des Gehirns und Rückenmarks aus (17). Zu dieser Gruppe gehören Astrozytome, Oligodendrogliome und Ependymome, wobei Astrozytome am häufigsten auftreten (17, 19). In der Gruppe der Astrozytome werden gutartige von bösartigen Tumoren unterschieden und laut der aktuellen WHO-Klassifikation histomorphologisch und molekulargenetisch in die WHO-Grade I bis IV eingeteilt (18). Davon entfallen ca. drei Viertel auf das Glioblastom (17), welches damit den häufigsten und bösartigsten hirneigenen Tumor darstellt (26-28).

1.2.1.1. Glioblastom

Glioblastome treten vor allem bei Erwachsenen und überwiegend in den Großhirnhemisphären auf (18). Der Altersgipfel liegt zwischen dem 45. und 70. Lebensjahr (29). Die Prognose hängt maßgeblich von den genetischen Veränderungen des Tumors ab. Die aktuell gültige WHO-Klassifikation von 2016 sieht eine Implementierung der molekularen Veränderungen in die neuropathologische Diagnostik und somit eine klare Subtypisierung der Glioblastome anhand des Nachweises einer Isocitrat-Dehydrogenase 1 oder 2 (IDH-1/-2)-Mutation vor (18, 30). Bei diesen Mutationen handelt es sich sehr wahrscheinlich um eine frühe Veränderung in der Gliomgenese (31, 32), sodass die Detektion einer IDH-Mutation beim Glioblastom für eine Genese des Tumors aus einem niedriggradigen Astrozytom spricht (18, 26, 28, 31). Im Gegensatz dazu entstehen IDH-Wildtyp Glioblastome „de novo“ (ohne Nachweis einer Vorläuferläsion (28)) und weisen keine IDH1- oder IDH2-Mutationen auf (IDH^{WT}) (18, 33). Die IDH-Mutationen können mit Hilfe der Sanger- oder Pyrosequenzierung, aber auch im Rahmen von NGS-Panel-Analysen nachgewiesen werden. Des Weiteren existiert ein mutationsspezifischer, kommerziell erhältlicher Antikörper, der das mutierte IDH1-Protein der am häufigsten auftretenden IDH1-Punktmutation (85-90%), bei der die Aminosäure Arginin (R)

durch Histidin (H) ersetzt wird (IDH1(R132H)) (32, 34, 35), detektiert. Bei fehlender Immunreaktivität sollte eine Sequenzierung der IDH1- und IDH2-Gene zum Ausschluss einer anderen IDH1- (z.B. R132L, R132C, R132G, R132S, R132V (36-38)) oder IDH2-Mutation (z.B. R172K oder R140Q (36, 39)) erfolgen.

Histomorphologisch können IDH-Wildtyp und IDH-mutierte Glioblastome nicht voneinander unterschieden werden (26, 28). Bei beiden Subtypen handelt es sich histologisch um maligne, astrozytäre Tumore mit Nachweis von Gefäßproliferaten und/oder Tumornekrosen (18). Die Neoangiogenese bzw. die Entstehung pathologischer Gefäßproliferate wird durch eine erhöhte Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) im Glioblastom begünstigt (40, 41, 42, 43).

1.2.1.1.1. Glioblastom, IDH-Wildtyp

IDH-Wildtyp Glioblastome machen ca. 90% aller Glioblastomdiagnosen aus (44, 45). Das mediane Überleben der Patient*innen beträgt nach maximaler Therapie, bestehend aus Operation und kombinierter Radio-/Chemotherapie, ca. 14 Monate (46, 47). IDH-Mutationen spielen, wie bereits beschrieben, keine signifikante Rolle. Vielmehr weisen diese Tumore häufig somatische Mutationen des TERT-Promotors (TERT p-mut; 60-70% der Fälle) auf (18, 48). Die Mutationen im Promotorbereich des TERT-Gens sind in verschiedenen Tumorentitäten, z.B. im malignen Melanom oder hepatozellulären Karzinom, aber auch in Gliomen beschrieben (49, 50). Die beiden häufigsten Mutationen im Bereich des TERT-Promotors (C228T und C250T) befinden sich –124 bzw. –146 bp vor der TERT-ATG-Stelle (chr5, 1.295.228 C> T bzw. 1.295.250 C> T) (48, 49). Dadurch wird die Transkriptionsaktivität nach Bindung von Ets/TCF-Transkriptionsfaktoren deutlich erhöht, welches zu einer Aktivierung der Telomerase und damit zu einer permanenten Zellteilung mit daraus folgendem Wachstum führt (49, 51). Mehrere Studien konnten einen Zusammenhang von TERT-Promotor-Mutationen und erhöhter TERT-Expression zeigen (49), was mit einem verkürzten Überleben (26, 52) und einer Resistenz gegenüber einer Strahlentherapie assoziiert ist (53). Bei IDH^{WT}-GBM liegt des Weiteren in 35-57% der Fälle eine Genamplifikation des *epidermal*

growth factor receptor (EGFR) vor. Dies geht mit einer erhöhten Konzentration des EGFR-Proteins einher (18, 44, 54). Beim EGFR handelt es sich um einen Tyrosinkinase-Rezeptor, der zur Familie der ErbB-Membranrezeptoren gehört und wichtige intrazelluläre Signalwege, wie den Ras-Raf-MEK-ERK- sowie den PI3K-AKT-mTOR-Signalweg aktiviert (45, 54). Dieses führt letztlich zu einer Stimulation des Zellwachstums und zur Verhinderung des apoptotischen Zelltods (45). Neben einer Überexpression der Wildtyp-Variante (EGFR^{WT}), finden sich im Glioblastom häufig *EGFR*-Deletionen. Am häufigsten entsteht dabei die Variante EGFRvIII (de2-7EGFR, ΔEGFR), bei der die Exons 2-7 der kodierenden Sequenz und damit 267 Aminosäuren der extrazellulären Domäne fehlen (45, 55). Dieser trunkierte Rezeptor ist von der Liganden-Bindung unabhängig, die Tyrosinkinaseaktivität somit konstitutiv aktiv, was zur malignen Transformation der Zelle beiträgt (56). Des Weiteren weisen IDH^{WT}-Glioblastome häufig eine Kombination aus Zugewinn auf Chromosom 7 und Verlust von Chromosom 10 (Chr. +7/-10) auf (57). Im Rahmen der Empfehlungen des Konsortiums cIMPACT-NOW (Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy) und laut 5. Revision der WHO-Klassifikation der Tumore des zentralen Nervensystems (voraussichtliches Erscheinungsdatum: Herbst 2021) sollte die Diagnose Glioblastom, IDH-Wildtyp gestellt werden, wenn ein diffuses Astrozytom im Erwachsenenalter entweder die entsprechenden histologischen Kriterien (einschließlich Nachweis von Gefäßproliferaten und/oder Tumornekrosen) oder die folgenden molekularen Veränderungen aufweist: TERT-Promotor-Mutation oder EGFR-Genamplifikation oder chromosomale Kopienzahlveränderungen (Chr. +7/-10) (57, 58).

1.2.1.1.2. Glioblastom, IDH-mutiert

IDH-mutierte Glioblastome treten deutlich früher auf, das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei ca. 45 Jahren (18, 44, 59). Das mediane Gesamtüberleben ist im Vergleich zum IDH^{WT}-GBM mit ca. 35 Monaten signifikant besser (44, 51, 59). Die Frequenz der verschiedenen IDH-Punktmutationen ist sehr unterschiedlich. Wie zuvor beschrieben, betreffen ca. 90 Prozent der Mutationen das IDH1-Gen (Kodon 132). Sehr viel seltener können

Punktmutationen im Kodon 172 des IDH2-Gens nachgewiesen werden. Das Enzym IDH katalysiert die Umwandlung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat (α KG) im Zytosol (IDH1) und in den Mitochondrien (IDH2). Das mutierte Enzym hat die Fähigkeit, α -Ketoglutarat in den Onkometaboliten 2-Hydroxyglutarat (2-HG) zu konvertieren, welcher sukzessiv akkumuliert (60). Dies führt zu einer Hypermethylierung der DNA im Sinne eines sog. „Methylierungsphänotyps“ (G-CIMP, *glioma-CpG-island methylator phenotype*) (44, 51, 61).

Bei diesem Subtyp finden sich darüber hinaus häufig (70-80% der Fälle) TP53-Mutationen (18, 28, 51, 62, 63). Nach einer Schädigung der DNA beispielsweise durch ionisierende Strahlung, kontrolliert das p53-Protein als Transkriptionsfaktor maßgeblich die Regulation verschiedener Gene, die an der Kontrolle des Zellzyklus bzw. für die Induktion der Apoptose (programmierter Zelltod) oder für die Reparatur der beschädigten DNA verantwortlich sind (64). Der Verlust der Funktion des p53-Proteins, z.B. durch Mutationen, spielt somit eine fundamentale Rolle in der Entstehung verschiedener maligner Erkrankungen (64). So entwickeln Patient*innen, bei denen eine pathogene Keimbahnmutation des TP53-Gens, einem Li-Fraumeni-Syndrom entsprechend, vorliegt, mit hoher Wahrscheinlichkeit verschiedene Tumore, u.a. auch Astrozytome (44, 65). Weitere, in IDH-mutierten (IDH^{mut}) Glioblastomen wichtige genetische Veränderungen betreffen das ATRX-Gen. Der Transkriptionsregulator ATRX enthält eine ATPase/Helicase-Domäne und gehört zur sogenannten switch-sucrose non-fermentable (SWI-SNF)-Familie der Chromatin-Remodelling-Proteine (51, 66). ATRX-Mutationen lassen sich in ca. 70% der sekundären Glioblastome nachweisen (18, 61) und verändern das DNA-Methylierungsmuster bestimmter Gene, die die Zellproliferation und das Tumorstadium begünstigen (51, 61). Die ATRX-Mutation führt zu einem Verlust der nukleären Expression des ATRX-Proteins, der Verlust lässt sich immunhistochemisch nachweisen (67). In der 5. Revision der WHO-Klassifikation der Tumore des zentralen Nervensystems wird die Diagnose Glioblastom, IDH-mutiert (WHO Grad IV) abgeschafft und durch die Diagnose Astrozytom, IDH-mutiert ZNS WHO Grad 4 ersetzt (58). Des Weiteren werden IDH-mutierte Astrozytome, die eine homozygote CDKN2A/B-Deletion aufweisen, auch bei fehlendem Nachweis von Gefäßproliferaten und/oder Tumornekrosen als ZNS WHO Grad 4 eingeordnet (58).

1.2.1.1.3. MGMT: Prädiktiver und prognostischer Marker im Glioblastom

Im Rahmen der Standardtherapie des Glioblastoms sollte zunächst eine Komplettresektion der kontrastmittelanreichernden Tumoranteile, soweit möglich, erreicht werden, da so das progressionsfreie Überleben und Gesamtüberleben verbessert werden kann (68, 69). Die adjuvante Standardtherapie umfasst, bisher unabhängig von der histologischen und molekularen Unterscheidung zwischen IDH^{WT}- und IDH^{mut}-Glioblastomen, eine kombinierte Radiochemotherapie mit einer kumulativen Gesamtdosis von 60 Gray (Gy) bei simultaner Gabe von Temozolomid (TMZ), verabreicht oral in einer Dosis von 75 mg/m² KOF für 42 Tage (70, 71). Es folgen bis zu 6 Zyklen TMZ-Monotherapie (Monotherapie-Phase) mit 150-200mg/m² KOF TMZ täglich für 5 Tage, gefolgt von 23 Tagen ohne Behandlung (70, 71). Reduzierungen der Dosis oder Abbrüche während der Monotherapie-Phase müssen entsprechend den hämatologischen und nicht-hämatologischen Toxizitätskriterien entschieden werden. Alle 3 Monate erfolgt eine bildgebende Kontrolle durch ein kontrastmittelverstärktes cMRT. Mittlerweile ist gut bekannt, dass das Ansprechen des Tumors und damit die Prognose der Patient*innen sehr vom Methylierungsstatus des O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Promotors abhängt (38, 50, 71).

Der Methylierungsstatus des MGMT-Promotors ist somit sowohl prognostischer als auch prädiktiver Marker im Glioblastom und spielt daher eine entscheidende klinische Rolle (38, 72-74). Es handelt sich um ein ubiquitäres DNA-Reparatur-Protein, welches an der Reparatur geschädigter DNA beteiligt ist. Verschiedene alkylierende Chemotherapeutika, wie z.B. TMZ oder Nitrosoharnstoffe (Lomustin, Carmustin) induzieren DNA-Schäden, die normalerweise der MGMT-abhängigen Reparatur unterliegen (38, 75, 76). Eine Hypermethylierung des MGMT-Promotors hat eine verminderte Transkription des Gens zur Folge (74). Somit können die durch alkylierende Chemotherapie induzierten DNA-Doppelstrang-Brüche nicht repariert werden, welches zum Zelltod und somit zu einer vermehrten Empfindlichkeit des Tumors gegenüber der Radiochemotherapie führt (77). Mehrere Studien konnten zeigen, dass die Hypermethylierung des MGMT-Promotors mit einem verbesserten Ansprechen auf die Gabe

des alkylierenden Standard-Chemotherapeutikums TMZ und damit auch mit einem signifikant verbesserten Gesamtüberleben assoziiert ist (48, 74, 77-80). In der Routinediagnostik gibt es verschiedene Möglichkeiten, den MGMT-Promotor-Status zu bestimmen, z.B. die Pyrosequenzierung (PSQ), die methylierungsspezifische PCR (MSP) oder die direkte Bisulfit-Sequenzierung (dBiSeq) (38, 77, 78). Darüber hinaus besteht die Option einer genomweiten DNA-Methylierungsanalyse, die vor allem im Rahmen einer Bestimmung der epigenetischen Tumorsignaturen (DNA-Methylierungsprofil) zur Einordnung wichtiger Tumorentitäten bzw. Risikogruppen verwendet wird (78, 81). Die verschiedenen Methoden zur Bestimmung des MGMT-Promotors erschweren im klinischen Alltag die Durchführung größerer klinischer Studien, da ein (inter-)nationaler Standard zur Identifizierung des MGMT-Status sowie klare Grenzwerte fehlen (38, 77). So sind die Ergebnisse von MSP und PSQ, insbesondere bei niedriger Methylierung nicht immer übereinstimmend (38, 82). Beide Techniken sind in der Literatur als Goldstandard zur Bestimmung des MGMT-Promotor-Status beschrieben (83, 84). Welche Technik am besten als MGMT-Methylierungsassay geeignet ist, bleibt bisher jedoch ungeklärt (85). Mit Hilfe der PSQ lässt sich neben einer qualitativen auch eine quantitative Aussage über das Ausmaß der Methylierung treffen (38, 78). Hier fehlen jedoch in unabhängigen Kollektiven bestätigte Grenzwerte zur klaren Unterscheidung von methyliert und unmethyliert (38, 77, 79, 86). Der MGMT-Promotor umfasst 97 CpG-Stellen (76, 78). In Zellkulturuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Unterschiede in den Methylierungsniveaus innerhalb von zwei großen Regionen liegen (87, 88). In einer dieser Regionen liegen die CpGs, die mit Hilfe der MSP und PSQ untersucht werden (38). Die MSP-Region umfasst dabei neun, die PSQ fünf dieser CpG-Stellen (38). Der Nachweis einer Methylierung korreliert dabei gut mit einer verminderten MGMT-Genexpression (76, 89). Ob das aber tatsächlich auch den Expressionsstatus des MGMT-Proteins am besten widerspiegelt, ist noch nicht abschließend geklärt (73, 76, 90). Bei der PSQ wird ab einer durchschnittlichen Methylierung der fünf untersuchten CpG-Stellen $\geq 10\%$ von einer Methylierung des MGMT-Promotors ausgegangen (38, 86). Jedoch sind weitere prospektive Studien nötig, die die Rolle von MGMT in den verschiedenen Glioblastom-Subgruppen

untersuchen und die Korrelation von Methylierung und Proteinexpression weiter validieren (38, 78, 86).

Patient*innen, deren Tumore keine Hypermethylierung des MGMT-Promotors aufweisen, scheinen kaum von TMZ zu profitieren (80). Dennoch wird TMZ im klinischen Alltag bei fast allen GBM-Patient*innen eingesetzt (78), da es i) national wie international an einer Standardisierung der MGMT-Promotor-Analyse sowie ii) an therapeutischen Alternativen mangelt (77, 78). Der Verzicht des Einsatzes von TMZ im Rahmen der Therapie MGMT-unmethylierter Tumore sowie die ausschließliche Gabe von TMZ (ohne begleitende Radiotherapie) bei methylierten Tumoren wurden in prospektiven randomisierten Studien (NOA-08 und Nordic Elderly) bei älteren Patienten (≥ 65 Jahre bzw. > 60 Jahre) untersucht (91-93).

Für eine weitere Stratifizierung des GBM hinsichtlich MGMT sind jedoch verlässliche, robuste und reproduzierbare Grenzwerte, die klar zwischen methyliert und unmethyliert unterscheiden, unerlässlich (38, 77, 78). Bei IDH^{mut}-Glioblastomen ist der MGMT-Promotor in über 90% methyliert, welches auf den oben beschriebenen G-CIMP-Phänotyp zurückzuführen ist (78, 94). Es ist also zu diskutieren bzw. es bedarf weiterer Studienergebnisse, ob bei diesen Tumoren auf eine Analyse des MGMT-Promotors verzichtet werden kann.

Bei Patient*innen, deren Tumore eine klare Methylierung des MGMT-Promotors aufweisen, deuten die Ergebnisse der NOA-09 Studie (CeTeG-Studie, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01149109) darauf hin, dass die Kombination aus den zwei alkylierenden Chemotherapeutika CCNU und TMZ in der Erstlinientherapie, im Gegensatz zur Standardtherapie, zu einer Verbesserung des progressionsfreien Überlebens führt (82, 95).

1.2.2. Sekundäre Hirntumore

Bei Hirnmetastasen handelt es sich um Absiedlungen eines Primärtumors aus einem anderen Organ (96, 97). Hirnmetastasen können solitär (einzige Absiedlung im gesamten Körper), singular (einzige Absiedlung im ZNS) oder multipel (mehrere Herde im ZNS) auftreten (98). Am häufigsten finden sich Metastasen des Bronchial- (40-60%) und Mammakarzinoms (15-

20%) sowie des malignen Melanoms (10-15%) (96, 97, 99). Beim malignen Melanom sind es vor allem Hirnmetastasen, die maßgeblich zur Mortalität beitragen (98-100). Ca. 45% der Patient*innen entwickeln bereits in frühen Krankheitsstadien klinisch manifeste Hirnmetastasen (100-102). Diese lassen sich wesentlich schlechter behandeln als Absiedlungen in anderen Lokalisationen des Körpers (101, 103). Die genauen molekularen Mechanismen der ZNS-Metastasierung bzw. des ZNS-Tropismus sind Gegenstand aktueller Forschungsbemühungen und noch nicht abschließend geklärt (99, 103). Die spezielle Mikroumgebung des Gehirns und die Blut-Hirn-Schranke (BHS) spielen eine entscheidende Rolle. Die BHS verhindert, dass bestimmte Medikamente die Metastasen erreichen. Des Weiteren begünstigen bestimmte Zellpopulationen im Gehirn das Wachstum von Melanom-Metastasen. So scheinen verschiedene, zum Teil von Astrozyten ausgeschüttete Zytokine, wie z.B. CXCL10 oder CXCR4, eine große Rolle als Signal- bzw. Lockstoffe zu spielen (104, 105). Auch die Tumorzellexpression des Nervenwachstumsfaktor-Rezeptors CD271 (NGFR, p75) wurde bereits mit einer erhöhten Inzidenz von Melanom-Metastasen in Lunge, Leber, Niere und Hirn in Verbindung gebracht (102, 106). Derzeit fehlt es an robusten präklinischen Modellen der Hirnmetastasierung, die sowohl die molekularen Veränderungen des Tumors als auch das Mikromilieu des Gehirns abbilden können (99, 103). Ähnlich wie bei hirneigenen Tumoren, werden die molekularen Veränderungen auch bei Hirnmetastasen analysiert und die Patient*innen im Rahmen einer individualisierten Strategie behandelt. So werden zur Therapie von BRAF V600-mutierten Hirnmetastasen des malignen Melanoms (ca. 50%, (107)) z.B. BRAF-Inhibitoren (BRAFi) wie Dabrafenib oder Vemurafenib (108), zum Teil in Kombination mit MEK-Inhibitoren (z.B. Trametinib), eingesetzt (109). Diese Therapie zeigt auch bei BRAF V600E-mutierten, hirneigenen Tumoren, wie z.B. dem pleomorphen Xanthoastrozytom (PXA) oder dem pilozytischen Astrozytom Erfolg (110, 111). Im Rahmen der CheckMate204-Studie (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02320058) zeigte der kombinierte Einsatz des PD-1-Inhibitors Nivolumab und CTLA-4-Inhibitors Ipilimumab sehr gute Ansprechraten im Rahmen der Therapie von intrakraniellen Metastasen des malignen Melanoms (112). Die Kombination

beider Medikamente wird derzeit auch zur Therapie von GBM-Patient*innen untersucht (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04396860).

Andere vielversprechende Medikamente können bei Nachweis bestimmter Genfusionen im Tumor angewendet werden. Entrectinib ist beispielsweise ein Inhibitor der Tyrosinkinase TRKA/B/C, ROS1 und ALK, der entitätsübergreifend bei Tumoren mit Nachweis einer NTRK1/2/3-, ROS1-, oder ALK-Genfusion eingesetzt werden kann. Seine Anwendung wird im Rahmen von Studien bei verschiedenen intrakraniellen Metastasen (des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms sowie des Kolon- und Mammakarzinoms und malignen Melanoms) untersucht (113).

In 5-10% der Fälle sind Hirnmetastasen die primäre klinische Manifestation eines Tumors (98). Eine umfangreiche Primärtumorsuche folgt. Kann ein entsprechender Ursprungstumor nicht identifiziert werden, spricht man von einem sog. CUP (*cancer of unknown primary*)-Syndrom. Histologisch handelt es sich am häufigsten um wenig differenzierte Adenokarzinome aber auch Sarkome und maligne Melanome (114). Eine umfangreiche immunhistochemische und molekulare Aufarbeitung dieser Fälle kann Aufschluss über den Primärtumor und über therapeutische Targets geben.

1.3. Neuromuskuläre Erkrankungen

Sie bilden ein breites Spektrum verschiedener Erkrankungen, die die Muskelzelle selbst (Myopathie), die motorischen Endplatten, bzw. das periphere Nervensystem (Neuropathie) oder die motorischen Nervenzellen im Gehirn und Rückenmark (Motoneuronenerkrankungen) betreffen und meist einer umfangreichen interdisziplinären klinischen Untersuchung bedürfen. Eine Biopsie eines peripheren Nervens oder der Skelettmuskulatur und damit eine weitere immunhistochemische, elektronenmikroskopische und molekularpathologische und molekularpathologische Aufarbeitung des Gewebes ist meist elementarer Bestandteil der weiteren diagnostischen Einordnung dieser Erkrankungen.

1.3.1. Myopathien

Bei den Myopathien handelt es sich um seltene Erkrankungen der Skelettmuskelzelle. Durch die Dysfunktion der Muskelfasern kommt es meist zu einer Muskelschwäche. Des Weiteren können Muskelkrämpfe, Steifheit und Spasmen auftreten. In diese Gruppe fallen u.a. Muskeldystrophien sowie mitochondriale, kongenitale, metabolische und entzündliche Myopathien. Das nosologische Spektrum dieser Erkrankungen erweitert sich durch die Identifizierung neuer, bisher unbekannter pathogener Mutationen in den vergangenen Jahren stetig. Insbesondere bei den kongenitalen Myopathien wird die genetisch ausgerichtete Klassifikation regelmäßig erweitert (115), wie die Bedeutung der Exom-/Genom-Sequenzierung für die Erforschung dieser Erkrankungen verdeutlicht (116). Dies trifft auch für die autophagischen vakuolären Myopathien (AVM) zu, eine Gruppe, die verschiedene Erkrankungen, z.B. die Danon-Krankheit oder die X-chromosomale Myopathie mit exzessiver Autophagie (XMEA) umfasst (117). Erst kürzlich konnte das nosologische Spektrum der AVM durch weiterführende immunhistochemische und genetische Untersuchungen des Skelettmuskelgewebes durch eigene Untersuchungen erweitert werden, da auch im Rahmen der CLN3, einer klassischen juvenilen neuronalen Ceroid-Lipofuszinose (NCL), bei der es sich um eine neurodegenerative Erkrankung des Kindes- und Jugendalters handelt, das Auftreten einer AVM beschrieben werden konnte (118-120).

Eine weitere wichtige Gruppe erworbener Erkrankungen der Skelettmuskulatur stellen die idiopathischen inflammatorischen Myopathien (IIM) dar (121). Sie umfasst die Dermatomyositis (DM), die immunvermittelte nekrotisierende Myopathie (IMNM), das Antisynthetase-Syndrom (ASS) sowie die Einschlusskörper-Myositis (IBM). Die in der älteren Literatur noch häufig beschriebene Polymyositis (PM) bleibt laut neuerer wissenschaftlicher Erkenntnisse als unspezifische, historische Ausschlussdiagnose übrig (122).

1.3.1.1. Dermatomyositis

Dieser Terminus beschreibt eine Erkrankung der quergestreiften Muskulatur mit Beteiligung der Haut und inneren Organen (z.B. Herz, Niere und Lunge (123, 124)). Die Dermatomyositis (DM) kann krebsassoziiert vorkommen, während oder bis zu 3 Jahre nach einer klinisch manifesten Tumorerkrankung im Rahmen verschiedener Tumorentitäten, wie z.B. Brust-, Darm-, Lungen- und Ovarialtumoren sowie Hodgkin-Lymphomen und malignen Melanomen auftreten (125-127). Man spricht dann von einer sog. *cancer-associated myositis (CAM)*. Bei der DM handelt es sich klinisch und morphologisch um eine heterogene Erkrankung. In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass Myositis-spezifische Autoantikörper bei einer weiteren Subtypisierung der DM helfen könnten (121, 124, 128-130). Diese Subtypen lassen sich zum Teil auch mittels Biopsie des betroffenen Skelettmuskels morphologisch und immunhistochemisch unterscheiden (124). Der Nachweis DM-spezifischer Autoantikörper (anti-Mi-2, anti-MDA5, anti-SAE, anti-NXP2 und anti-TIF-1 γ) erlaubt eine weiterführende Stratifizierung der Patient*innen. Mittlerweile ist gut bekannt, dass Patient*innen, bei denen TIF-1 γ - oder NXP2-Autoantikörper im Blut nachgewiesen werden können, ein deutlich höheres Risiko haben, eine krebsassoziierte Dermatomyositis zu entwickeln (121, 124-126). Neben den bereits bekannten DM-spezifischen Autoantikörpern gibt es wahrscheinlich weitere, bisher nicht identifizierte Autoantikörper. Dieses gilt es insbesondere bei morphologisch seltenen Varianten der DM, wie etwa in Fällen mit Nachweis sog. B-Zell-reicher, ektopischer lymphoider follikelartiger Strukturen (123) weiter zu untersuchen. Mit Hilfe zahlreicher immunhistochemischer Spezialfärbungen können wir in eigenen Arbeiten das entzündliche Infiltrat dieser seltenen Subtypen näher charakterisiert und die Expression verschiedener Zytokine und Chemokine auf mRNA-Ebene differenziert untersucht werden. Ziel ist die Identifikation von Patient*innen, die im Sinne eines individualisierten Therapieansatzes von bestimmten immunmodulatorischen Medikamenten oder monoklonalen Antikörpern, wie z.B. hier Rituximab (ein gegen das B-Zell-Oberflächenantigen CD20 gerichteter Antikörper) profitieren könnten (131).

Die Daten einer aktuell durch mich durchgeführten Studie zeigen, dass neben den Autoantikörpern, bei denen es sich um wertvolle, klinisch relevante Biomarker handelt, eine Subtypisierung auch mit Hilfe von Genexpressionsanalysen im Rahmen von Nanostring aus dem Muskelgewebe der Patient*innen erreicht werden kann (*manuscript accepted*), sodass die Patient*innen entsprechend risikoadaptiert behandelt und nachversorgt werden können.

1.4. Zielsetzung

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist die morphologische und molekulare Charakterisierung neuroonkologischer und neuromuskulärer Erkrankungen zur Identifizierung genetischer und epigenetischer Veränderungen, die der diagnostischen, prognostischen und prädiktiven Einordnung dienen sollen. Die Studienergebnisse sollen dabei Eingang in die klinische Routineversorgung der Patient*innen finden. Ziel ist vor allem auch die Identifizierung bestimmter Biomarker zur therapeutischen Stratifizierung der Patient*innen.

2. Eigene Arbeiten

2.1. Zusammenfassung Publikation Nummer eins:

2.1.1. Die Inhibierung von Apelin (APLN) und seines Rezeptors (APLNR) verbessert die Effizienz der antiangiogenen, gegen VEGFA gerichteten Therapie beim Glioblastom und vermindert die Tumorzellinvasion.

Targeting APLN/APLNR Improves Antiangiogenic Efficiency and Blunts Proinvasive Side Effects of VEGFA/VEGFR2 Blockade in Glioblastoma. Mastrella G, Hou M, Li M, Stoecklein VM, Zdouc N, Volmar MNM, Miletic H, Reinhard S, Herold-Mende CC, Kleber S, Eisenhut K, Gargiulo G, Synowitz M, Vescovi AL, Harter PN, Penninger JM, Wagner E, Mittelbronn M, Bjerkvig R, Hambardzumyan D, Schüller U, Tonn JC, **Radke J**, Glass R, Kälin RE. *Cancer Res.* 2019 May 1;79(9):2298-2313. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0881>

Eine Überexpression des sog. *vascular endothelial growth factor* (VEGF) im GBM ist lange und gut bekannt (40, 41, 42, 43). VEGFA, der bekannteste Vertreter der VEGF-Familie (132) ist ein wichtiges Signalmolekül, welches die Vaskulogenese stimuliert und im GBM maßgeblich für die Neovaskularisierung bzw. für die Entstehung pathologischer Gefäßproliferate verantwortlich ist (40, 41, 42, 43). Für die Inhibition dieses Signalmoleküls steht Bevacizumab, ein VEGF-blockierender Antikörper, zur Verfügung, der im Rahmen der Phase-III-Studie AVAglio in der Erstlinientherapie des GBM untersucht wurde (133). Durch die Bindung von Bevacizumab an VEGF, wird die Bindung von VEGF an seine Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 gehemmt. In dieser multizentrischen Studie zeigte sich zwar eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens (PFS), das Gesamtüberleben (OS) jedoch wurde durch Bevacizumab nicht signifikant verlängert (134-136). Aufgrund dessen wurde das Medikament in Deutschland nicht zur Therapie des Glioblastoms zugelassen (137).

Mehrere Studien belegen, dass die antiangiogene Therapie des Glioblastoms (GBM) mit Bevacizumab die Tumorzellinvasion beschleunigen und alternative proangiogene Signalwege induzieren kann (138). Die vorliegende Studie untersucht die Rolle des proangiogenen Apelin-

Rezeptors APLNR und seines Liganden Apelin im Rahmen der VEGFA/VEGFR2-antiangiogenen Therapie bei verschiedenen Subtypen des GBM. Die Mechanismen der Apelin/APLNR-induzierten Vaskularisierung wurden im Mausmodell untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass eine verminderte (*knockdown*) bzw. vollständig abgeschaltete (*knockout*) Expression von APLN in verschiedenen GBM-Subtypen die Vaskularisierung der Tumore im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen signifikant reduziert. Auch hat eine Reduktion der Apelin-Expression eine Beschleunigung der Zellinvasion im GBM zur Folge. Dieser Effekt konnte in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Experimenten bestätigt werden. Zudem konnte die Studie eine verstärkte Infiltration APLNR-positiver Tumorzellen nach Reduktion der Apelin-Expression nachweisen. Dieses zeigte sich auch im Gewebe humaner GBM-Biopsien. Die Studie zeigte auch, dass die Gabe von Apelin-F13A, einem mutierten APLNR-Liganden, die Neoangiogenese und Zellinvasion im GBM blockieren konnte. Die synergistische Gabe von VEGFR2-Inhibitoren und Apelin-F13A führte also zur einer verbesserten Effizienz der antiangiogenen Behandlungen im präklinischen Mausmodell.

2.2. Zusammenfassung Publikation Nummer zwei:

2.2.1. Die Analyse des prädiktiven MGMT-Status in einer homogenen IDH-Wildtyp-Glioblastom-Kohorte

Predictive MGMT status in a homogeneous cohort of IDH wildtype glioblastoma patients.

Radke J*, Koch A*, Pritsch F, Schumann E, Misch M, Hempt C, Lenz K, Löbel F, Paschereit F, Heppner FL, Vajkoczy P, Koll R, Onken J. *Acta Neuropathol Commun.* 2019 Jun 5;7(1):89. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0745-z>.

(*in geteilter Erstautorenschaft)

Die Methylierung des O(6)-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Promotors ist ein wichtiger prädiktiver Marker für das Therapieansprechen von Glioblastom-Patient*innen auf eine alkylierende Chemotherapie (74, 78, 80) und kann z.B. durch die Pyrosequenzierung (PSQ) ermittelt werden. Allerdings sind die im Rahmen der PSQ verwandten prädiktiven Cutoff-Werte zur Unterscheidung von Patient*innen mit "MGMT-methylierten" und "MGMT-unmethylierten" Glioblastom nach wie vor sehr umstritten (86). Die oben genannte retrospektive Studie analysiert eine klinisch sowie molekularbiologisch sehr gut charakterisierte Kohorte bestehend aus 111 IDH^{WT}-Glioblastom-Patient*innen, die neben einer totalen Tumoresektion auch die Standard-Therapie (Stupp-Schema) erhalten haben. Neben der Erhebung detaillierter klinischer Parameter, wurden die prädiktiven Cutoff-Werte für die MGMT-Promotor-Methylierung mittels Grenzwertoptimierungskurve (ROC-Kurve) und Log-Rank-Test bestimmt. Der MGMT-Status wurde mittels Pyrosequenzierung (PSQ), semi-quantitativer methylierungsspezifischer PCR (sqMSP) und durch die direkte Bisulfit-Sequenzierung (dBiSeq) erhoben. Die Studienergebnisse zeigen ein signifikant verbessertes progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) im Falle einer hohen Methylierung (>20%) des MGMT-Promotors im Gegensatz zu Patient*innen, die einen niedrig methylierten (10-20% mittlere Methylierung) oder unmethylierten MGMT-Status (<10% mittlere Methylierung) aufweisen. Die Ergebnisse der Methylierungsanalyse wurden des Weiteren mit

Hilfe verschiedener Techniken validiert. Eine Übereinstimmung der Ergebnisse der MGMT-Methylierungsanalyse mittels PSQ, sqMSP oder dBiSeq konnte bei Patient*innen mit niedrig methyliertem MGMT-Status in nur 51,5% der Fälle gezeigt werden, welches erneut die eingeschränkte Vergleichbarkeit der verschiedenen Techniken zur Bestimmung des MGMT-Status verdeutlicht. Die Ergebnisse der ROC-Analyse zeigen des Weiteren eine bessere Testpräzision für das Gesamtüberleben, wenn sowohl die Ergebnisse der PSQ als auch der sqMSP berücksichtigt werden (AUC = 0,76) anstatt die Ergebnisse der PSQ (Cutoff 10%) allein (AUC = 0,67). Zusammenfassend wird der weit verbreitete, strenge PSQ-Cutoff von 10% in Frage gestellt, da dieser Cutoff das klinische Ansprechen auf alkylierende Wirkstoffe möglicherweise nicht vollständig widerspiegelt. Daher wird in der Studie auch die Anwendung einer zweiten Methode (z.B. die sqMSP) zur Bestätigung der PSQ-Ergebnisse bei Patient*innen mit niedrig methyliertem MGMT-Status diskutiert.

2.3. Zusammenfassung Publikation Nummer drei:

2.3.1. Die Expression von CD271 begünstigt die Migration von Tumorzellen des malignen Melanoms.

CD271 determines migratory properties of melanoma cells. **Radke J, Roßner F, Redmer T.** *Sci Rep.* 2017 Aug 29;7(1):9834. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10129-z>.

Die Expression des Nervenwachstumsfaktor-Rezeptors CD271 im malignen Melanom wird mit Stammzeleigenschaften der Tumorzellen in Verbindung gebracht (139, 140). Welche Funktion der Rezeptor bei der Migration der Melanom-Zellen hat, ist jedoch noch nicht abschließend geklärt (141). Die Studie untersucht extrakranielle Metastasen aus Haut, Weichteilgewebe, Lymphknoten und Leber (n = 13) sowie die jeweiligen Hirnmetastasen (n = 12) und analysiert die heterogene Verteilung phänotypisch unterschiedlicher Subgruppen CD271+ Tumorzellen. Die Ergebnisse zeigen, dass die CD271-Expression im Rahmen der Tumorprogression und Metastasierung zunimmt und Hirnmetastasen eine kräftige Expression von CD271 aufweisen. Auf RNA-Ebene lassen sich in der Studie 99 differentiell exprimierte Gene identifizieren, deren Expression sich in den 2 distinkten Subgruppen (starke CD271-Expression vs. geringe CD271-Expression) signifikant unterscheidet. So führt die Expression von CD271 zu einer erhöhten Expression migrationsassoziierter und tumorstammzellassoziierter Gene. Dieses wird im Rahmen der Studie in verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten validiert. Melanom-Zellen, in denen die Expression von CD271 herunterreguliert wurde (*knockdown*), zeigten sowohl in den *Live-Cell-Imaging*-basierten *Scratch-Assays* als auch nach stereotaktischer Implantation der Tumorzellen in murine organotypische Hirnschnitte (*organotypic brain slices*) eine signifikante Reduktion sowohl der Zellmigration als auch der Expression der Gene FGF13, CSPG4, HMGA2 und AKT3, bei denen es sich um wichtige, regulatorische Kandidaten-Gene der Melanom-Zellmigration handelt. Zusammenfassend beleuchtet die Studie die molekularen Mechanismen der CD271-abhängigen Migration maligner Melanom-Zellen und liefert damit neue Erkenntnisse über die Kandidaten-Gene, die sowohl die Migration als auch Metastasierung maligner Melanom-Zellen begünstigen.

2.4. Zusammenfassung Publikation Nummer vier:

2.4.1. Die Erweiterung des nosologischen Spektrums der autophagischen vakuolären Myopathie (AVM)

Autophagic vacuolar myopathy is a common feature of CLN3 disease. Radke J., Koll R., Gill E., Wiese L., Schulz A., Kohlschütter A., Schuelke M, Hagel C, Stenzel W, Goebel HH., Annals of Clinical and Translational Neurology, October/2018, 1385-1393, 5. <https://doi.org/10.1002/acn3.662>.

Bei den autophagischen vakuolären Myopathien (AVM) handelt es sich um sehr seltene Erkrankungen. In diese Gruppe fallen beispielsweise die Danon-Krankheit und die X-chromosomale Myopathie mit exzessiver Autophagie (117). In den Sklettmuskelbiopsien betroffener Patient*innen lassen sich mit Hilfe immunhistochemischer Spezialfärbungen zahlreiche autophagische Vakuolen nachweisen, deren umgebende Membran sogenannte sarkolemmale Merkmale aufweist (117). Die juvenile neuronale Ceroidlipofuszinose ist eine seltene neurodegenerative Erkrankung bei Kindern und Jugendlichen, die häufig durch Mutationen des CLN3-Gens verursacht wird. In dieser Arbeit beschreiben wir erstmals das Auftreten einer AVM im Rahmen einer nicht-protrahierten CLN3 (Klassische juvenile NCL). Mit Hilfe detaillierter immunhistochemischer Färbungen können wir im Skelettmuskelgewebe von CLN3-Patienten autophagische Vakuolen mit sarkolemmalen Merkmalen nachweisen. Die ultrastrukturellen Untersuchungen der Skelettmuskulatur, Haut und Lymphozyten bestätigen das Vorliegen einer CLN3 mit Nachweis spezifische lysosomaler Einschlüsse. Die Ergebnisse der Studie erweitern somit das nosologische Spektrum der AVM. Die molekulargenetische Analyse des CLN3-Gens erbrachte des Weiteren bei einem Patienten mit klassischem, nicht-protrahiertem Krankheitsverlauf den Nachweis einer bis dato unbekanntes CLN3-Mutation (c.1056+34C>A).

2.5. Zusammenfassung Publikation Nummer fünf:

2.5.1. Die morphologische und molekulare Charakterisierung neuer, seltener Varianten der Dermatomyositis

Architectural B-cell organization in skeletal muscle identifies subtypes of dermatomyositis.
Radke J., Koll R., Preuße C., Pehl D., Todorova K., Schönemann C., Allenbach Y., Aronica E., de Visser M., Heppner FL., Weis J., Doostkam S., Maisonobe T., Benveniste O., Goebel HH., Stenzel W., Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm. 2018 Mar 6;5(3):e451.
<https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000451>.

Bei der Dermatomyositis (DM) handelt es sich um eine idiopathische entzündliche Erkrankung der Skelettmuskulatur und Haut mit proximaler Muskelschwäche und typischen Hautläsionen, wie z.B. Gottron-Papeln und einem charakteristischen heliotropen Erythem der Gesichts- und Thoraxhaut (124). Mittlerweile ist gut bekannt, dass Patient*innen, bei denen bestimmte Autoantikörper nachgewiesen werden können (z.B. anti-TIF1- γ) besonders häufig an einer paraneoplastischen DM erkranken (142). Bei diesen Patient*innen muss eine ausführliche Tumorsuche durchgeführt werden. Autoantikörper als relevante Biomarker stellen insbesondere in Zusammenhang mit bestimmten, in der Skelettmuskelbiopsie nachgewiesenen histologischen Veränderungen, eine Grundlage für eine weitere Stratifizierung von DM-Patient*innen dar (125). Daher ist die Identifizierung weiterer, bisher unbekannter Autoantikörper im Rahmen seltenerer morphologischer DM-Varianten Gegenstand aktueller Forschungsbemühungen (124). Die vorliegende Arbeit analysiert Skelettmuskelbiopsien von Patient*innen mit adulter und juveniler DM. Im Rahmen der Studie erfolgte eine detaillierte histologische, immunhistochemische und ultrastrukturelle Charakterisierung des Skelettmuskelgewebes sowie die Analyse der Zytokin- und Chemokinprofile auf mRNA-Ebene, welches zu der Beschreibung zweier seltener morphologischer DM-Subgruppen führte. Bei einer Subgruppe finden sich ausgedehnte, diffuse B-Zell-reiche Entzündungszellinfiltrate, bei der anderen Subgruppe lassen sich B-Zell-reiche, ektopische lymphoide follikelartige Strukturen nachweisen. Die Bildung dieser ektopischen lymphoiden Strukturen, u.a. mit Nachweis einer Keimzentrumsreaktion, geht

einher mit einer spezifischen Typ-1-Interferon-Signatur. Die Ergebnisse der Studie unterstreichen die pathogenetische Rolle von B-Zellen bei der DM und erweitern das morphologische Spektrum dieser Erkrankung und bilden somit die Grundlage für eine zielgerichtete und individualisierte Therapie.

3. Diskussion

Die Molekularpathologie hat in den letzten Jahren in allen Teilbereichen der Neuropathologie, sowohl in der Forschung als auch in der Diagnostik, einen hohen Stellenwert gewonnen. Eine molekulare Charakterisierung gibt Einblicke in die Pathogenese einer Erkrankung, erlaubt eine Subtypisierung bzw. Erweiterung eines Krankheitsspektrums, erhöht die diagnostische Präzision und dient der Identifizierung prognostischer und prädiktiver Faktoren im Rahmen individualisierter Behandlungsstrategien.

In den letzten Jahren konnten bei einer Reihe verschiedener maligner Erkrankungen erhebliche Behandlungsfortschritte verzeichnet werden, die sich auch in einer deutlichen Verlängerung des Gesamtüberlebens widerspiegeln (11, 99, 107, 110, 111). Neben modernen diagnostischen Verfahren sowie neuen Operations- und Bestrahlungstechniken sind es vor allem neue Medikamente mit spezifischen Wirkungsmechanismen, die zur Behandlung dieser Erkrankungen eingesetzt werden können (11, 143, 144). Insbesondere bei Leukämien und Lymphomen sowie bei Brust-, Darm- und Hautkrebs konnten somit sehr gute Erfolge erzielt werden (145). Moderne zielgerichtete Therapien, wie etwa der Einsatz monoklonaler Antikörper oder sogenannter „*small molecules*“ können dabei zu einem verminderten Zellwachstum oder gar zum Zelltod der malignen Zellen führen (145). Grundlage für die Entwicklung solcher Medikamente ist eine detaillierte genetische, epigenetische und immunhistochemische Charakterisierung der Tumore.

Während die therapeutischen Möglichkeiten bei einigen Tumorentitäten deutlich verbessert werden konnten, weisen Hirntumore weiterhin eine sehr schlechte Prognose auf. Dies gilt sowohl für maligne hirneigene Tumore als auch für Hirnmetastasen (19, 99, 102). ZNS-Tumore stellen somit eine besondere klinische und therapeutische Herausforderung dar, was u.a. auch auf die besondere Mikroumgebung des Gehirns mit seinen in hohem Maße spezialisierten Zellen sowie auf die Besonderheiten der Blut-Hirn-Schranke (BHS) zurückzuführen ist. So können z.B. ca. 98% der „*small molecules*“ die BHS nicht passieren (146). Weiterhin ist gut

bekannt, dass die Zellen im Gehirn das Wachstum bestimmter Tumorzellen sogar begünstigen. Dies trifft sowohl für Tumorzellen des malignen Melanoms als auch für das Glioblastom zu, deren Proliferation und Migration von den ortsständigen Astrozyten oder bestimmten Immunzellen unterstützt wird (147, 148). Dementsprechend bedarf es neben der Untersuchung der onkogenen Signalwege und Identifizierung neuer Behandlungsansätze auch der Erforschung von Resistenzmechanismen, die zu einem schlechteren Ansprechen oder gar Therapieversagen führen können.

Die Prognose des Glioblastoms hat sich trotz großer Forschungsbemühungen in den letzten Jahrzehnten nur wenig verbessert, was vor allem auch an fehlenden Alternativen in der Therapie des Glioblastoms liegt. Zunächst handelt es sich beim Glioblastom um eine sehr heterogene Gruppe verschiedener Neoplasien, die sich genetisch und epigenetisch fundamental unterscheiden (26, 149, 150). Die Unterscheidung zwischen den 2 distinkten Subgruppen der IDH^{mut}- und IDH^{WT}-Glioblastome fand 2016 Eingang in die aktuelle Klassifikation dieser Tumore (WHO-Klassifikation der Tumore des zentralen Nervensystems) (18). Eine weiterführende molekulare Charakterisierung und Stratifizierung dieser Tumore mit Hilfe moderner Hochdurchsatztechniken ist jedoch unerlässlich für die Identifizierung neuer Biomarker im Rahmen der Entwicklung und Einführung neuer Wirkmechanismen.

Pathologische Gefäßproliferate sind ein histologisches Merkmal des GBM, molekular lässt sich eine kräftige Expression des proangiogenen Faktors VEGF nachweisen (151). Die Interaktion zwischen den Tumorzellen und Blutgefäßen begünstigt das Tumorwachstum (41). Somit stellt die Hemmung der Angiogenese ein weiteres wichtiges therapeutisches Ziel im GBM dar. Die Ergebnisse klinischer Studien mit einem monoklonalen Antikörper gegen VEGF (Bevacizumab) zeigten jedoch nicht den gewünschten Erfolg und konnten das Gesamtüberleben der Patient*innen nicht verlängern (134, 135). Dies lässt sich sehr wahrscheinlich auf Resistenzmechanismen gegenüber der antiangiogenen Therapie zurückführen (151). Diese Zusammenhänge werden in der vorliegenden Arbeit näher beleuchtet. Neben VEGF spielen noch andere proangiogene Faktoren, wie z.B. Apelin (APLN)

und sein Rezeptor (APLNR), die die therapeutische Hemmung von VEGF zum Teil kompensieren können, eine wichtige Rolle (151, 152). Die Ergebnisse dieser Arbeit veranschaulichen, dass eine Hemmung der APLN/APLNR-Signalkaskade die Neoangiogenese und Zellinvasion im GBM blockieren und eine kombinierte VEGF- und APLN-Inhibition die Effizienz der antiangiogenen Behandlungen im präklinischen Mausmodell verbessert (152). Eine Validierung bereits vorhandener prognostischer und prädiktiver Biomarker hinsichtlich möglicher Resistenzmechanismen in präklinischen Modellen ist somit essentiell.

Für die Analyse des bisher einzigen prädiktiv und prognostisch bedeutsamen Biomarkers im Glioblastom, dem MGMT-Promotor-Status, bedarf es einer epigenetischen Untersuchung spezifischer CpG-Stellen in der Promotor-Region des Gens. CpG-Inseln sind Abschnitte in der DNA, die besonders reich an den Nukleotiden Cytosin und Guanin sind. Hier findet eine Methylierung von Cytosinen zu 5-Methylcytosin statt. Die Methylierung des MGMT-Promotors führt dann zu einer verminderten Expression des Gens (89), welches mit einem besseren Ansprechen auf die Therapie mit alkylierenden Chemotherapeutika (z.B. Temozolomid) und mit einem besseren Gesamtüberleben assoziiert (38, 74, 80) ist. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher auch mit der Validierung der Bestimmungsmethoden des MGMT-Promotor-Status im Glioblastom und untersucht beide der in Deutschland überwiegend anerkannten und angewandten Techniken, die Pyrosequenzierung (PSQ) und die methylierungsspezifische PCR (MSP). Nach wie vor fehlt es an (inter-)nationalen Standards zur Bestimmung des MGMT-Promotor-Status, ein Umstand, der die Durchführung klinischer Studien und die Vergleichbarkeit ihrer Ergebnisse erschwert. Dieses betrifft auch den prädiktiven Schwellenwert, ab dem angenommen werden darf, dass die Patient*innen tatsächlich von der Gabe eines alkylierenden Chemotherapeutikums profitieren. Dieser Wert wird für die PSQ von vielen Zentren sehr strikt bei 10% festgelegt (86). Unsere Daten, generiert aus einer großen, klinisch sehr gut charakterisierten Kohorte IDH^{WT}-GBM, legen nahe, dass es einen Graubereich zwischen 10 und 20% zu geben scheint, in dem das Therapieansprechen bei den Patient*innen sich nur wenig von jenem bei Patient*innen mit

unmethyliertem (< 10%) MGMT unterscheidet und dass eine deutliche Verbesserung des Gesamtüberlebens erst ab höheren Werten (> 20%) konstatiert werden kann. Diese Beobachtung wird von anderen, teils recht aktuellen Studien unterstützt und erklärt auch die schlechte Vergleichbarkeit von PSQ und MSP in eben diesem Graubereich, in dem nicht eindeutig zwischen unmethyliert und klar methyliert unterschieden werden kann (153). Vor diesem Hintergrund sind weitere multizentrische prospektive Studien mit gut charakterisierten GBM-Kohorten sowie eine (inter-)nationale Standardisierung der Assays zur weiteren Validierung der prädiktiven Bedeutung von MGMT und zu Stratifizierung von Patient*innen in den entsprechenden klinischen Studien sinnvoll.

Der Wirkmechanismus moderner, zielgerichteter Therapeutika ist nicht auf eine Tumorentität beschränkt, sondern zielt vielmehr auf entitätsübergreifende, proliferationsfördernde und apoptoseinhibierende Signalwege zur Zellzykluskontrolle und epigenetischen Regulation ab. Zudem entziehen sich sowohl primäre als auch sekundäre Tumore der Immunantwort, indem sie die T-Zell-Aktivität unterdrücken (154). Der Einsatz von Antikörpern gegen das zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Protein 4 (CTLA-4), den programmierten Zelltod 1 (PD-1) und den programmierten Zelltod-Liganden 1 (PD-L1) wirkt dieser Unterdrückung entgegen. Eine Kombination von Ipilimumab und Nivolumab wird sowohl bei Hirnmetastasen des malignen Melanoms als auch beim Glioblastom im Rahmen klinischer Studien eingesetzt (112, 155, 156) (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02320058, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02311920). Gleichermaßen kommen BRAF- und MEK-Inhibitoren sowohl bei primären, BRAF V600E-mutierten Hirntumoren (z.B. beim pilozytischen Astrozytom, pleomorphen Xanthoastrozytom und epitheloiden Glioblastom (110, 111, 157, 158)), als auch bei der Behandlung zerebraler Metastasen des malignen Melanoms zum Einsatz (107). Im Rahmen einer Monotherapie des malignen Melanoms mit BRAF-Inhibitoren (BRAFi) wurden Resistenzmechanismen beschrieben, die auf eine Reaktivierung des MAPK-Signalwegs durch z.B. NRAS-Mutationen oder durch eine Überexpression von BRAF und CRAF zurückzuführen sind (159, 160), sodass eine Kombination aus BRAF- und MEK-Inhibitoren der BRAFi-

Monotherapie überlegen ist und das Gesamtüberleben verbessert (161). Ferner konnte gezeigt werden, dass Patient*innen unter BRAFi-Behandlung vermehrt Hirnmetastasen entwickeln (162), was - und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen dies - auch auf eine Zunahme der Expression des migrationsfördernden NGF-Rezeptors CD271 zurückzuführen ist (102, 163). Daher stellt auch CD271 als Biomarker ein neues, potentielles therapeutisches Ziel zur Überwindung der Resistenz gegenüber BRAFi und damit zur verbesserten Wirksamkeit der Therapie bei Hirnmetastasen des malignen Melanoms dar.

Zur klinischen Einführung eines Biomarkers ist es notwendig, jene Patient*innen zu identifizieren, die von einer spezifischen Therapie profitieren (individualisierte Therapie). Dabei kommen verschiedene Nachweisverfahren zum Einsatz. Next Generation Sequencing (NGS)-Analysen können für eine umfangreiche genetische Charakterisierung eingesetzt werden und ermöglichen die Identifizierung aller relevanten DNA- und RNA-Varianten, die bei verschiedenen Tumorentitäten eine große Rolle spielen. Darüber hinaus können die *in-situ*-Hybridisierung (ISH) und die Immunhistochemie zum Einsatz kommen, mit Hilfe derer die Expression eines Biomarkers im Gewebe nachgewiesen werden kann.

Zahlreiche aktuelle Forschungsprojekte beschäftigen sich mit der Identifizierung möglicher Biomarker im Blut oder Liquor, um Tumore frühzeitig detektieren und das Metastasierungsrisiko abschätzen zu können.

Auch bestimmte Autoantikörper im Blut der Patient*innen können auf eine Krebserkrankung hindeuten. Das trifft etwa auf den Nachweis von TIF-1 γ -Antikörpern zu, die im Rahmen einer paraneoplastischen Dermatomyositis auftreten können. Daher sollte bei einer anti-TIF-1 γ -assoziierten Dermatomyositis unbedingt an eine zugrundeliegende maligne Erkrankung gedacht werden (121, 124-126). Die im Blut der Patient*innen nachweisbaren Autoantikörper stellen somit wertvolle Biomarker dar. Für eine eindeutige Autoantikörper-basierte Subtypisierung der DM fehlt es jedoch zurzeit noch an einer internationalen Standardisierung des Autoantikörper-Nachweises. Des Weiteren können eine B-Zell-gerichtete Therapie (Rituximab) oder eine Plasmapherese die Konzentration von Autoantikörpern im Blut

reduzieren und somit unter der Maßgabe, dass die Autoantikörper eine pathogenetische Relevanz haben, die Krankheit auch auf diesem Wege günstig beeinflussen (126). Es ist gut belegt, dass das Einbeziehen der in einer Skelettmuskelbiopsie nachgewiesenen, histomorphologischen Veränderungen die diagnostische Genauigkeit und Präzision der Subtypisierung erhöht (121). Des Weiteren lassen sich bei einem Teil der Patient*innen keine Autoantikörper nachweisen, aufgrund dessen eine weitere morphologische und molekulare Aufarbeitung zur Identifizierung seltener Varianten der DM sinnvoll ist. In der vorliegenden Arbeit beschreiben wir die Identifizierung seltener Subtypen der DM, die sich histologisch durch den Nachweis sog. ektopischer lymphoider follikelartiger Strukturen und molekular durch ein distinktes Zytokin- und Chemokinprofil und eine spezielle Typ-I-Interferon-Signatur auszeichnen, welche wiederum gut mit der Krankheitsaktivität korreliert werden kann (164). Ob diese Varianten der DM mit einem anderen, bisher nicht identifizierten Autoantikörper vergesellschaftet sind, planen wir nun weiter aufzuklären.

Wie sehr moderne molekularpathologische Analyseverfahren unser Verständnis von der Pathogenese und Klassifizierung bestimmter Erkrankungen revolutionieren, lässt sich am Beispiel der neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen (NCL) verdeutlichen. Früher richtete sich die Klassifikation dieser Erkrankungen nach dem Alter der Patient*innen bei Manifestation der jeweiligen Krankheit, z.B. infantile NCL (Hagberg-Santavuori-Krankheit), juvenile NCL (Spielmeyer-Vogt-Krankheit, Batten-Syndrom) und adulte NCL (M. Kufs) (165). Diese Klassifikation wird heute nicht mehr verwendet. Vielmehr werden diese Erkrankungen auf der Grundlage des entsprechenden Gendefekts klassifiziert. Mittlerweile konnten 14 Formen (CLN1 bis CLN14) identifiziert werden (166). Atypische Mutationen in den CLN-Genen können z.B. zu einem späteren Krankheitsbeginn führen (166). Neben der genetischen Identifikation einer bis dato in der wissenschaftlichen Literatur nicht beschriebenen, pathogenen Punktmutation im CLN3-Gen, beschreiben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit das Vorliegen einer autophagischen vakuolären Myopathie (AVM) bei Patienten mit CLN3 und erweitern damit das nosologische Spektrum der AVM.

4. Zusammenfassung

Die Möglichkeiten des Einsatzes von Next-Generation-Sequencing-Technologien (NGS) sind vielseitig. Es können sowohl pathogene genetische Veränderungen monogener Erkrankungen identifiziert als auch die genetische Heterogenität von Tumoren entschlüsselt werden. Dies, erweitert das Verständnis der Pathogenese dieser Erkrankungen und lässt die Klassifikationen bestimmter Entitäten neu definieren.

Ziele dabei sind die Verbesserung der diagnostischen Präzision, die Subtypisierung von Erkrankungen und letztlich auch die Etablierung von in der Klinik einsetzbaren prognostischen und prädiktiven Biomarkern. Dieses Vorgehen bedarf eines Zusammenspiels aus Grundlagen-, translationaler und klinischer Forschung mit dem Ziel der molekularen Charakterisierung und Validierung von Biomarkern, die für eine frühe Detektion, Verlaufskontrolle und möglicherweise Therapieoptimierung eingesetzt werden können.

Die Medizin der Zukunft hat den Anspruch, die bestmögliche therapeutische Wirksamkeit bei gleichzeitiger Reduktion der Nebenwirkungen zu erzielen. So erlauben moderne Hochdurchsatztechnologien die Entschlüsselungen der molekularen Eigenschaften eines Tumors als Grundlage einer zielgerichteten, personalisierten Therapie primärer und sekundärer Hirntumore, in denen individualisierte Behandlungsansätze mit neuen Wirkstoffen oder neuen Kombinationen bekannter Chemotherapeutika in zahlreichen (prä-)klinischen Studien untersucht wurden und werden (45, 82, 95, 99, 108, 110-113, 136, 167, 168).

Die vorliegende Arbeit gibt Einblicke in neue therapeutische Targets, aber auch in Resistenzmechanismen gegenüber neueren, zielgerichteten Therapiekonzepten. Die kompensatorische Expression des proangiogenen Apelin und seines Rezeptors APLNR konnte so als ein möglicher Resistenzmechanismus gegenüber einer VEGFi-Therapie im Glioblastom identifiziert werden. Zudem konnte eine Hochregulation von CD271 in Hirnmetastasen des malignen Melanoms nachgewiesen werden, die in Zusammenhang mit

einer Resistenz von Hirnmetastasen des malignen Melanoms gegenüber BRAFi gebracht wird.

Die Identifikation geeigneter Patient*innen für eine bestimmte Therapie ist abhängig von validen Testverfahren. Daher beschäftigt sich diese Arbeit auch mit dem prädiktiven Schwellenwert der Methylierung des MGMT-Promotors im GBM. So konnten wir mit Hilfe einer klinisch sehr gut charakterisierten großen GBM-Kohorte zeigen, dass der biologische Schwellenwert nur unzureichend mit dem Ansprechen von GBM-Patient*innen auf eine Therapie mit alkylierenden Chemotherapeutika korreliert und dass der prädiktive Schwellenwert deutlich über dem biologischen liegt und daher beim Einschluss in zukünftige klinische Studien berücksichtigt werden sollte.

Ein biologisches Verständnis für die Krankheitsentstehung und -progression ist dabei nicht nur für maligne Erkrankungen essenziell. Die weitere Charakterisierung von Erkrankungen mit Identifizierung distinkter Subtypen sowie die Entschlüsselung bisher unbekannter molekularer Veränderungen ist die Grundlage für diagnostische Präzision und letztlich auch für medikamentöse Responsivität. Die vorliegende Arbeit beschreibt am Beispiel der Dermatomyositis (DM) und der autophagischen vakuolären Myopathie (AVM) wie - und das trifft für alle Teilgebiete der Neuropathologie gleichermaßen zu - mit einer Kombination aus konventioneller Histologie, Immunhistochemie modernen elektronenmikroskopischen Verfahren und Molekularpathologie die zugrundeliegenden genetischen bzw. molekularen Veränderungen analysiert, das nosologischen Spektrum von Erkrankungen erweitert und weitere, möglicherweise prognostisch relevante Subtypen identifiziert werden können.

5. Literaturangaben

1. Wang C, Yue F, Kuang S. Muscle Histology Characterization Using H&E Staining and Muscle Fiber Type Classification Using Immunofluorescence Staining. *Bio Protoc.* 2017;7(10):e2279
2. Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol.* 2019;1897:289-98.
3. Oliva MA, Staffieri S, Castaldo S, Giangaspero F, Esposito V, Arcella A. Characterization of primary glioma cell lines derived from the patients according to 2016 CNS tumour WHO classification and comparison with their parental tumours. *J Neurooncol.* 2021;151(2):123-133.
4. Takei H, Rouah E, Ishida Y. Brain metastasis: clinical characteristics, pathological findings and molecular subtyping for therapeutic implications. *Brain Tumor Pathol.* 2016;33(1):1-12.
5. Li LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Mol Med Rep.* 2015;11(3):1566-72.
6. Klapper W, Fend F, Feller A, Hansmann ML, Moller P, Stein H, et al. [Aggressive Bcell lymphomas : Recommendations from the German Panel of Reference Pathologists in the Competence Network on Malignant Lymphomas on diagnostic procedures according to the current WHO classification, update 2017]. *Pathologe.* 2019;40(2):152-6.
7. Kovacs GG. Molecular pathology of neurodegenerative diseases: principles and practice. *J Clin Pathol.* 2019;72(11):725-35.
8. Weller M. Next generation neuro-oncology. *Eur J Cancer.* 2018;96:1-5.
9. Konig IR, Fuchs O, Hansen G, von Mutius E, Kopp MV. What is precision medicine? *Eur Respir J.* 2017;50(4).
10. Carrasco-Ramiro F, Peiro-Pastor R, Aguado B. Human genomics projects and precision medicine. *Gene Ther.* 2017;24(9):551-61.
11. Ashley EA. Towards precision medicine. *Nat Rev Genet.* 2016;17(9):507-22.
12. Mertens F, Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. The emerging complexity of gene fusions in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(6):371-81.
13. Ben-David U, Amon A. Context is everything: aneuploidy in cancer. *Nat Rev Genet.* 2020;21(1):44-62.
14. Kamps R, Brandao RD, Bosch BJ, Paulussen AD, Xanthoulea S, Blok MJ, et al. Next-Generation Sequencing in Oncology: Genetic Diagnosis, Risk Prediction and Cancer Classification. *Int J Mol Sci.* 2017;18(2):308
15. Meric-Bernstam F, Johnson AM, Dumbrava EEI, Raghav K, Balaji K, Bhatt M, et al. Advances in HER2-Targeted Therapy: Novel Agents and Opportunities Beyond Breast and Gastric Cancer. *Clin Cancer Res.* 2019;25(7):2033-41.

16. Piawah S, Venook AP. Targeted therapy for colorectal cancer metastases: A review of current methods of molecularly targeted therapy and the use of tumor biomarkers in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Cancer*. 2019;125(23):4139-47.
17. Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S, Luttmann S, Stegmaier C, et al. Krebs in Deutschland für 2015/2016. Berlin: Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland. 2019.
18. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016;131(6):803-20.
19. Ostrom QT, Patil N, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013-2017. *Neuro Oncol*. 2020;22(12 Suppl 2):iv1-iv96.
20. Wen PY, Chang SM, Van den Bent MJ, Vogelbaum MA, Macdonald DR, Lee EQ. Response Assessment in Neuro-Oncology Clinical Trials. *J Clin Oncol*. 2017;35(21):2439-49.
21. Weller M, van den Bent M, Tonn JC, Stupp R, Preusser M, Cohen-Jonathan-Moyal E, et al. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Lancet Oncol*. 2017;18(6):e315-e29.
22. Moravan MJ, Fecci PE, Anders CK, Clarke JM, Salama AKS, Adamson JD, et al. Current multidisciplinary management of brain metastases. *Cancer*. 2020;126(7):1390-406.
23. Robert-Koch-Institut. Krebs des Zentralen Nervensystems [Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Zentrales_Nervensystem/krebs_zentrales_nervensystem_node.html?sessionid=4E731E3CAD8C90E7AACC386EC0E73E4D.1_cid363. Stand: 17.12.2019; Abgerufen am: 11.02.2021
24. Udaka YT, Packer RJ. Pediatric Brain Tumors. *Neurol Clin*. 2018;36(3):533-56.
25. Kraywinkel K, Spix C. Epidemiologie primärer Hirntumoren bei Kindern und Erwachsenen in Deutschland. *Der Onkologe*. 2019;25(1):5-9.
26. Wirsching HG, Galanis E, Weller M. Glioblastoma. *Handb Clin Neurol*. 2016;134:381-97.
27. Onken J, Vajkoczy P, Torika R, Hempt C, Patsouris V, Heppner FL, et al. Phospho-AXL is widely expressed in glioblastoma and associated with significant shorter overall survival. *Oncotarget*. 2017;8(31):50403-14.
28. Radke J, Bortolussi G, Pagenstecher A. Akt and c-Myc induce stem-cell markers in mature primary p53(-)/(-) astrocytes and render these cells gliomagenic in the brain of immunocompetent mice. *PLoS one*. 2013;8(2):e56691.
29. Leibetseder A, Ackerl M, Flechl B, Wohrer A, Widhalm G, Dieckmann K, et al. Outcome and molecular characteristics of adolescent and young adult patients with newly diagnosed primary glioblastoma: a study of the Society of Austrian Neurooncology (SANO). *Neuro Oncol*. 2013;15(1):112-21.

30. Goldbrunner R, Ruge M, Kocher M, Lucas CW, Galldiks N, Grau S. The Treatment of Gliomas in Adulthood. *Dtsch Arztebl Int.* 2018;115(20-21):356-64.
31. Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol.* 2009;174(4):1149-53.
32. Mehrjardi NZ, Hanggi D, Kahlert UD. Current biomarker-associated procedures of cancer modeling-a reference in the context of IDH1 mutant glioma. *Cell Death Dis.* 2020;11(11):998.
33. Huang LE. Friend or foe-IDH1 mutations in glioma 10 years on. *Carcinogenesis.* 2019;40(11):1299-307.
34. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 2009;360(8):765-73.
35. Capper D, Reuss D, Schittenhelm J, Hartmann C, Bremer J, Sahm F, et al. Mutation-specific IDH1 antibody differentiates oligodendrogliomas and oligoastrocytomas from other brain tumors with oligodendroglioma-like morphology. *Acta Neuropathol.* 2011;121(2):241-52.
36. Kloosterhof NK, Bralten LB, Dubbink HJ, French PJ, van den Bent MJ. Isocitrate dehydrogenase-1 mutations: a fundamentally new understanding of diffuse glioma? *Lancet Oncol.* 2011;12(1):83-91.
37. Mu L, Xu W, Li Q, Ge H, Bao H, Xia S, et al. IDH1 R132H Mutation Is Accompanied with Malignant Progression of Paired Primary-Recurrent Astrocytic Tumours. *J Cancer.* 2017;8(14):2704-12.
38. Radke J, Koch A, Pritsch F, Schumann E, Misch M, Hempt C, et al. Predictive MGMT status in a homogeneous cohort of IDH wildtype glioblastoma patients. *Acta Neuropathol Commun.* 2019;7(1):89.
39. Li S, Chou AP, Chen W, Chen R, Deng Y, Phillips HS, et al. Overexpression of isocitrate dehydrogenase mutant proteins renders glioma cells more sensitive to radiation. *Neuro Oncol.* 2013;15(1):57-68.
40. Brat DJ, Van Meir EG. Glomeruloid microvascular proliferation orchestrated by VPF/VEGF: a new world of angiogenesis research. *Am J Pathol.* 2001;158(3):789-96.
41. Das S, Marsden PA. Angiogenesis in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2013;369(16):1561-3.
42. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 1992;359(6398):843-5
43. Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature.* 1992;359(6398):845-8
44. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2013;19(4):764-72.

45. An Z, Aksoy O, Zheng T, Fan QW, Weiss WA. Epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma: signaling pathways and targeted therapies. *Oncogene*. 2018;37(12):1561-75.
46. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*. 2009;10(5):459-66.
47. Yerukala Sathipati S, Huang HL, Ho SY. Estimating survival time of patients with glioblastoma multiforme and characterization of the identified microRNA signatures. *BMC Genomics*. 2016;17(Suppl 13):1022.
48. Nonoguchi N, Ohta T, Oh JE, Kim YH, Kleihues P, Ohgaki H. TERT promoter mutations in primary and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol*. 2013;126(6):931-7.
49. Dratwa M, Wysoczanska B, Lacina P, Kubik T, Bogunia-Kubik K. TERT-Regulation and Roles in Cancer Formation. *Front Immunol*. 2020;11:589929.
50. Schulze Heuling E, Knab F, Radke J, Eskilsson E, Martinez-Ledesma E, Koch A, et al. Prognostic Relevance of Tumor Purity and Interaction with MGMT Methylation in Glioblastoma. *Mol Cancer Res*. 2017;15(5):532-40.
51. Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, Campos B, Nounshmehr H, Salama SR, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*. 2013;155(2):462-77.
52. Labussiere M, Di Stefano AL, Gleize V, Boisselier B, Giry M, Mangesius S, et al. TERT promoter mutations in gliomas, genetic associations and clinico-pathological correlations. *Br J Cancer*. 2014;111(10):2024-32.
53. Gao K, Li G, Qu Y, Wang M, Cui B, Ji M, et al. TERT promoter mutations and long telomere length predict poor survival and radiotherapy resistance in gliomas. *Oncotarget*. 2016;7(8):8712-25.
54. Xu H, Zong H, Ma C, Ming X, Shang M, Li K, et al. Epidermal growth factor receptor in glioblastoma. *Oncol Lett*. 2017;14(1):512-6.
55. Furnari FB, Cloughesy TF, Cavenee WK, Mischel PS. Heterogeneity of epidermal growth factor receptor signalling networks in glioblastoma. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(5):302-10.
56. Guo G, Gong K, Wohlfeld B, Hatanpaa KJ, Zhao D, Habib AA. Ligand-Independent EGFR Signaling. *Cancer Res*. 2015;75(17):3436-41.
57. Brat DJ, Aldape K, Colman H, Holland EC, Louis DN, R Jenkins RB, et al. cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for "Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV". *Acta Neuropathol*. 2018;136(5):805-810.
58. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol*. 2021;23(8):1231-125.
59. Hamisch C, Ruge M, Kellermann S, Kohl AC, Duval I, Goldbrunner R, et al. Impact of treatment on survival of patients with secondary glioblastoma. *J Neurooncol*. 2017;133(2):309-13.

60. Liu Y, Lang F, Chou FJ, Zaghoul KA, Yang C. Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Glioma: Genetics, Biochemistry, and Clinical Indications. *Biomedicines*. 2020;8(9):294.
61. Ohba S, Kuwahara K, Yamada S, Abe M, Hirose Y. Correlation between IDH, ATRX, and TERT promoter mutations in glioma. *Brain Tumor Pathol*. 2020;37(2):33-40.
62. Liu XY, Gerges N, Korshunov A, Sabha N, Khuong-Quang DA, Fontebasso AM, et al. Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. *Acta Neuropathol*. 2012;124(5):615-25.
63. Seifert M, Schackert G, Temme A, Schrock E, Deutsch A, Klink B. Molecular Characterization of Astrocytoma Progression Towards Secondary Glioblastomas Utilizing Patient-Matched Tumor Pairs. *Cancers (Basel)*. 2020;12(6):1696.
64. Zhang Y, Dube C, Gibert M, Jr., Cruickshanks N, Wang B, Coughlan M, et al. The p53 Pathway in Glioblastoma. *Cancers (Basel)*. 2018;10(9):297.
65. Orr BA, Clay MR, Pinto EM, Kesserwan C. An update on the central nervous system manifestations of Li-Fraumeni syndrome. *Acta Neuropathol*. 2020;139(4):669-87.
66. Nguyen TT, Savory JG, Brooke-Bisschop T, Ringuette R, Foley T, Hess BL, et al. Cdx2 Regulates Gene Expression through Recruitment of Brg1-associated Switch-Sucrose Non-fermentable (SWI-SNF) Chromatin Remodeling Activity. *J Biol Chem*. 2017;292(8):3389-99.
67. Malzkorn B, Reifenberger G. Integrated diagnostics of diffuse astrocytic and oligodendroglial tumors. *Pathologe*. 2019;40(Suppl 1):9-17.
68. Costa E, Lawson TM, Lelotte J, Fomekong E, Vaz RG, Renard L, et al. Long-term survival after glioblastoma resection: hope despite poor prognosis factors. *J Neurosurg Sci*. 2019;63(3):251-257.
69. Kreth FW, Thon N, Simon M, Westphal M, Schackert G, Nikkhah G, et al. Gross total but not incomplete resection of glioblastoma prolongs survival in the era of radiochemotherapy. *Ann Oncol*. 2013;24(12):3117-23.
70. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):987-96.
71. Nassiri F, Taslimi S, Wang JZ, Badhiwala JH, Dalcourt T, Ijad N, et al. Determining the Optimal Adjuvant Therapy for Improving Survival in Elderly Patients with Glioblastoma: A Systematic Review and Network Meta-analysis. *Clin Cancer Res*. 2020;26(11):2664-72.
72. Brigliadori G, Goffredo G, Bartolini D, Tosatto L, Gurrieri L, Mercatali L, et al. Influence of Intratumor Heterogeneity on the Predictivity of MGMT Gene Promoter Methylation Status in Glioblastoma. *Front Oncol*. 2020;10:533000.
73. Cao VT, Jung TY, Jung S, Jin SG, Moon KS, Kim IY, et al. The correlation and prognostic significance of MGMT promoter methylation and MGMT protein in glioblastomas. *Neurosurgery*. 2009;65(5):866-75.
74. Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, et al. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes

- in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol*. 2008;26(25):4189-99.
75. Parker NR, Hudson AL, Khong P, Parkinson JF, Dwight T, Ikin RJ, et al. Intratumoral heterogeneity identified at the epigenetic, genetic and transcriptional level in glioblastoma. *Sci Rep*. 2016;6:22477.
 76. Shah N, Lin B, Sibenaller Z, Ryken T, Lee H, Yoon JG, et al. Comprehensive analysis of MGMT promoter methylation: correlation with MGMT expression and clinical response in GBM. *PloS one*. 2011;6(1):e16146.
 77. Wick W, Weller M, van den Bent M, Sanson M, Weiler M, von Deimling A, et al. MGMT testing--the challenges for biomarker-based glioma treatment. *Nat Rev Neurol*. 2014;10(7):372-85.
 78. Mansouri A, Hachem LD, Mansouri S, Nassiri F, Laperriere NJ, Xia D, et al. MGMT promoter methylation status testing to guide therapy for glioblastoma: refining the approach based on emerging evidence and current challenges. *Neuro Oncol*. 2019;21(2):167-78.
 79. Baumert BG, Hegi ME, van den Bent MJ, von Deimling A, Gorlia T, Hoang-Xuan K, et al. Temozolomide chemotherapy versus radiotherapy in high-risk low-grade glioma (EORTC 22033-26033): a randomised, open-label, phase 3 intergroup study. *The Lancet Oncol*. 2016;17(11):1521-32.
 80. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):997-1003.
 81. Bady P, Sciuscio D, Diserens AC, Bloch J, van den Bent MJ, Marosi C, et al. MGMT methylation analysis of glioblastoma on the Infinium methylation BeadChip identifies two distinct CpG regions associated with gene silencing and outcome, yielding a prediction model for comparisons across datasets, tumor grades, and CIMP-status. *Acta Neuropathol*. 2012;124(4):547-60.
 82. Tzaridis T, Schafer N, Weller J, Steinbach JP, Schlegel U, Seidel S, et al. MGMT promoter methylation analysis for allocating combined CCNU/TMZ chemotherapy: Lessons learned from the CeTeG/NOA-09 trial. *Int J Cancer*. 2021;148(7):1695-1707.
 83. Christians A, Hartmann C, Benner A, Meyer J, von Deimling A, Weller M, et al. Prognostic value of three different methods of MGMT promoter methylation analysis in a prospective trial on newly diagnosed glioblastoma. *PloS one*. 2012;7(3):e33449.
 84. Karayan-Tapon L, Quillien V, Guilhot J, Wager M, Fromont G, Saikali S, et al. Prognostic value of O6-methylguanine-DNA methyltransferase status in glioblastoma patients, assessed by five different methods. *J Neurooncol*. 2010;97(3):311-22.
 85. Reifenberger G, Hentschel B, Felsberg J, Schackert G, Simon M, Schnell O, et al. Predictive impact of MGMT promoter methylation in glioblastoma of the elderly. *Int J Cancer*. 2012;131(6):1342-50.
 86. Bienkowski M, Berghoff AS, Marosi C, Wohrer A, Heinzl H, Hainfellner JA, et al. Clinical Neuropathology practice guide 5-2015: MGMT methylation pyrosequencing in glioblastoma: unresolved issues and open questions. *Clin Neuropathol*. 2015;34(5):250-7.

87. Watts GS, Pieper RO, Costello JF, Peng YM, Dalton WS, Futscher BW. Methylation of discrete regions of the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) CpG island is associated with heterochromatinization of the MGMT transcription start site and silencing of the gene. *Mol Cell Biol.* 1997;17(9):5612-9.
88. Qian XC, Brent TP. Methylation hot spots in the 5' flanking region denote silencing of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Cancer Res.* 1997;57(17):3672-7.
89. Everhard S, Tost J, El Abdalaoui H, Criniere E, Busato F, Marie Y, et al. Identification of regions correlating MGMT promoter methylation and gene expression in glioblastomas. *Neuro Oncol.* 2009;11(4):348-56.
90. Preusser M, Charles Janzer R, Felsberg J, Reifenberger G, Hamou MF, Diserens AC, et al. Anti-O6-methylguanine-methyltransferase (MGMT) immunohistochemistry in glioblastoma multiforme: observer variability and lack of association with patient survival impede its use as clinical biomarker. *Brain Pathol.* 2008;18(4):520-32.
91. Wick W, Platten M, Meisner C, Felsberg J, Tabatabai G, Simon M, et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(7):707-15.
92. Malmstrom A, Gronberg BH, Marosi C, Stupp R, Frappaz D, Schultz H, et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(9):916-26.
93. Gallego Perez-Larraya J, Ducray F, Chinot O, Catry-Thomas I, Taillandier L, Guillamo JS, et al. Temozolomide in elderly patients with newly diagnosed glioblastoma and poor performance status: an ANOCEF phase II trial. *J Clin Oncol.* 2011;29(22):3050-5.
94. Wiestler B, Capper D, Hovestadt V, Sill M, Jones DT, Hartmann C, et al. Assessing CpG island methylator phenotype, 1p/19q codeletion, and MGMT promoter methylation from epigenome-wide data in the biomarker cohort of the NOA-04 trial. *Neuro Oncol.* 2014;16(12):1630-8.
95. Herrlinger U, Tzaridis T, Mack F, Steinbach JP, Schlegel U, Sabel M, et al. Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CeTeG/NOA-09): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 2019;393(10172):678-88.
96. Kienast Y, von Baumgarten L, Fuhrmann M, Klinkert WE, Goldbrunner R, Herms J, et al. Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat Med.* 2010;16(1):116-22.
97. Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med.* 2006;12(8):895-904.
98. Schmieder K, Keilholz U, Combs S. The Interdisciplinary Management of Brain Metastases. *Dtsch Arztebl Int.* 2016;113(24):415-21.
99. Achrol AS, Rennert RC, Anders C, Soffietti R, Ahluwalia MS, Nayak L, et al. Brain metastases. *Nat Rev Dis Primers.* 2019;5(1):5.

100. Davies MA, Liu P, McIntyre S, Kim KB, Papadopoulos N, Hwu WJ, et al. Prognostic factors for survival in melanoma patients with brain metastases. *Cancer*. 2011;117(8):1687-96.
101. Glitza Oliva I, Tawbi H, Davies MA. Melanoma Brain Metastases: Current Areas of Investigation and Future Directions. *Cancer J*. 2017;23(1):68-74.
102. Radke J, Rossner F, Redmer T. CD271 determines migratory properties of melanoma cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):9834.
103. Boire A, Brastianos PK, Garzia L, Valiente M. Brain metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2020;20(1):4-11.
104. Scala S, Ottaiano A, Ascierto PA, Cavalli M, Simeone E, Giuliano P, et al. Expression of CXCR4 predicts poor prognosis in patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res*. 2005;11(5):1835-41.
105. Kim M, Koh YJ, Kim KE, Koh BI, Nam DH, Alitalo K, et al. CXCR4 signaling regulates metastasis of chemoresistant melanoma cells by a lymphatic metastatic niche. *Cancer Res*. 2010;70(24):10411-21.
106. Ngo M, Han A, Lakatos A, Sahoo D, Hachey SJ, Weiskopf K, et al. Antibody Therapy Targeting CD47 and CD271 Effectively Suppresses Melanoma Metastasis in Patient-Derived Xenografts. *Cell Rep*. 2016;16(6):1701-16.
107. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2507-16.
108. Long GV, Trefzer U, Davies MA, Kefford RF, Ascierto PA, Chapman PB, et al. Dabrafenib in patients with Val600Glu or Val600Lys BRAF-mutant melanoma metastatic to the brain (BREAK-MB): a multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2012;13(11):1087-95.
109. Davies MA, Saiag P, Robert C, Grob JJ, Flaherty KT, Arance A, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with BRAF(V600)-mutant melanoma brain metastases (COMBI-MB): a multicentre, multicohort, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(7):863-73.
110. Brown NF, Carter T, Kitchen N, Mulholland P. Dabrafenib and trametinib in BRAFV600E mutated glioma. *CNS Oncol*. 2017;6(4):291-6.
111. Bernstein A, Mrowczynski OD, Greene A, Ryan S, Chung C, Zacharia BE, et al. Dual BRAF/MEK therapy in BRAF V600E-mutated primary brain tumors: a case series showing dramatic clinical and radiographic responses and a reduction in cutaneous toxicity. *J Neurosurg*. 2019:1-6.
112. Tawbi HA, Forsyth PA, Algazi A, Hamid O, Hodi FS, Moschos SJ, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab in Melanoma Metastatic to the Brain. *N Engl J Med*. 2018;379(8):722-30.
113. Drilon A, Siena S, Ou SI, Patel M, Ahn MJ, Lee J, et al. Safety and Antitumor Activity of the Multitargeted Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor Entrectinib: Combined Results from Two Phase I Trials (ALKA-372-001 and STARTRK-1). *Cancer Discov*. 2017;7(4):400-9.

114. Pavlidis N, Pentheroudakis G. Cancer of unknown primary site: 20 questions to be answered. *Ann Oncol.* 2010;21 Suppl 7:vii303-7.
115. Radke J, Stenzel W, Goebel HH. Recently Identified Congenital Myopathies. *Semin Pediatr Neurol.* 2019;29:83-90.
116. Rocha ML, Dittmayer C, Uruha A, Korinth D, Chaoui R, Schlembach D, et al. A novel mutation in NEB causing foetal nemaline myopathy with arthrogyriposis during early gestation. *Neuromuscul Disord.* 2021 Mar;31(3):239-245
117. Nishino I. Autophagic vacuolar myopathy. *Semin Pediatr Neurol.* 2006;13(2):90-5.
118. Radke J, Koll R, Gill E, Wiese L, Schulz A, Kohlschutter A, et al. Autophagic vacuolar myopathy is a common feature of CLN3 disease. *Ann Clin Transl Neurol.* 2018;5(11):1385-93.
119. Licchetta L, Bisulli F, Fietz M, Valentino ML, Morbin M, Mostacci B, et al. A novel mutation of Cln3 associated with delayed-classic juvenile ceroid lipofuscinosis and autophagic vacuolar myopathy. *Eur J Med Genet.* 2015;58(10):540-4.
120. Cortese A, Tucci A, Piccolo G, Galimberti CA, Fratta P, Marchioni E, et al. Novel CLN3 mutation causing autophagic vacuolar myopathy. *Neurology.* 2014;82(23):2072-6.
121. Benveniste O, Goebel HH, Stenzel W. Biomarkers in Inflammatory Myopathies-An Expanded Definition. *Front Neurol.* 2019;10:554.
122. Tanboon J, Uruha A, Stenzel W, Nishino I. Where are we moving in the classification of idiopathic inflammatory myopathies? *Curr Opin Neurol.* 2020;33(5):590-603.
123. Radke J, Koll R, Preusse C, Pehl D, Todorova K, Schonemann C, et al. Architectural B-cell organization in skeletal muscle identifies subtypes of dermatomyositis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2018;5(3):e451.
124. Allenbach Y, Benveniste O, Goebel HH, Stenzel W. Integrated classification of inflammatory myopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2017;43(1):62-81.
125. Hida A, Yamashita T, Hosono Y, Inoue M, Kaida K, Kadoya M, et al. Anti-TIF1-gamma antibody and cancer-associated myositis: A clinicohistopathologic study. *Neurology.* 2016;87(3):299-308.
126. Mammen AL, Allenbach Y, Stenzel W, Benveniste O, Group EtWS. 239th ENMC International Workshop: Classification of dermatomyositis, Amsterdam, the Netherlands, 14-16 December 2018. *Neuromuscul Disord.* 2020;30(1):70-92.
127. Schiller M, Bohm M, Hensen P, Riemann H, Luger TA, Nashan D. Dermatomyositis associated with malignant melanoma--a marker of poor prognosis? *J Am Acad Dermatol.* 2006;54(2):221-6.
128. Mariampillai K, Granger B, Amelin D, Guiguet M, Hachulla E, Maurier F, et al. Development of a New Classification System for Idiopathic Inflammatory Myopathies Based on Clinical Manifestations and Myositis-Specific Autoantibodies. *JAMA Neurol.* 2018;75(12):1528-37.
129. Allenbach Y, Leroux G, Suarez-Calvet X, Preusse C, Gallardo E, Hervier B, et al. Dermatomyositis With or Without Anti-Melanoma Differentiation-Associated Gene 5

- Antibodies: Common Interferon Signature but Distinct NOS2 Expression. *Am J Pathol*. 2016;186(3):691-700.
130. Bolko L, Gitiaux C, Allenbach Y. [Dermatomyositis: new antibody, new classification]. *Med Sci (Paris)*. 2019;35(2):18-23.
 131. Sasaki H, Kohsaka H. Current diagnosis and treatment of polymyositis and dermatomyositis. *Mod Rheumatol*. 2018;28(6):913-21.
 132. Holmes DI, Zachary I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biol*. 2005;6(2):209.
 133. Hata N, Yoshimoto K, Hatae R, Kuga D, Akagi Y, Sangatsuda Y, et al. Add-on bevacizumab can prevent early clinical deterioration and prolong survival in newly diagnosed partially resected glioblastoma patients with a poor performance status. *Onco Targets Ther*. 2017;10:429-37.
 134. Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, et al. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med*. 2014;370(8):699-708.
 135. Malkki H. Neuro-oncology: Bevacizumab prolongs progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed glioblastoma. *Nat Rev Neurol*. 2014;10(4):179.
 136. Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, et al. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med*. 2014;370(8):709-22.
 137. Kim MM, Umemura Y, Leung D. Bevacizumab and Glioblastoma: Past, Present, and Future Directions. *Cancer J*. 2018;24(4):180-6.
 138. Shimizu T, Ishida J, Kurozumi K, Ichikawa T, Otani Y, Oka T, et al. delta-Catenin Promotes Bevacizumab-Induced Glioma Invasion. *Mol Cancer Ther*. 2019;18(4):812-22.
 139. Redmer T. Deciphering mechanisms of brain metastasis in melanoma - the gist of the matter. *Mol Cancer*. 2018;17(1):106.
 140. Guo R, Fierro-Fine A, Goddard L, Russell M, Chen J, Liu CZ, et al. Increased expression of melanoma stem cell marker CD271 in metastatic melanoma to the brain. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(12):8947-51.
 141. Vidal A, Redmer T. Decoding the Role of CD271 in Melanoma. *Cancers (Basel)*. 2020;12(9):2460
 142. Satoh M, Tanaka S, Ceribelli A, Calise SJ, Chan EK. A Comprehensive Overview on Myositis-Specific Antibodies: New and Old Biomarkers in Idiopathic Inflammatory Myopathy. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2017;52(1):1-19.
 143. Jackson SE, Chester JD. Personalised cancer medicine. *Int J Cancer*. 2015;137(2):262-6.
 144. Tsimberidou AM, Fountzilias E, Nikanjam M, Kurzrock R. Review of precision cancer medicine: Evolution of the treatment paradigm. *Cancer Treat Rev*. 2020;86:102019.

145. Kalia M. Biomarkers for personalized oncology: recent advances and future challenges. *Metabolism*. 2015;64(3 Suppl 1):S16-21.
146. Pardridge WM. Drug transport across the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012;32(11):1959-72.
147. Mega A, Hartmark Nilsen M, Leiss LW, Tobin NP, Miletic H, Sleire L, et al. Astrocytes enhance glioblastoma growth. *Glia*. 2020;68(2):316-27.
148. Klein A, Schwartz H, Sagi-Assif O, Meshel T, Izraely S, Ben Menachem S, et al. Astrocytes facilitate melanoma brain metastasis via secretion of IL-23. *J Pathol*. 2015;236(1):116-27.
149. Neftel C, Laffy J, Filbin MG, Hara T, Shore ME, Rahme GJ, et al. An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma. *Cell*. 2019;178(4):835-49 e21.
150. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010;17(1):98-110.
151. Mastrella G, Hou M, Li M, Stoecklein VM, Zdouc N, Volmar MNM, et al. Targeting APLN/APLNR Improves Antiangiogenic Efficiency and Blunts Proinvasive Side Effects of VEGFA/VEGFR2 Blockade in Glioblastoma. *Cancer Res*. 2019;79(9):2298-313.
152. Frisch A, Kalin S, Monk R, Radke J, Heppner FL, Kalin RE. Apelin Controls Angiogenesis-Dependent Glioblastoma Growth. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11):4179.
153. Hegi ME, Genbrugge E, Gorlia T, Stupp R, Gilbert MR, Chinot OL, et al. MGMT Promoter Methylation Cutoff with Safety Margin for Selecting Glioblastoma Patients into Trials Omitting Temozolomide: A Pooled Analysis of Four Clinical Trials. *Clin Cancer Res*. 2019;25(6):1809-16.
154. Lakin N, Rulach R, Nowicki S, Kurian KM. Current Advances in Checkpoint Inhibitors: Lessons from Non-Central Nervous System Cancers and Potential for Glioblastoma. *Front Oncol*. 2017;7:141.
155. Long GV, Atkinson V, Lo S, Sandhu S, Guminski AD, Brown MP, et al. Combination nivolumab and ipilimumab or nivolumab alone in melanoma brain metastases: a multicentre randomised phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2018;19(5):672-81.
156. Omuro A, Vlahovic G, Lim M, Sahebjam S, Baehring J, Cloughesy T, et al. Nivolumab with or without ipilimumab in patients with recurrent glioblastoma: results from exploratory phase I cohorts of CheckMate 143. *Neuro Oncol*. 2018;20(5):674-86.
157. Maraka S, Janku F. BRAF alterations in primary brain tumors. *Discov Med*. 2018;26(141):51-60.
158. Schreck KC, Guajardo A, Lin DDM, Eberhart CG, Grossman SA. Concurrent BRAF/MEK Inhibitors in BRAF V600-Mutant High-Grade Primary Brain Tumors. *J Natl Compr Canc Netw*. 2018;16(4):343-7.
159. Spagnolo F, Ghiorzo P, Orgiano L, Pastorino L, Picasso V, Tornari E, et al. BRAF-mutant melanoma: treatment approaches, resistance mechanisms, and diagnostic strategies. *Onco Targets Ther*. 2015;8:157-68.

160. Alqathama A. BRAF in malignant melanoma progression and metastasis: potentials and challenges. *Am J Cancer Res.* 2020;10(4):1103-14.
161. Drago JZ, Lawrence D, Livingstone E, Zimmer L, Chen T, Giobbie-Hurder A, et al. Clinical experience with combination BRAF/MEK inhibitors for melanoma with brain metastases: a real-life multicenter study. *Melanoma Res.* 2019;29(1):65-9.
162. Haueis SA, Kranzlin P, Mangana J, Cheng PF, Urosevic-Maiwald M, Braun RP, et al. Does the distribution pattern of brain metastases during BRAF inhibitor therapy reflect phenotype switching? *Melanoma Res.* 2017;27(3):231-7.
163. Lehraiki A, Cerezo M, Rouaud F, Abbe P, Allegra M, Kluza J, et al. Increased CD271 expression by the NF- κ B pathway promotes melanoma cell survival and drives acquired resistance to BRAF inhibitor vemurafenib. *Cell Discov.* 2015;1:15030.
164. Greenberg SA, Higgs BW, Morehouse C, Walsh RJ, Kong SW, Brohawn P, et al. Relationship between disease activity and type 1 interferon- and other cytokine-inducible gene expression in blood in dermatomyositis and polymyositis. *Genes Immun.* 2012;13(3):207-13.
165. Goebel HH, Zeman W, Patel VK, Pullarkat RK, Lenard HG. On the ultrastructural diversity and essence of residual bodies in neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Mech Ageing Dev.* 1979;10(1-2):53-70.
166. Radke J, Stenzel W, Goebel HH. Human NCL Neuropathology. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(10 Pt B):2262-6.
167. Dong M, Xiao Q, Hu J, Cheng F, Zhang P, Zong W, et al. Targeting LRIG2 overcomes resistance to EGFR inhibitor in glioblastoma by modulating GAS6/AXL/SRC signaling. *Cancer Gene Ther.* 2020;27(12):878-97.
168. Wick W, Dettmer S, Berberich A, Kessler T, Karapanagiotou-Schenkel I, Wick A, et al. N2M2 (NOA-20) phase I/II trial of molecularly matched targeted therapies plus radiotherapy in patients with newly diagnosed non-MGMT hypermethylated glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2019;21(1):95-105.

Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Chef, Herrn Prof. Dr. Frank Heppner, für die Unterstützung und Förderung meiner klinischen und wissenschaftlichen Entwicklung.

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Duska Dragun und dem *BIH Charité Clinician Scientist Program*, welches mir protektierte Forschungszeit im Labor ermöglichte. Frau Prof. Dr. Angelika Eggert in Ihrer Funktion als Sprecherin des Deutschen Konsortiums für Translationale Krebsforschung (DKTK) am Standort Berlin möchte ich für ihr stetiges Engagement in der Förderung junger Wissenschaftler*innen danken.

Ich bedanke mich bei meinem Mitarbeiterinnen Randi Koll, Elisa Schumann und Fabienne Pritsch für ihren Einsatz und ihre fachliche wie freundschaftliche Unterstützung.

Ich möchte meinen Kolleg*innen in der Neuropathologie sowie meinen Kooperationspartner*innen an der Charité für die Zusammenarbeit und den fachlichen Austausch danken. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.-H. Goebel, PD Dr. Julia Onken, Dr. Torben Redmer, Dr. Helena Radbruch, Dr. Debora Pehl, Anja Osterloh, Prof. Dr. Werner Stenzel, PD Dr. Arend Koch und Petra Matylewski.

Meinen lieben Freund*innen gilt großer Dank für die Motivation, Unterstützung und Wegbegleitung.

Vor allem aber möchte ich meinem Mann, meinen Eltern und meiner Schwester danken, die mich auch in schwierigen Zeiten bedingungslos unterstützt haben, oft mit großem Verzicht auf gemeinsame Zeit.

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