

Aus dem Institut für Neuropathologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Molekulare Analyse der primären Neoplasien des  
Hypophysenhinterlappens**

**Molecular analysis of the primary neoplasms of the posterior  
pituitary lobe**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Simone Schmid

Datum der Promotion: 03.03.2023

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	iii
Abkürzungsverzeichnis .....	iv
Zusammenfassung .....	1
1 Einleitung .....	4
1.1 Neuroanatomie des Hypophysenhinterlappens .....	4
1.1.1 Embryonale Entwicklung der Hypophyse .....	4
1.1.2 Zellulärer Aufbau des Hypophysenhinterlappens .....	4
1.1.2.1 Pituizyten .....	5
1.1.2.2 Axone der Nuclei supraopticus und paraventricularis .....	7
1.1.2.3 Folliculostellare Zellen .....	8
1.1.2.4 Vaskuläre und perivaskuläre Strukturen .....	9
1.2 Primäre Neoplasien des Hypophysenhinterlappens .....	9
1.2.1 Pituizytome .....	9
1.2.2 Spindelzellonkozytome .....	10
1.2.3 Granularzelltumore der Neurohypophyse .....	11
1.2.4 TTF1 Expression als gemeinsames Merkmal .....	12
1.3 Molekulare Charakterisierung .....	13
1.3.1 DNA-Methylierung in der Tumordiagnostik .....	14
1.4 Fragestellung .....	15
2 Material und Methoden .....	16
2.1 Gewebeproben .....	16
2.2 Auswertung von Gewebeschnitten am Mikroskop und als gescannter Ganzgewebeschnitt (Whole slide image) .....	17
2.3 Arraybasierte DNA-Methylierungsanalyse .....	17
2.3.1 Theorie und Chipdesign .....	18
2.3.2 Berechnung der Brain Tumor Classifier Scores .....	19
2.4 Auswertung der DNA-Methylierungsdaten .....	20
2.4.1 Einarbeitung in R .....	20
2.4.2 Kontrolle und Anleitung durch erfahrene Anwender .....	20
2.5 Unsupervidierte hierarchische Clusteranalyse .....	21
2.6 t-distributed stochastic neighbour embedding (tSNE) .....	21
2.7 Analyse der chromosomalen Kopiezahlvariation (CNV) .....	22
2.8 Differentially methylated regions und Genset-Analyse .....	22
2.9 Targeted DNA next generation sequencing .....	22
2.10 Analyse des progressionsfreien Überlebens .....	22

---

3	Ergebnisse .....	23
3.1	Auswertung der histologischen Merkmale .....	23
3.2	Molekulare Auswertung .....	25
3.2.1	Spindelzellonkozytome und Pituizytome zeigen MAPK/PI3K Signalweg- und epigenetische Regulator-Mutationen .....	25
3.2.2	DNA-Methylierungsprofilierung deutet auf zwei Hauptuntergruppen von Hypophysenhinterlappentumoren hin .....	28
3.2.3	Chromosomale Kopiezahlvariation .....	31
3.3	Analyse des progressionsfreien Überlebens .....	33
3.3.1	Spindelzellonkozytome mit chromosomalen Kopiezahlvariationen wiesen die höchste Rezidivrate auf. ....	33
3.3.2	Integrierte histomolekulare Klassifizierung verbessert die Einteilung von Hypophysenhinterlappentumoren in prognostische Gruppen .....	35
4	Diskussion .....	36
4.1	Kurze Zusammenfassung unserer Ergebnisse .....	36
4.2	Interpretation der Ergebnisse .....	37
4.3	Einbettung der Ergebnisse in den bisherigen Forschungsstand .....	38
4.4	Stärken und Schwächen der Arbeit .....	40
4.4.1	Bias in retrospektiven Fallserien .....	40
4.4.2	Wert von retrospektiven Fallserien .....	42
4.5	Implikationen für Praxis und zukünftige Forschung .....	43
4.5.1	Veränderungen der Klassifikation und Diagnostik von Hypophysenhinterlappentumoren seit der Einführung der WHO-Klassifikation .....	43
4.5.2	Konsequenzen für die Routinediagnostik .....	45
4.5.3	Wie wird dies finanziert? .....	46
4.5.4	Werden wir in Zukunft NGS und weitere molekulare Analysen von jedem Hypophysenhinterlappentumor durchführen? .....	47
4.5.5	Zukünftige Forschung .....	47
5	Schlussfolgerungen .....	50
	Literaturverzeichnis .....	51
	Eidesstattliche Versicherung .....	64
	Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen .....	65
	Journal Summary List .....	67
	Druckexemplar/e der ausgewählten Publikation/en .....	68
	Lebenslauf .....	68
	Komplette Publikationsliste .....	71
	Persönliche Danksagung .....	74

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Neuroanatomie des Hypophysenhinterlappens.....	5
Abbildung 2:: TTF1 Expression im fetalen Gehirn. ....	12
Abbildung 3: Durchgeführte Analysen .....	16
Abbildung 4: Histologie der Hypophysenhinterlappentumoren.....	24
Abbildung 5: Unsupervidiertes hierarchisches Clustering der DNA Methylierungsdaten .....	27
Abbildung 6: t-distributed stochastic neighbour embedding (tSNE) der DNA Methylierungsdaten .....	29
Abbildung 7: Stabilität von Kopiezahlveränderung an exemplarischen Fällen.....	32
Abbildung 8: Kaplan Meier Kurven zum progressionsfreien Überleben.....	34
Abbildung 9: Vorgeschlagene neue histomolekulare Subtypen der Hypophysenhinterlappentumoren.....	36
Abbildung 10: Piktogramm zu den vorgeschlagenen neuen histomolekularen Subtypen .....	37
Abbildung 11: Kaplan Meier Kurven zum progressionsfreien Überleben nach Ausschluss der Rezidive und unklaren Fälle .....	41
Abbildung 12: Primärer papillärer epithelialer Tumor der Sella.....	49

## Abkürzungsverzeichnis

ADH .....	Antidiuretisches Hormon
BfArM .....	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BIH .....	Berlin Institute of Health
bp .....	Basenpaare
CNV .....	Kopiezahlveränderung
DMR .....	differentially methylated region
DNA .....	Desoxyribonucleic acid
DRG .....	disease related group
FFPE .....	formalin fixed paraffin embedded
FSC .....	Folliculostellare Zellen
GCT .....	Granularzelltumor der Neurohypophyse
GFAP .....	glial fibrillary acidic protein
HE .....	Hämatoxylin und Eosin
HPF .....	high power field, hochauflösendes Gesichtsfeld
IARC .....	International Agency for Research on Cancer
ICD .....	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
MAPK .....	Mitogen activated protein kinase
NGS .....	Next generation sequencing
OPS .....	Operationen- und Prozedurenschlüssel
PCR .....	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PI3K .....	Phosphatidylinositol-3-kinase
PITUI .....	Pituizyтом
SCO .....	Spindelzellonkozytom
SEGA .....	Subependymales Riesenzellastrozytom
tSNE .....	t-distributed stochastic neighbour embedding
TTF1 .....	Thyreoidaler Transkriptionsfaktor 1
UCSF .....	University of California, San Francisco
UMAP .....	Uniform Manifold Approximation and Projection
WHO .....	World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation
ZNS .....	Zentralnervensystem

## Zusammenfassung

Die primären Tumoren des Hypophysenhinterlappens, Pituizyтом (PITUI), Granularzelltumor der Neurohypophyse (GCT) und Spindelzellonkozytom (SCO), gehören zu den seltenen Erkrankungen. Eine Meta-Analyse aus dem Jahr 2019 gibt 270 in der Literatur beschriebene Exemplare an.[1] Seit ihrer mutmaßlich erstmaligen Beschreibung im späten 19. Jahrhundert hat es wenig Fortschritte in der Diagnostik und Therapie dieser niedriggradigen Gliome gegeben. Die Entwicklung immunhistochemischer und molekularer Techniken in den letzten beiden Jahrzehnten hat jedoch zu neuen Entdeckungen geführt. Dies waren zum einen die Expression des thyreoidalen Transkriptionsfaktors 1 (TTF1) in allen drei Entitäten sowie in Pituizyten, zum anderen wurden in Einzelfällen Alterationen des MAPK Signalweges beschrieben. Wir haben in unserer Arbeit 47 dieser Tumoren zusammengetragen (14 PITUI; 12 GCT; 21 SCO) und ihre DNA-Methylierungsprofile, ihren Mutationsstatus in 479 krebsrelevanten Genen und ihre chromosomalen Kopiezahlprofile analysiert, um sie molekular zu charakterisieren und herauszufinden, ob sich klinisch relevante Subgruppen ableiten lassen. Wir haben zwei Hauptgruppen in unsupervidierten Clusterings der DNA-Methylierungsdaten nachweisen können. Allerdings sind die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen gering. Die größere der beiden Methylierungs-Gruppen enthält 23 der 47 Tumoren und setzt sich aus PITUIs und einem Teil der SCOs zusammen und ist angereichert für Tumoren mit pathogenen Mutationen innerhalb des MAPK/PI3K Signalweges. Zwölf der 17 sequenzierten Tumoren (71%), in denen sich pathogene Mutationen nachweisen ließen, fielen in diese Gruppe. Es wurden FGFR1 (3), HRAS (3), BRAF (2), NF1 (2), CBL (1), MAP2K2 (1), PTEN (1) Mutationen nachgewiesen. Die zweite Gruppe bestand aus 16 Tumoren, hauptsächlich vom Typ des GCT sowie auch einzelne SCO, die allesamt zumeist keine krebsrelevanten Mutationen aufwiesen. Unsere Überlebenszeitanalyse ergab, dass chromosomale Imbalancen in der Gruppe der PITUI und SCO signifikant mit einem reduzierten progressionsfreien Überleben assoziiert waren ( $p=0,031$ ).

Zusammenfassend sprechen die nur geringen Unterschiede in den DNA-Methylierungsprofilen dieser Tumorentitäten dafür, dass sie am besten als Subtypen einer einzigen Entität betrachtet werden sollten. Allerdings zeigen unsere Ergebnisse

deutliche Unterschiede in der Verteilung der Mutationen und im klinischen Outcome. Daher schlagen wir eine kombinierte histomolekulare Subklassifikation in drei Subtypen vor. Subtyp 1 ist charakterisiert durch GCT-Histologie und zeigt überwiegend keine molekularen Alterationen. Subtyp 2 zeigt PITUI oder SCO Histologie, keine chromosomalen Imbalancen und hat ein überwiegend gutes klinisches Outcome. Subtyp 3 zeigt eine PITUI oder SCO Histologie, weist chromosomale Imbalancen auf und es finden sich häufiger Rezidive. Beide der letztgenannten Subtypen haben häufig MAPK/PI3K Mutationen, die mögliche therapeutische Targets darstellen.

## **Abstract**

The primary tumours of the posterior lobe of the pituitary gland, pituicytoma (PITUI), granular cell tumour of the neurohypophysis (GCT) and spindle cell oncocytoma (SCO), are rare diseases. A meta-analysis (published in 2019) reported 270 cases described in the literature.[1] Since their presumed first description in the late 19th century, there has been little progress in the diagnosis and treatment of these low-grade gliomas. However, the development of immunohistochemical and molecular techniques in the last two decades has led to new discoveries: Firstly the expression of thyroid transcription factor 1 (TTF1) in all three entities as well as in pituicytes. Secondly, alterations of the MAPK signalling pathway were described in single cases. In our work, we collected 47 of these tumours (14 PITUI; 12 GCT; 21 SCO) and evaluated their DNA methylation profiles, their mutation status in 479 cancer-relevant genes and their copy number profiles in order to characterise them molecularly and to find out whether clinically relevant subgroups can be derived. We were able to identify two main groups in unsupervised clusterings of the DNA methylation data. However, the differences between the groups are small. The larger of the two methylation groups contains 23 of the 47 tumours and is composed of PITUIs and a subset of SCOs and was enriched for tumours with pathogenic mutations within the MAPK/PI3K pathway. Twelve of the 17 sequenced tumours (71%) in which such pathogenic mutations could be detected fell into this group. FGFR1 (3), HRAS (3), BRAF (2), NF1 (2), CBL (1), MAP2K2 (1), PTEN (1) mutations were detected. The second group consisted of 16 tumours, mainly of the GCT type as well as single SCO, which, like the other tumours in this group, mostly had no driver mutations. Our survival time analysis showed that chromosomal imbalances in the PITUI and SCO group were significantly associated with reduced progression-free survival ( $p=0.031$ ).

In summary, the only minor differences in the DNA methylation profiles of these tumours suggest that they are best considered as subtypes of a single entity. However, our results show marked differences in mutation distribution and clinical outcome. Therefore, we propose a combined histomolecular subclassification into three subtypes. Subtype 1 is characterised by GCT histology and shows predominantly no molecular alterations. Subtype 2 shows PITUI or SCO histology, no chromosomal imbalances and has a good clinical outcome. Subtype 3 shows PITUI or SCO histology, has chromosomal imbalances and recurrences are more common. Both of the latter subtypes often have MAPK/PI3K mutations, which are potential therapeutic targets.

# 1 Einleitung

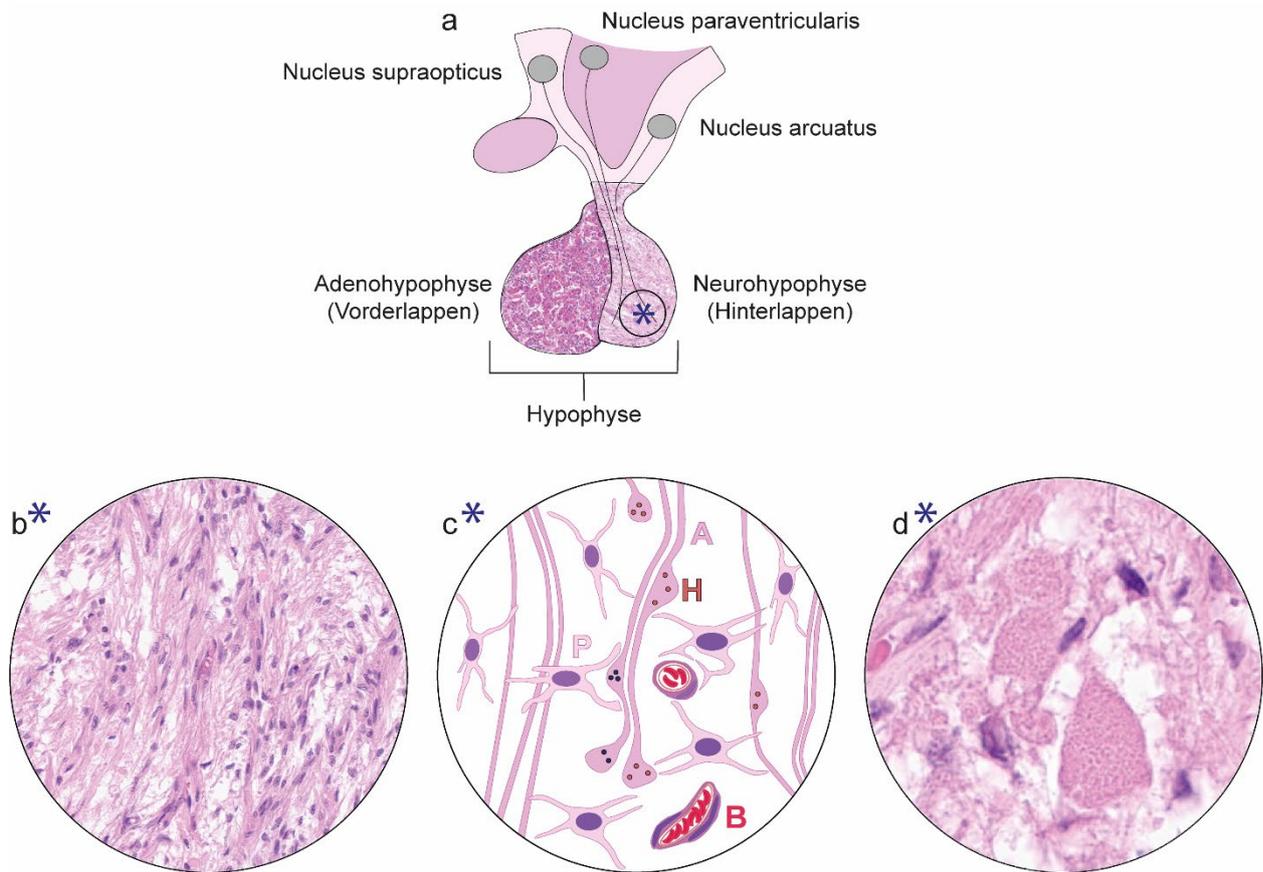
## 1.1 Neuroanatomie des Hypophysenhinterlappens

### 1.1.1 Embryonale Entwicklung der Hypophyse

Die Hypophyse besteht aus zwei Anlagen, deren Entwicklung um den 28. embryonalen Entwicklungstag beginnt. Zum einen formiert sich eine Ausstülpung des Diencephalons, welche sich zum Hypophysenhinterlappen entwickelt und neuroepithelialen Ursprungs ist. Zum anderen entwickelt sich in räumlicher Nähe eine Ausstülpung des Schlundektoderms, die sog. Rathke Tasche, welche sich vom Schlundektoderm abschnüren und zur Adenohypophyse ausreifen wird. Das regelhafte Fortschreiten und der Abschluss der Entwicklung beider Anlagen hängen durch Wechselwirkungen induktiver Signale voneinander ab. Beide Anlagen kommen nebeneinander im Bereich der Schädelbasis, genauer gesagt in der der Sella turcica, zusammen.[2,3]

### 1.1.2 Zellulärer Aufbau des Hypophysenhinterlappens

Im 20. Jahrhundert begann man die Hypophyse, meist vergleichend, beispielsweise in Ratten, Schweinen, Katzen und Rindern histomorphologisch zu beschreiben und zu untersuchen.[4–8] Es wurde die Funktion und die Natur ihrer Zellen kontrovers diskutiert. Zahlreiche frühe wissenschaftliche Arbeiten widmen sich der Untersuchung und Beschreibung des Organs. Zwischen den Jahren 1963 bis 1992 erfolgte zudem eine intensive Aufarbeitung der Ultrastruktur der Neurohypophyse.[9–15] Eine Übersicht zur Neuroanatomie des Hypophysenhinterlappens findet sich in Abbildung 1.



*Abbildung 1: Neuroanatomie des Hypophysenhinterlappens (eigene Darstellung). Die Hypophyse gliedert sich in Vorderlappen (Adenohypophyse) und Hinterlappen (Neurohypophyse). Der Hypophysenhinterlappen besteht hauptsächlich aus den hormonfördernden Axonen der Nuclei supraopticus und paraventricularis. Der Nucleus arcuatus bildet hauptsächlich releasing Hormone, die über das Kapillarbett das Infundibulums in den Vorderlappen gelangen (a). Die astroglialen Stützzellen des Hinterlappens nennt man Pituizyten. Sie verbinden die zellulären Bestandteile und übernehmen Funktionen in der Homöostase. Histologisches Bild des unauffälligen Hinterlappens (b). Eine schematische Darstellung verdeutlicht die zelluläre Komposition. P – Pituizyten, H – Herring Bodies mit Hormongranula, A – Axone, B – Blutgefäße (c). Die Axone der Neurohypophyse dienen auch als Speicher für die Hormone Antidiuretisches Hormon (ADH) und Oxytocin. Die Hormongranula (hier: blau-Oxytocin, rot-ADH) werden in Auftreibungen der Axone und ihrer Endungen angesammelt, den sogenannten Herring Bodies (d).*

### 1.1.2.1 Pituizyten

Pituizyten (Wortstamm vermutlich abgeleitet von lat. pituita=Schleim, wie in glandula pituitaria) sind die gliale Hauptkomponente des Hypophysenhinterlappens. Benannt wurden sie 1930 von Paul Bucy, welcher sie in der pars nervosa der Hypophyse von

Kühen als eigenen Zelltyp beschrieb.[4] Ihre gliale Natur wurde im frühen 20. Jahrhundert anhand morphologischer und färberischer Studien vermutet und konnte in vitro 1954 durch Hild demonstriert werden.[16,17] Suess und Pliska ordneten sie 1981 anhand der Expression von saurem glialem Faserprotein (GFAP) der Astroglia zu.[5] Pituizyten erfüllen folglich mehrere, ihrer glialen Natur entsprechende Funktionen. Insbesondere stützen und versorgen sie die Zellfortsätze, der im Nucleus supraopticus und Nucleus paraventricularis des Hypothalamus gelegenen neurosekretorischen Neurone, die in den Hypophysenhinterlappen projizieren.

In morphologisch-funktionellen Studien an Ratten und anderen Säugetieren wurde eine beträchtliche Variabilität im Aussehen von Pituizyten beschrieben, wobei die herausstechendsten Unterschiede sich auf die Größe und den Gehalt an osmiophilen Granula bezogen, welche wohl erstmals von Mottram und Cramer 1923 erwähnt wurden[18]. Sie gingen davon aus, dass es sich hier um Lipide handelte und beschrieben daraufhin die Zellen als „Liponeurozyten“. Auch andere teilten später diese Einschätzung.[19] Sie gingen davon aus, dass es sich bei den Lipiden um Rückstände phagozytierter Membranbestandteile der eigentlichen neurosekretorischen Granula handeln könnte. Sterba und Brückner sowie Dellmann und Owsley beschrieben 1967 und 1969 die Fähigkeit der Pituizyten zur Phagozytose unter experimentellen Bedingungen.[20,21]

Krusolvic beschrieb diese, aus heutiger Sicht historischen, Entwicklungen in seiner Arbeit von 1969 und ging zudem auf mehrere verschiedene Strömungen der Interpretation dieser morphologischen Variabilität ein. Einige Wissenschaftler gingen davon aus, dass mehrere unterschiedliche Typen von Pituizyten existierten. Andere favorisierten das Vorliegen zweier unterschiedlicher Typen von Pituizyten, oder von zwei unterschiedlichen Typen mit intermediären Zuständen oder auch eines einzigen Zelltyps. In seiner Arbeit ging Krusolvic selbst vom Vorliegen eines einzigen Pituizyten-Typs mit drei unterschiedlichen morpho-funktionellen Zuständen aus. Aufgrund des Nachweises der besagten osmiophilen Granula im Zytoplasma der Pituizyten ging man einige Zeit lang zudem davon aus, dass es sich hier um neuroendokrine/neurosekretorische Zellen handele, die im Wesentlichen für die Sekretion neurohypophysärer Hormone verantwortlich seien.[22,23]

1980 wurde elektronenmikroskopisch von Seyama und Takei et al. Anhand von n=12 humanen Hypophysektomie Präparaten im Rahmen einer damals üblichen palliativen Behandlung von Patient\*innen mit Brust- oder Prostata-Karzinomen, die Ultrastruktur der humanen Neurohypophyse vertiefend beschrieben.[12–14]

Die Autoren gehen in der zweiten Publikation dieser insgesamt dreiteiligen Reihe auf die Ultrastruktur von Pituizyten ein. Sie beschreiben 5 unterschiedliche Typen von Pituizyten: (I) Hauptpituizyten, an Astrozyten erinnernd, (II) dunkle Pituizyten, wahrscheinlich unterschiedliche Funktionszustände der Hauptpituizyten, (III) ependymale Pituizyten, (IV) onkozytäre Pituizyten und (V) granuläre Pituizyten, die wahrscheinlich über einen aktiven Aufnahmemechanismus für extrazelluläres Material verfügen.[13] Auch diese Autoren halten aufgrund ihrer Forschungsergebnisse das Vorliegen eines einzigen Pituizyten-Typs in mehreren funktionellen Zuständen für am wahrscheinlichsten.

Dies spiegelt auch die aktuelle herrschende Lehrmeinung wider.

#### *1.1.2.2 Axone der Nuclei supraopticus und paraventricularis*

Die speziellen Neurone des Nucleus supraopticus und des Nucleus paraventricularis im Hypothalamus bilden die Hormone Oxytocin und anti-diuretisches Hormon (ADH; Synonyme: Vasopressin, Adiuretin). ADH wird hauptsächlich im Nucleus supraopticus, Oxytocin hauptsächlich im Nucleus paraventricularis gebildet. Die Hormone binden an die Carrierproteine Neurophysin I (Oxytocin) und Neurophysin II (ADH) und werden nicht simultan in ein und demselben Axon gespeichert.[24]

Diese Hormone werden dann entlang der neuronalen Axone, zusammengefasst als Tractus hypothalamo-hypophysealis, über den Hypophysenstiel / Infundibulum in den Hypophysenhinterlappen transportiert, dort gespalten und gelangen durch Aufnahme in das Portalgefäßbett der Hypophyse in den systemischen Blutkreislauf.[25] Ihre Wirkung entfalten die genannten Hormone im Bereich verschiedener Zielorgane. ADH greift beispielsweise an V2-Rezeptoren der Sammelrohre der Niere an und führt zur Wasserrückresorption. Über V1-Rezeptoren in Gefäßwänden führt es zur Gefäßkontraktion und zur Erhöhung des Blutdrucks. Reguliert werden diese hormonellen Regelkreise über periphere Rezeptorzellen, die ihrerseits regulatorische Substanzen in

den Blutkreislauf abgeben und so mit den Neuronen im Hypothalamus auf chemische Weise kommunizieren.[26]

Auftreibungen der Axonen, entlang derer die Hormone transportiert und in denen sie gespeichert werden, und die als „Herring bodies“ bekannt werden sollten, wurden erstmals von Prof. Percy Theodore Herring im Jahr 1908 beschrieben.[8]

Im Jahr 1953 führten Palay und Wissig Untersuchungen an frischen unfixierten Neuronen des supraoptischen Kerngebiets des Hypothalamus von Hasen durch um zu beweisen, dass es sich bei den damals kürzlich nachgewiesenen neurosekretorischen Granula in diesen Zellen, nicht um artifizielle, durch Fixierungsschritte verursachte Phänomene handelte. Ihre Ergebnisse belegten das Vorhandensein neurosekretorischer Granula in den Zellkörpern der Neurone in vivo sowie in deren Zellfortsätzen.[27]

Seyama und Takei beschrieben 1980 in der ersten Publikation ihrer dreiteiligen Reihe zwei unterschiedliche Typen von Axonen der Neurohypophyse, basierend auf ihrem Gehalt an neurosekretorischen Granula (Typ A und Typ B). Sie fanden ein nur geringes Vorhandensein von Typ B Fasern, wobei die Typ A Fasern im Hypophysenhinterlappen zahlreich waren und viele unterschiedliche Arten an axonalen Schwellungen aufwiesen. Aufgrund dieser Variabilität teilten die Autoren die Schwellungen in Typ A Axonen in 6 ultrastrukturelle Untergruppen ein.[12]

Lichtmikroskopisch können weder die oben beschriebenen ultrastrukturellen Varianten der Pituizyten noch die verschiedenen neurosekretorischen Granula sicher nachvollzogen werden. Einzelne Arbeitsgruppen haben an Ratten versucht bestimmte funktionelle Zustände der Pituizyten nach Dehydrierung von Versuchstieren zu etablieren.[18] Derartige Unterfangen haben allerdings in die pathologische Diagnostik aufgrund mangelnder Relevanz keinen Eingang gefunden.

### *1.1.2.3 Folliculostellare Zellen*

Man beschrieb zudem einen indermediären Zelltyp: Folliculostellare Zellen (FSC) exprimieren immunhistochemisch sowohl gliale (GFAP, S100) als auch epitheliale Marker (Zytokeratine). Man findet sie verstreut im Hypophysenvorderlappen und in der Pars intermedia der Hypophyse, im Übergangsbereich zum Hypophysenhinterlappen. Die

Funktion dieser Zellen ist unklar. Diskutiert wird unter anderem eine Funktion als adulte Stammzelle.[28]

#### *1.1.2.4 Vaskuläre und perivaskuläre Strukturen*

Im dritten und somit letzten Teil der Publikationsreihe von Seyama und Takei gehen die Autoren auf vaskuläre und perivaskuläre Strukturen der Neurohypophyse ein.[14] Sie beschrieben den vaskulären und perivaskulären Raum von adluminal nach luminal. Adluminal findet sich eine Basalmembran, an die sich ein perivaskulärer Raum anschließt. Hier finden sich Perizyten, Histiocyten, Mastzellen und Fibroblasten. Daran anschließend findet sich eine luminale Basalmembran und fenestrierte Endothelzellen. Diese Strukturen bilden ein dichtes Netzwerk, eingebettet zwischen dem neuralen Parenchym. Neben einer detaillierten ultrastrukturellen Beschreibung schlagen sie auch ein Schema zum Fluss der neurohypophysealen Hormone im extrazellulären Raum vor.

## **1.2 Primäre Neoplasien des Hypophysenhinterlappens**

Die Klassifikation der Tumoren des Zentralnervensystems der Weltgesundheitsorganisation (WHO) 2016 unterscheidet drei primäre gliale Neoplasien des Hypophysenhinterlappens: Pituizytome, Spindelzellonkozytome und Granularzelltumoren.[29]

### 1.2.1 Pituizytome

Cynthia Scothorne beschrieb im Jahr 1955 ein pilozytisches Astrozytom des Hypophysenhinterlappens. In ihren Ausführungen findet sich eine detaillierte Zusammenstellung von ab 1884 publizierten Einzelfällen glialer Tumoren der Hypophyse, die den Hypophysenhinterlappen zumindest einschließen und sich zumeist aber auch in Strukturen der Hirnbasis, wie dem Tractus opticus, angrenzend zum dritten Ventrikel oder im Bereich des Hypothalamus ausbreiten. Ein breites Spektrum an Morphologien wird beschrieben. Der Ursprung dieser Tumoren blieb jedoch zumeist unklar.[30,31] Scothorne diskutiert anhand ihres Falles, der sich ausschließlich im Hinterlappen der Hypophyse befindet, die dort vorzufindenden Pituizyten als Ursprung des glialen Tumors. Obwohl die Vorstellung eines „Pituizytoms“ somit schon früh aufkam, wurde es im Jahr 2000 erstmals als eigene Entität ausführlich morphologisch und immunhistochemisch charakterisiert und daraufhin in der vierten Auflage der WHO Klassifikation für Tumoren

des Zentralnervensystems von 2007 als eigene Entität aufgeführt.[32,33] In der dritten Auflage von 2000 wurde der Begriff noch als Synonym der Entität „Granularzelltumor der Neurohypophyse“ aufgeführt.[34]

Nach Definition in der WHO Klassifikation zeigen Pituizytome Ähnlichkeit zur normalen Histoarchitektur des Hinterlappens. Sie bestehen aus spindeligen Tumorzellen, die teils in Strängen und Zügen wachsen. Im Gegensatz zum Hypophysenhinterlappen zeigen sich keine sog. Herring Bodies (axonale Auftreibungen der hormonfördernden Zellfortsätze). Zudem lässt sich immunhistochemisch in Pituizytomen, im Gegensatz zum normalen Hypophysenhinterlappen, keine, oder lediglich eine schwache Expression von Synaptophysin sowie in der Regel eine kräftige Expression des glialen Faserproteins (GFAP) nachweisen. In normalem Hinterlappengewebe zeigt sich in der Regel ein inverses Färbeverhalten.[29] Dennoch kann die Abgrenzung bisweilen, vor allem bei kleinen Biopsieproben, Probleme bereiten. Histomorphologisch ungewöhnliche Fälle sind beschrieben.[35,36]

### 1.2.2 Spindelzellonkozytome

Spindelzellonkozytome zeigen ein breites Spektrum an Morphologien. Erstmals beschrieben wurden sie von Roncaroli et al 2002.[37] Somit handelt es sich historisch betrachtet um die jüngste Neoplasie des Hypophysenhinterlappens. In der Regel zeigt ein Teil der Tumorzellen ein granuläres/onkozytäres Zytoplasma, aufgrund einer Anreicherung von Mitochondrien. Die Tumorzellen sind weiterhin durch eine spindelige Zellform gekennzeichnet, wobei sich auch epitheloide oder hellzellige Varianten oder Anteile finden. Auch ungewöhnlichere papilläre oder ependymal imponierende Tumoren wurden vereinzelt beschrieben. Die Abgrenzung von Spindelzellonkozytomen zu Pituizytomen kann schwierig sein, da, abgesehen von der vermehrten Granularität/onkozytären Veränderung des Zytoplasmas, welche sich möglicherweise immunhistochemisch in einer vermehrten Anfärbung mit antimitochondrialem Antikörper (MU213-UC clone 131-1) [38] äußert, kein weiterer morphologischer oder immunhistochemischer Marker existiert, der diese beiden Varianten zuverlässig zu trennen vermag. Mehrere Arbeiten haben die Expressionsmuster verschiedener immunhistochemischer Marker in den drei Tumortypen und zum Teil auch ihren Differentialdiagnosen untersucht. Diese wurden als unterschiedlich stark in den

unterschiedlichen Tumorentitäten beschrieben, jedoch ohne hohe diskriminative Kraft.[39–41]

Ideen zur Ätiologie des Spindelzellonkozytoms wurden anhand der Immunexpression und morphologischer Eigenschaften formuliert. So wurde eine Genese aus follikulostellaren Zellen der Adenohypophyse (siehe auch ehemalige Bezeichnung in der WHO Klassifikation 2007 „Spindelzellonkozytom der Adenohypophyse“[32]) oder eine Abstammung von Pituizyten diskutiert.[42]

### 1.2.3 Granularzelltumore der Neurohypophyse

Granularzelltumore der Neurohypophyse sind morphologisch zumeist gut von Pituizytomen und Spindelzellonkozytomen zu unterscheiden. Die Tumorzellen zeigen polygonale, recht gut abgrenzbare Zell-Leiber mit einem granulären Zytoplasma. Dieser Aspekt entsteht nicht durch Akkumulation von Mitochondrien, wie bei den Spindelzellonkozytomen, sondern durch eine Vielzahl an Lysosomen.[43,44]

Einer der ersten publizierten Fälle könnte einer von zwei Tumoren des Hypophysenhinterlappens sein, den Boyes und Beadles 1893 in ihrer Arbeit beschrieben.[45] Historische Synonyme dieser Entität sind vielfältig: Myoblastom, Granularzellmyeloblastom, Abrikossoff-Tumor, Granularzellschwannom und Granularzellnervenscheiden Tumor. Granularzelltumoren können überall im Körper auftreten.[46–49] Für einige Varianten wird u.a. diskutiert, dass sie von Schwann-Zellen ausgehen [50]. Dies sind die Hüllzellen, die Nervenfasern des peripheren Nervensystems umgeben. Sie entstammen der Neuralleiste und sind somit neuroektodermalen Ursprungs. Aber auch extraneurale Varianten sind beschrieben.[51] Eine Arbeit von 1991 diskutiert allerdings bereits einen astroglialen Ursprung der Granularzelltumoren der Neurohypophyse durch Nachweis von GFAP in den Tumorzellen.[52]

Die Diagnose „Granularzelltumoren der Neurohypophyse“ ist bereits seit ihrer Einführung in die WHO Klassifikation 2000 als rein deskriptiv anzusehen. Die Benennung erfolgte aufgrund der hohen histomorphologischen Ähnlichkeit zu den extra-neurohypophysealen Granularzelltumoren. Eine Arbeit zur genetischen Charakterisierung von verschiedenen granulären Tumoren des ZNS, darunter auch ein Granularzelltumor der Hypophyse, aus

2002 konnte im Gegensatz zu den anderen untersuchten Fällen, keine Aberrationen in dem Tumor der Neurohypophyse nachweisen. Die Autoren gehen daher davon aus, dass es sich bei den granulären Tumoren aus den verschiedenen Regionen des menschlichen Körpers nicht um eine einzige distinkte Entität handelt.[53]

#### 1.2.4 TTF1 Expression als gemeinsames Merkmal

In Studien an Ratten wurde während der embryonalen Entwicklung eine Expression des thyreoidalen Transkriptionsfaktors 1 (TTF1) (*Nkx2-1* Gen) in Anteilen des Zwischenhirns sowie eine Expression in der Lungenanlage und der Schilddrüsenanlage beschrieben.[54,55] Bald darauf wurde eine solche Expression auch in Neoplasien der Schilddrüse und der Lunge nachgewiesen.[56–58] Auch in reifen Pituizyten der Ratte wurde eine TTF1 Expression gezeigt.[59] 2009 wurde von Lee et al. eine nukleäre Proteinexpression von TTF1 in humanen fetalen und adulten Pituizyten sowie als gemeinsames Merkmal von glialen Tumoren des Hypophysenhinterlappens gezeigt und die Theorie einer gemeinsame Herkunft dieser drei Tumortypen weiter untermauert.[60] Abbildung 2 a-d zeigt exemplarisch die nukleäre immunhistochemische Expression von TTF1 in humanem fetalen Hirngewebe.

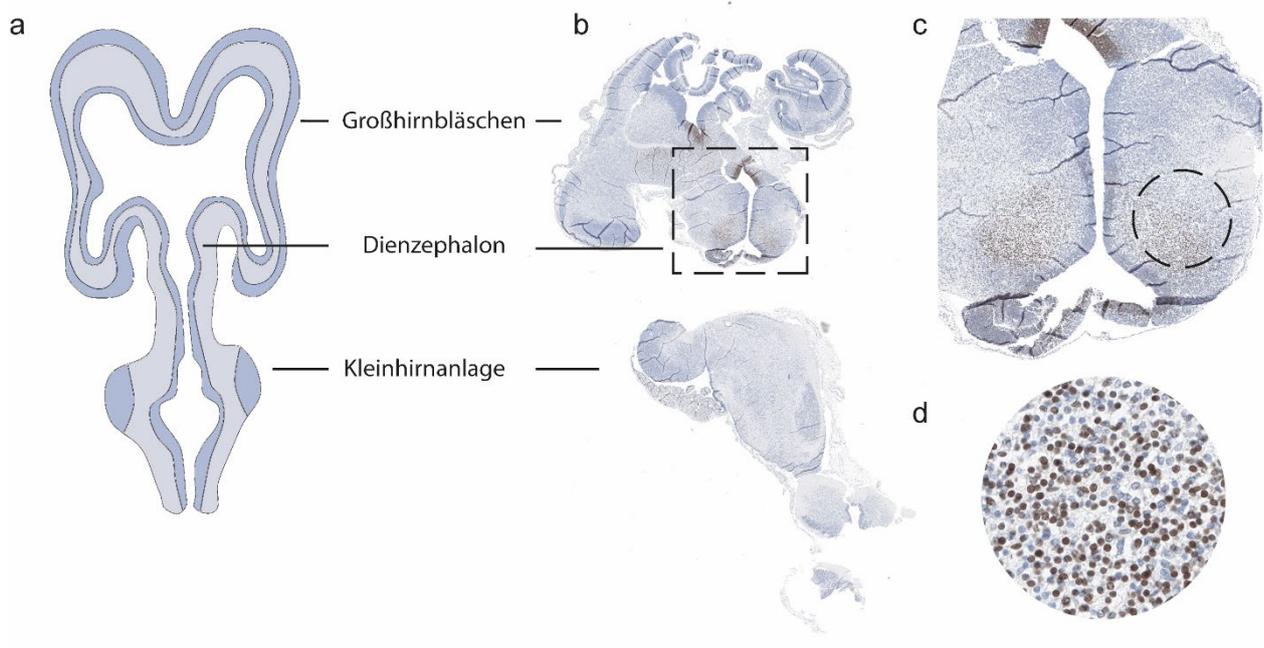


Abbildung 2: TTF1 Expression im fetalen Gehirn (eigene Darstellung). Eine schematische Darstellung eines fetalen Gehirns auf Frontalebene (stirnparallel); (a) An dem in stirnparalleler Ebene angeschnittenen fetalen Hirngewebe wurde eine immunhistochemische Färbung mit

*Antikörpern gegen TTF1 (Klon 8G7G3/1, Zytomed Systems) durchgeführt. Es zeigt sich eine arealesweise nukleäre Expression (braun) in den sich entwickelnden neuralen Vorläuferzellen; (b). Man sieht diese sowohl im Matrixzellager des Diencephalons; (c, d) als auch in umschriebenen Bereichen der ventrikulären Zone (b, c).*

Eine Expression von TTF1, welche in Pituizyten regelhaft nachgewiesen werden kann, konnte in folliculostellaren Zellen nicht nachgewiesen werden.[39] Sowohl für Pituizyome als auch für Spindelzellonkozytome wurde vor dieser Erkenntnis eine Abstammung von diesem speziellen Zelltyp diskutiert.[37,61]

Eine Expression ist neben den Tumoren des Hypophysenhinterlappens noch in weiteren glialen Tumorentitäten, die sich im Bereich des Diencephalons manifestieren, nachgewiesen worden, wie zum Beispiel in Ependymomen des dritten Ventrikels, subependymalen Riesenzellastrozytomen (SEGA) und chordoiden Gliomen des dritten Ventrikels[62–65]

### **1.3 Molekulare Charakterisierung**

2013 wurde in ersten Serien begonnen die Tumoren des Hypophysenhinterlappens auch molekular zu charakterisieren. In einer Arbeit von Mete et al. wurden sieben Spindelzellonkozytome, vier Pituizyome and drei Granularzelltumoren auf das Vorliegen von BRAF V600E Mutationen und auf das Vorliegen von KIAA1549/BRAF Fusionen untersucht, die häufig in niedriggradigen Gliomen zu finden sind. In dieser Serie allerdings ließen sich keine Fälle mit diesen Alterationen identifizieren[39]

Viaenna et al. publizierten 2019 eine Serie von 14 Pituizyomen, in denen sie unter anderem Next-Generation-Sequencing-Analysen durchführten und in 2 Fällen erkrankungsassoziierte Varianten nachweisen konnten. Sie fanden in einem Fall eine BRAF V600E Mutation, eine NF1-Variante und eine TSC1-Variante. In dem zweiten Fall konnten sie eine HRAS Q61R Mutation nachweisen [66].

In einer 2021 publizierten Arbeit wurden fünf Spindelzellonkozytome, drei Pituizyome, and ein Granularzelltumor untersucht. Von diesen wurden an drei Spindelzellonkozytomen und einem Pituizyom Sequenzierungsanalysen von 409 Genen durchgeführt. Es wurden keine Varianten identifiziert. Jedoch beschrieben die Autoren chromosomale Kopiezahlveränderungen (CNV) in Spindelzellonkozytomen, darunter ein Verlust von Chromosom 1p in drei analysierten Fällen.[67]

Es finden sich noch weitere Arbeiten, die das Auftreten von Alterationen von Genen des mitogen activated protein kinase (MAPK) Signalweges meist in Einzelfällen beschreiben.[68–70]

Die aufgeführten Arbeiten zeigen deutlich die Seltenheit der Tumoren und daraus resultierend die Schwierigkeiten beim Zusammentragen von (ausreichend großen) Fallkollektiven. Dies unterstreicht den Wert unserer Arbeit, für welche insgesamt 47 Tumoren der Neurohypophyse analysiert wurden und für die Sequenzierungsergebnissen für 37 Tumoren aus den drei Tumorentitäten vorliegen.[71]

### 1.3.1 DNA-Methylierung in der Tumordiagnostik

DNA-Methylierung gehört zu den epigenetischen Modifikationen. Unter Epigenetik versteht man chemische Modifikationen der DNA oder ihrer assoziierten Proteine wie z.B. der Histone, die Einfluss auf den Phänotyp haben, ohne mit Veränderung der Basensequenz der DNA einherzugehen.

Im Fall der DNA-Methylierung handelt es sich um die kovalente Bindung einer Methylgruppe (CH<sub>3</sub>-) an das C5-Atom einer Cytosin-Base der DNA, woraus die Bildung von 5-Methylcytosin resultiert. Diese chemische Modifikation wird in der Regel nur an Cytosinen beobachtet, welchen ein Guanin in der DNA-Sequenz folgt (CpG). Erstmals nachgewiesen wurde 5-Methylcytosin 1948 von Hotchkiss in Thymus-DNA von Kälbern.[72] Zuvor wurde es 1925 in der DNA von Tuberkelbakterien beschrieben.[73] 1975 und 1980 haben Riggs und Riggs et al. beschrieben, dass DNA-Methylierung eine entscheidende Rolle bei der Etablierung und Aufrechterhaltung von Genexpressionsmustern von Zellen und somit der Zelldifferenzierung spielen könnte.[74,75] DNA-Methylierung findet man vor allem im Bereich von Promoterregionen und anderen regulatorischen Bereichen der DNA, wo sie beispielsweise die Bindungsfähigkeit von Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Eine vermehrte DNA-Methylierung in Promotorregionen verhindert in der Regel das Ablesen des zugehörigen Gens. Durch entsprechende DNA-Methylierungsmuster im Genom wird wesentlich bestimmt, welche Gene transkribiert werden und in welche Richtung sich eine Zelle ausdifferenziert.

Viele Arbeiten haben sich mit pathologischen Methylierungsmustern in Tumorerkrankungen beschäftigt, die sich von der Methylierung in Normalgeweben zum Teil wesentlich unterscheiden.[76–78]

Mit der Einführung der Illumina Infinium humanMethylation BeadChip Array Plattform, im Jahr 2008/2009 mit dem humanMethylation27 BeadChip, der ca. 27.000 CpG sites hauptsächlich in Promotorregionen genomweit abdeckte, war erstmals die hochstandardisierte und reproduzierbare Analyse von Einzel-CpG-Positionen im Genom möglich.[79] Kurz darauf, im Jahr 2011, wurde bereits ein Chip mit wesentlicher Erweiterung der Abdeckung genomweiter CpG-Sites herausgegeben, der humanMethylation450 BeadChip array.[80] 2016 folgte die Einführung des bislang umfangreichsten Arrays von Illumina mit Abdeckung von ca. 850.000 genomweiter CpG-Sites [81].

2016 beschrieben Chen et al. in einer großen korrelativen Analyse von fetalen Geweben und gepaarten Normalgewebe-Tumorgewebeprobe, dass die durch Histonmodifikationen bedingte Chromatinstruktur und die daraus folgende Zugänglichkeit von Genen in den Normalgeweben wesentlich bestimmt, in welchen Genen pathologische Methylierungsmuster in Tumoren auftreten können.[82] Fast zeitgleich konnte gezeigt werden, dass sich bestimmte Tumorentitäten anhand ihrer genomweiten DNA-Methylierungsprofile in relevante Subgruppen klassifizieren lassen. So wurde 2015 eine Klassifizierung für ependymale Tumoren veröffentlicht, auf welche 2016 eine Neuklassifizierung von primitiven neuroektodermalen Tumoren des ZNS folgte.[83,84] Als Ausweitung und Generalisation dieser grundlegenden Erkenntnisse und Entdeckungen wurde im Jahr 2018 eine DNA-methylierungsbasierte Klassifikation der ZNS-Tumoren veröffentlicht, die annähernd alle Entitäten der damaligen Auflage der WHO Klassifikation für Tumoren des ZNS enthielt.[85] Aus dieser Arbeit ging zudem ein frei verfügbares Onlinetool zur DNA-methylierungsbasierten Klassifizierung neuer Tumorproben hervor (<https://www.molecularneuropathology.org/mnp>; Classifier Version v11b4 [85]). Seit dieser Veröffentlichung im speziellen wurde die arraybasierte DNA-Methylierungsanalyse immer mehr Bestandteil der Diagnostik von ZNS Tumoren.

#### **1.4 Fragestellung**

Aus alledem ergibt sich folgende Fragestellung: Lassen sich Hypophysenhinterlappentumore anhand von molekularen Daten besser unterteilen als

mittels konventioneller Histologie und ist diese Unterteilung relevant für die klinische Behandlung dieser Tumoren?

## 2 Material und Methoden

Folgende Abschnitte wurden aus Schmid et al.[71] entnommen, aus dem Englischen übersetzt und in Teilen nachbearbeitet und ergänzt. Eine schematische Darstellung der durchgeführten Analysen zeigt Abbildung 3.

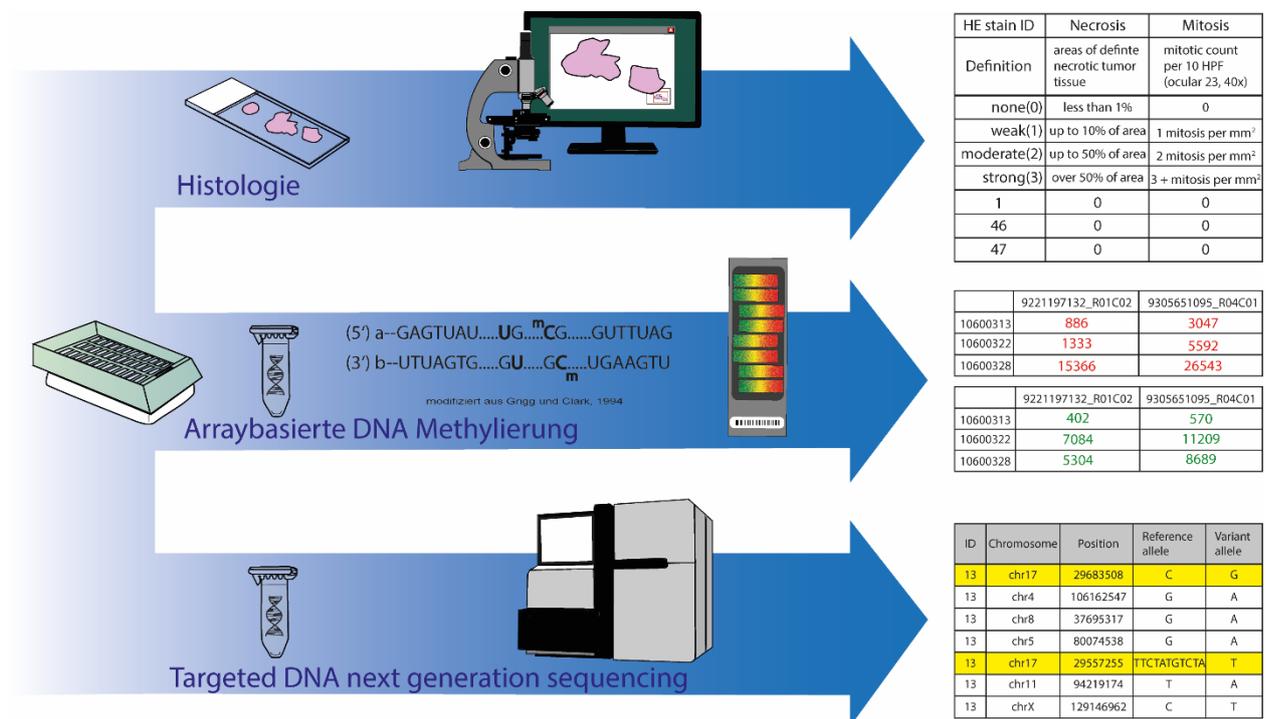


Abbildung 3: Durchgeführte Analysen (eigene Darstellung). Ausgehend vom zur Verfügung gestellten Paraffinblock werden die durchgeführten Analysen, histologische Auswertung der eingeschlossenen Fälle, arraybasierte DNA-Methylierungsanalyse und targeted DNA next generation sequencing gezeigt. Exemplarisch und ausschnittsweise wird die Struktur der generierten jeweiligen Rohdaten abgebildet.

### 2.1 Gewebeproben

Detaillierte Angaben zu den Gewebeproben finden sich in Schmid et al.[71] Es wurde formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes (FFPE) Tumorgewebe von 47 Neoplasien des Hypophysenhinterlappens aus den Pathologiearchiven von insgesamt 12 Abteilungen für Neuropathologie/Pathologie aus einen Zeitraum von 1986 bis 2018 in die Analysen

eingeschlossen. Die Tumoren wurden von den einsendenden Zentren als Pituizyтом (n=14), Spindelzellonkozytom (n=21) oder Granularzelltumor der Neurohypophyse (n=12) diagnostiziert. Darüber hinaus wurden Methylierungsdaten von nicht-neoplastischen Proben des Infundibulums (n=7) und des Hypophysenhinterlappens (n=6) eingeschlossen. 29 dieser Tumorproben waren Teil einer vorausgegangenen Publikation.[85] Ein Ethikvotum wurde von der Ethikkommission der Charité erteilt (EA2/151/18). Für die Einsenderinstitutionen wurde die Verwendung des Materials von den lokalen Institutional Review Boards genehmigt.

## **2.2 Auswertung von Gewebeschnitten am Mikroskop und als gescannter Ganzgewebeschnitt (Whole slide image)**

Es lagen von 46 der 47 Tumoren Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbte Schnitte zur Evaluation histologischer Merkmale am Mikroskop vor. Es wurden faszikuläres Wachstum von Spindelzellen, lobuläres Wachstum, granuläre Zellen (ohne Unterscheidung zwischen onkozytärer und lysosomaler Granularität), abgerundete bis polygonale Zellen mit distinkten Zellgrenzen (epitheloides Aussehen), Kernpleomorphismus, auffällige Nukleoli, Nekrose und intraparenchymatöse Sklerose bewertet. Darüber hinaus wurde die Zelldichte durch Zählen der Zellkerne auf einer Fläche von 1 mm<sup>2</sup> ermittelt. Lymphozyteninfiltrate wurden durch Zählen von Blutgefäßen mit Lymphozytenmanschetten (definiert als mehr als 10 Lymphozyten, die ein Gefäß umgeben) im gesamten Gewebeschnitt bewertet und wie folgt eingestuft: nicht vorhanden - Lymphozytenmanschetten um 0 bis 1 Gefäß; gering - Manschetten um 2 bis 5 Gefäße; mäßig - Manschetten um 6 bis 10 Gefäße; hoch - Manschetten um mehr als 10 Gefäße. Außerdem wurden die Mitosezahlen in 10 hochauflösenden mikroskopischen Gesichtsfeldern (high power field, HPF) [ein high power field=0,26 mm<sup>2</sup>] des Tumorgewebes gezählt. Alle genannten Eigenschaften wurden nach dem in unserem Manuskript beschriebenen Schema ausgewertet.[71]

## **2.3 Arraybasierte DNA-Methylierungsanalyse**

Die Durchführung der labortechnischen Analysen erfolgte durch spezialisierte chemisch/medizinisch-technische Assistenten des Instituts für Neuropathologie Charité Berlin.

### 2.3.1 Theorie und Chipdesign

Auf den Illumina 450k und den 850k humanMethylation BeadChips werden jeweils ca 450.000 bzw. 850.000 standardisierte CpG-Loci genomweit untersucht. Die verwendeten Loci machen nur etwa 2-5% aller im Genom vorkommenden CpG-Loci aus. Sie sind allerdings durch Experten nach ihrer möglichen Relevanz in pathologischen Prozessen ausgewählt, basierend auf großen Methylom Forschungsprojekten wie ENCODE[86,87] und FANTOM5.[88,89]

Wesentlicher Kern der Analyse ist eine Bisulfit-Konvertierung der DNA, um in der folgenden arraybasierten DNA-Methylierungsanalyse methylierte und unmethylierte CpG-Loci unterscheiden zu können. Hierbei werden zunächst alle unmethylierten Cytosine mittels Bisulfitbehandlung der DNA in Uracilbasen umgewandelt. Methylierte Cytosine sind vor der chemischen Umwandlung geschützt. In darauffolgenden Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) werden die Uracilbasen in die Base Thymin umgewandelt. In der Bisulfit konvertierten DNA sind somit nach der Polymerase-Kettenreaktion unmethylierte Cytosine durch Thymine repräsentiert, methylierte Cytosine verbleiben in ihrer ursprünglichen Form als Cytosine in der DNA Sequenz.[90]

Im nächsten Schritt wird zunächst eine Denaturierung und anschließend eine Whole-Genome-Amplifizierung der Bisulfit konvertierten DNA durchgeführt.

Danach wird die bis zu tausendfach amplifizierte DNA enzymatisch fragmentiert. Dies geschieht, um für die folgende Hybridisierung Fragmente in optimaler Länge zu erhalten (zwischen 300 – 600 Basenpaare (bp)). Es handelt sich um eine Endpoint-Fragmentierung um eine Überfragmentierung der DNA zu vermeiden.

Um die DNA vor dem folgenden Hybridisierungsschritt noch einmal aufzureinigen, wird sie mit Propanol ausgefällt und anschließend resuspendiert.

Zur Hybridisierung auf den Beadchip werden in die 8 Kammern des Chips je 26µl von jeder Probe aufgetragen. In jeder Kammer des Chips sind Oligonukleotidsonden von je ungefähr 150 bp Länge, auf Glaskügelchen hybridisiert. Die DNA-Fragmente der Probe binden an die für sie komplementären, auf den Chip hybridisierten Oligonukleotidsonden. Diese Oligonukleotidsonden sind so designt, dass sich der fragliche CpG-Lokus bei

Anlagerung der komplementären DNA-Fragmente einer Probe immer an der letzten Basenposition befindet.

DNA-Reste und unspezifische DNA werde von dem Chip entfernt.

Nun erfolgt eine Verlängerung der Oligonukleotidsonde um eine einzelne Base (single base extention). Das angelagerte DNA-Fragment der Probe dient hierbei als Matrize. Es erfolgt der Einbau von Guanin für einen methylierten CpG-Lokus (komplementär zu Cytosin) und der Einbau von Adenin für einen unmethylierten CpG-Lokus (komplementär zu Thymin) und vice versa. Danach erfolgt eine Markierung der eingebauten Basen mit je einem Farbstoff für den methylierten Zustand und für den unmethylierten Zustand (rot für Adenin und Thymin; grün für Guanin und Cytosin).

Das Scannen der DNA-Methylierungsarrays wurde am iScan System (Illumina, Inc., USA-Kalifornien) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

### 2.3.2 Berechnung der Brain Tumor Classifier Scores

Die vom iScan generierten Rohdaten (idat Dateien) aller eingeschlossener Tumorproben wurden zur molekulare Klassifizierung mit dem auf DNA-Methylierung basierenden Brain Tumor Classifier tool, welches online zur Verfügung steht, analysiert (<https://www.molecularneuropathology.org/mnp>; Classifier Version v11b4 [85]).

Das Tool analysiert die Methylierungsmuster einer standardisierten Anzahl von CpG-Loci und ordnet, basierend auf den Werten eines Referenzsets, jeden Tumor einer von über 80 verschiedenen Methylierungsklassen zu.

Nur Fälle deren höchster Score sich für die Methylierungsklasse pituicytoma / granular cell tumor / spindle cell oncocytoma ergab, wurden in die Serie eingeschlossen. Der Classifier-Score gibt Auskunft über den Grad der Ähnlichkeit oder Übereinstimmung eines Methylierungsprofils mit einer bestimmten Methylierungsklasse. Er reicht von 0 [keine Ähnlichkeit] bis 1 [höchste Ähnlichkeit].

## 2.4 Auswertung der DNA-Methylierungsdaten

### 2.4.1 Einarbeitung in R

Zur Auswertung der auf dem iScan erzeugten Rohdaten (idat files) stehen Pakete in verschiedenen Programmiersprachen, beispielsweise R oder Python, zur Verfügung. Für beide Sprachen existieren mittlerweile zahlreiche Pakete, die Funktionen zur Auswertung von idat files anbieten.

Da an unserem Institut und an kooperierenden Instituten für die geplanten Analysen R verwendet wird, wurde eine Einarbeitung in diese Sprache angestrebt. Um grundlegende Syntaxvorstellungen zu erlernen und zu vertiefen, boten sich gerade in der aktuellen Situation und berufsbegleitend verschiedene online Plattformen an: coursera, udemy, datacamp sind bekannte Anbieter verschiedener online-Kurse im IT-Bereich, die teils auch mit Zertifikat abgeschlossen werden können. Es wurde hauptsächlich datacamp genutzt, wo Kurse zum Umgang mit verschiedenen Dateiformaten und großen Datentabellen sowie anhand zahlreicher frei online verfügbarer Beispieldatensätze (iris, mtcars, diamonds, babynames, etc.) Standardfunktionen der Datenauswertung erlernt werden konnten. Zudem stehen an den meisten Universitäten zusätzlich verschiedene Präsenzkurse zur Verfügung. An der Charité wurden Grundkurse in R für statistische Anwendungen besucht. Zusätzlich wurde ein Kurs über das Berlin Institute of Health (BIH) absolviert, der neben fortgeschrittenen Anwendungsbeispielen in statistischer Auswertung auch hilfreiche Grundlagen zum Umgang mit Datensätzen und zum strukturierten wissenschaftlichen Arbeiten vermittelte.

### 2.4.2 Kontrolle und Anleitung durch erfahrene Anwender

Zur Auswertung von Datensätzen werden in der Regel mehrere Funktionen aus verschiedenen Paketen angewendet. Diese werden für wiederholte Anwendungen des Prozederes in einem Skript dokumentiert. Wir haben in unserer Arbeit auf bereits publizierte und gut dokumentierte Methoden zurückgegriffen und diese unseren Bedürfnissen entsprechend angepasst und modifiziert. Die Anwendung von erstellten Skripten wurde durch Bioinformatikerinnen angeleitet und in der Anfangsphase eng supervidiert.

Nachdem eine entsprechende Sicherheit im Umgang mit den Daten erlangt wurde, wurden von ihr selbstständig bestehende Skripten variiert, erweitert sowie

weiterreichende Skripte selbstständig erstellt. Insbesondere wurden Fähigkeiten in der Anwendung von ggplot2 zur Erstellung aussagekräftiger Abbildungen der Daten vertieft. Zudem wurde auch ein Verständnis für den Aufbau von R-Paketen und Zugriffsmöglichkeiten auf vorbestehende Objekte sowie Funktionen in diesen Paketen erworben.

## **2.5 Unsupervidierte hierarchische Clusteranalyse**

Der Ansatz der vergleichenden Auswertung von Methylierungsdaten beruht auf der Bewertung der Unterschiedlichkeit des Methylierungsgrades jedes CpG-Lokus über alle eingeschlossenen Tumorproben hinweg. Die Bewertung der Varianz in einem Probenet ist somit zentraler Punkt unserer Arbeit gewesen. Hierfür stehen verschiedenen informatische Pakete und Ansätze zur Verfügung.

Wir haben uns zur Nutzung unsupervidierter Ansätze entschieden und eine unsupervidierte Clusteranalyse sowie ein t-distributed stochastic neighbour embedding (tSNE) als geeignete Analysemethoden identifiziert.

Der unsupervidierte Ansatz der Analyse wird geringfügig dahingehend relativiert, dass für jede der Analysen individuelle anpassbare Parameter vorliegen. Diese Tatsache lässt den Spielraum, die Darstellung der Ergebnisse, so anzupassen, dass sie die Kohorte und die ihr zugrundeliegenden Prinzipien am besten repräsentieren.

Die Analysen wurden durchgeführt wie in unserer Arbeit beschrieben.[71] Zur Durchführung einer unsupervidierten Clusteranalyse haben wir die R-Pakete base:stats, NbClust (v.3.0) und ComplexHeatmap (v.2.0.0) verwendet.[91,92]

## **2.6 t-distributed stochastic neighbour embedding (tSNE)**

Zudem haben wir uns zur Nutzung des t-distributed stochastic neighbour embedding (tSNE) entschieden. Auch dies ist ein Verfahren zur Veranschaulichung der Ähnlichkeiten der Fälle in einem hochdimensionalen Datenset. Dieser Algorithmus erstellt auf der Grundlage der Distanzmessung zwischen zwei Punkten eine Distanzmatrix im hochdimensionalen Raum und adaptiert auf Grundlage der Iteration eine Distanzmatrix im niedrigdimensionalen Raum.[93,94]

## **2.7 Analyse der chromosomalen Kopiezahlvariation (CNV)**

Aus den durchgeführten DNA Methylierungsanalysen lassen sich mit Hilfe des R-Paketes `cnvme` (v 1.18.0) chromosomale Kopiezahlprofile errechnen.[95] Dies wurde durchgeführt, wie in unserer Arbeit beschrieben.[71]

## **2.8 Differentially methylated regions und Genset-Analyse**

Die Analyse der differentially methylated regions (DMRs) erfolgte mit den R-Paketen `limma` (v.3.46.0) und `DMRcate` (v.2.4.1) wie zuvor beschrieben.[96–98]

Hierfür wurden Fälle der Methylierungsklassen pilozytisches Astrozytom, posterior Fossa; pilozytisches Astrozytom, Mittellinie; und pleomorphes Xanthoastrozytom aus dem Brain Tumor Classifier Referenzset in die Analyse miteinbezogen.[85] Gensetanalyse und weitere Aufarbeitung der Resultate erfolgten wie in Schmid et al. beschrieben.[71]

## **2.9 Targeted DNA next generation sequencing**

Das targeted DNA next generation sequencing und Datenauswertung wurden an der University of California, San Francisco (UCSF), wie in Schmid et al. beschrieben, durchgeführt.[71] Von insgesamt 37 von 47 Tumorproben war ausreichend Material für eine zielgerichtete DNA-Sequenzierungsanalyse verfügbar.

Die capture-basierte Next-Generation-Sequenzierung wurde mit einem Array durchgeführt, der auf alle kodierenden Exons von 479 krebsrelevanten Genen, ausgewählte Introns und upstreamgelegene regulatorische Regionen von 47 Genen abzielt, mit einem Gesamtsequenzierungs-Footprint von 2,8 Mb (UCSF500 Cancer Panel; siehe ergänzende Tabelle 2 in Schmid et al).[99]

## **2.10 Analyse des progressionsfreien Überlebens**

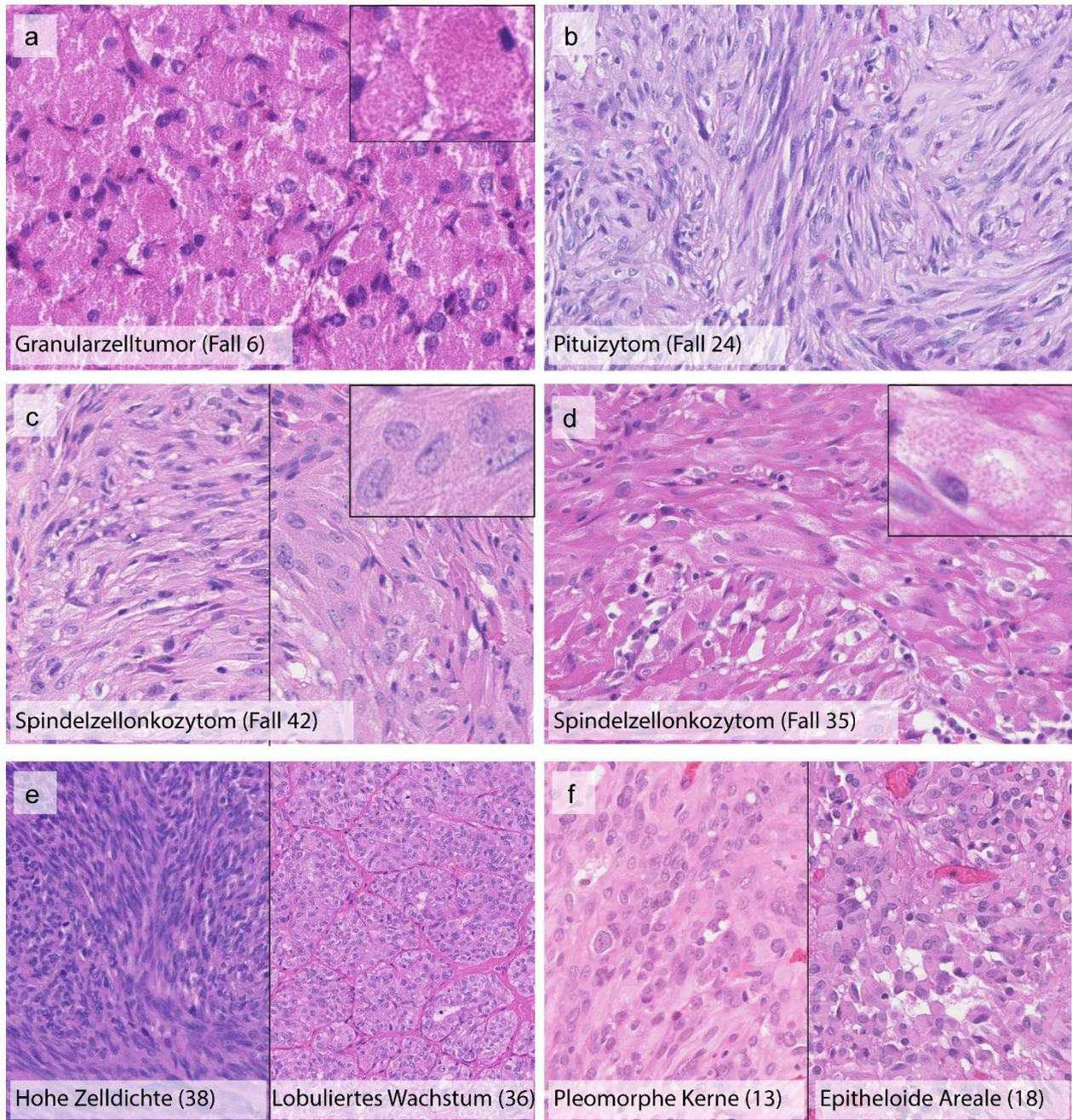
Für 37 Patient\*innen lagen Daten zum Krankheitsverlauf vor. Die Analyse des progressionsfreien Überlebens wurde mit den R-Paketen `survival` (v 2.44-1.1) und `survminer` (v 0.4.6) wie in Schmid et al beschrieben durchgeführt.[71,100]

### **3 Ergebnisse**

Aufgrund der Ausführlichkeit der Darstellungen der Ergebnisse in unserem publizierten Artikel folgt hier lediglich eine verkürzte Darstellung der bedeutsamsten Ergebnisse. Eine zum Teil ausführlichere Darstellung findet sich unter Schmid et al.[71]

#### **3.1 Auswertung der histologischen Merkmale**

Die Auswertung der histologischen Merkmale erfolgte anhand von HE-gefärbten Objektträgern, die für 46 von 47 Fällen zur Verfügung standen. Einen Eindruck des histologischen Erscheinungsbildes von Granularzelltumoren, Pituizytomen und Spindelzellonkozytomen geben die Abbildungen 4a-4e, entnommen und modifiziert aus Schmid et al.[71]



*Abbildung 4: Histologie der Hypophysenhinterlappentumoren. Abbildung entnommen aus Schmid et al. 2021. „Repräsentative Hämatoxylin und Eosin gefärbte Schnitte, die das histomorphologische Spektrum der verschiedenen Hypophysenhinterlappentumoren zeigen. Granularzelltumoren weisen typischerweise polygonale Zellen, granuläres Zytoplasma und kleine, exzentrische Kerne auf (a). Pituizytome bilden typischerweise spindelförmige Zellen ohne granuläre oder onkozytäre Veränderungen (b). Spindelzellonkozytome haben ein variables histologisches Erscheinungsbild; prototypische Exemplare zeigen storiformes oder faszikuläres Wachstum (c). Bei den Spindelzellonkozytomen dieser Serie wurden zu einem gewissen Grad granuläre zytoplasmatische Veränderungen beobachtet. Einige Proben zeigten nur fokales granuläres Zytoplasma (c), während diese Veränderungen bei anderen Tumoren ausgeprägt*

waren (d). Einige Tumore wiesen morphologische Merkmale wie hohe Zelldichte oder lobuläre Wachstumsmuster (e), pleomorphe Kerne oder epitheloide Zytologie auf (f). Originalvergrößerung aller Bilder 400×, Inset 800×“

Die Ergebnisse der Auswertung der einzelnen morphologischen Features finden sich in Abbildung 5 (siehe unten).

### 3.2 Molekulare Auswertung

Zur molekularen Charakterisierung von Hypophysenhinterlappentumoren führten wir targeted DNA next generation sequencing (n=37), genomweite DNA-Methylierungs-Profilierung (n=47) und chromosomale Kopienzahlvariation anhand von DNA-Methylierungsdaten (n=47) durch, wie in Schmid et al. beschrieben [71].

#### 3.2.1 Spindelzellonkozytome und Pituizytome zeigen MAPK/PI3K Signalweg- und epigenetische Regulator-Mutationen

Die targeted DNA next generation sequencing Analysen wurden an der University of California, San Francisco unter Verwendung des dort verfügbaren UCSF Cancer Gene Panel durchgeführt und ausgewertet. Für 37 Fälle (10 Granularzelltumore, 18 Spindelzellonkozytome, 9 Pituizytome) stand ausreichend Material zur Verfügung. In 17 der 37 Fälle konnten wir 27 wahrscheinlich pathogene Varianten nachweisen. In 20 der untersuchten Tumoren ließen sich mit dem targeted DNA next generation sequencing Ansatz keine genomischen Varianten feststellen. Die Ergebnisse gehen aus den Tabellen 1 und Abbildung 2 in Schmid et al. hervor.[71]

Die Varianten konnten hauptsächlich in Genen nachgewiesen werden, die entweder Teil des mitogen activated protein kinase / phosphatidylinositol 3 kinase (MAPK/PI3K) Signalweges waren oder im Bereich epigenetischer Regulationsgene lokalisiert waren. Eine detaillierte Beschreibung der festgestellten Varianten findet sich in Schmid et al., zudem sind detaillierte Informationen zu den detektierten Varianten der Supplementärtabelle 3 in Schmid et al zu entnehmen [71] .

Hinweise auf strukturelle Umlagerungen (Gen-Fusionen) im Bereich bestimmter auf dem Panel abgedeckter Genbereiche ließen sich in den untersuchten Tumoren nicht feststellen. Ebenso zeigten sich keine Amplifikationen oder tiefen Deletionen.

Interessanterweise war die Verteilung der identifizierten genetischen Veränderungen auf die verschiedenen histologischen Typen von Hypophysenhinterlappentumoren nicht zufällig (Abb. 5, entnommen und modifiziert aus Schmid et al.).

In Pituizytomen (10 Varianten in 9 sequenzierten Fällen) und Spindelzellonkozytomen (14 Varianten in 18 sequenzierten Fällen) wurden häufig krebsrelevante Mutationen identifiziert. Wohingegen nur in einem einzigen Fall der 10 sequenzierten Granularzelltumoren eine Treibervariante detektiert werden konnte (im epigenetischen Regulator *DNMT3A*).

Mutationen von Genen des MAPK/PI3K-Signalwegs wurden sowohl bei Pituizytomen (66 %, 6 von 9 Fällen) als auch bei Spindelzellonkozytomen häufig beobachtet (38 %, 7 von 18 Fällen), waren aber bei keinem der Granularzelltumoren nachweisbar. Epigenetische Regulatormutationen wurden in allen histologischen Typen beobachtet, waren aber in Spindelzellonkozytomen angereichert (Spindelzellonkozytom: 6 Varianten in 18 Fällen; Granularzelltumor: 1/10; Pituizytom: 1/9).

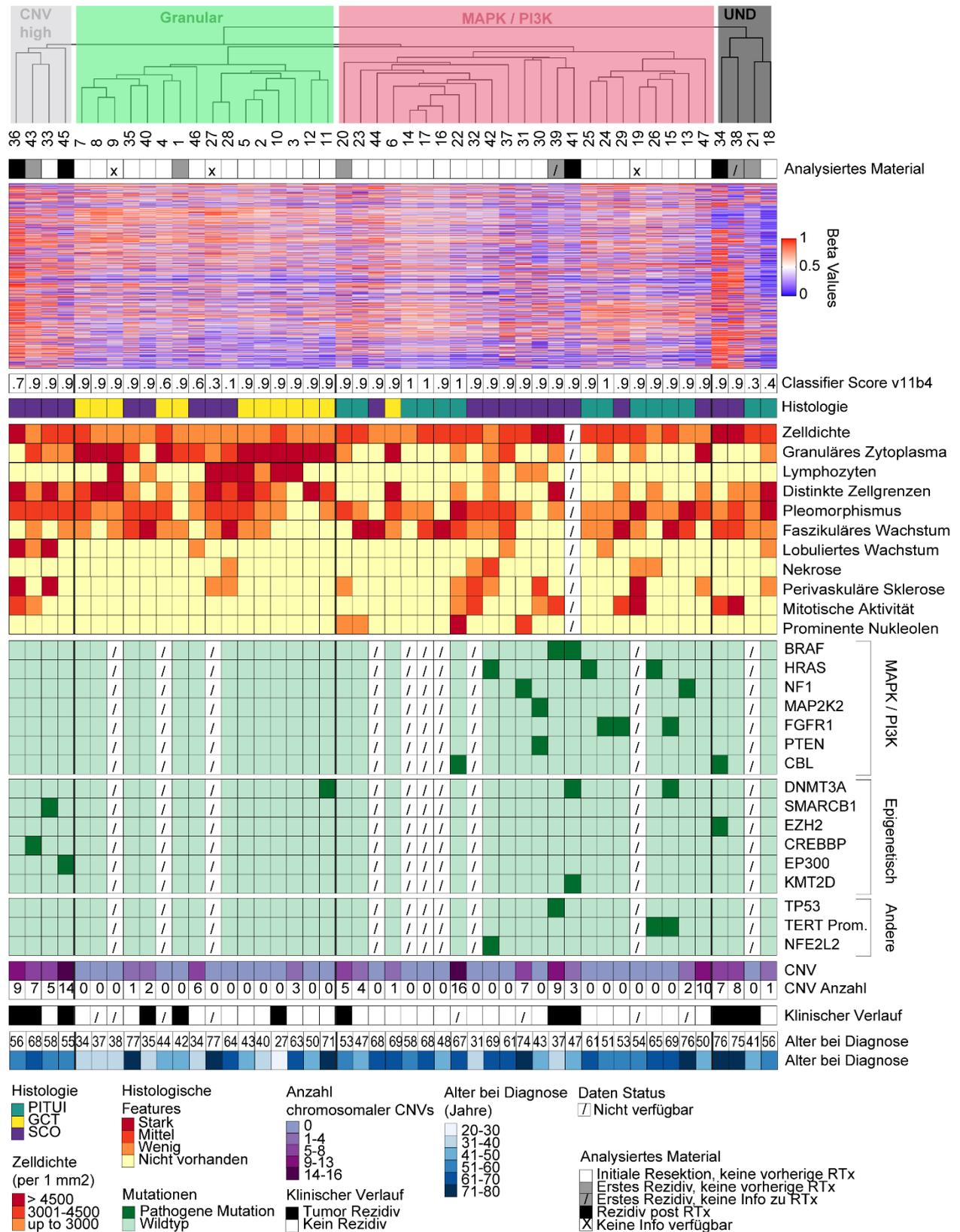


Abbildung 5: Unsupervidiertes hierarchisches Clustering der DNA-Methylierungsdaten. Abbildung übernommen und angepasst aus Schmid et al. 2021. „Unsupervidiertes hierarchisches Clustering der DNA Methylierungsdaten zusammen mit klinischen und weiteren molekularen Daten. Die Analyse zeigt zwei große Methylierungsgruppen, eine kleine Gruppe und vier undefinierte Fälle.

*Die größte Gruppe ist angereichert mit Spindelzellonkozytomen und Pituizytomen und stark angereichert für Mutationen des MAPK/PI3K-Signalwegs (MAPK/PI3K-Gruppe, rot). Die zweitgrößte Gruppe ist angereichert für Granularzelltumoren (Granuläre Gruppe, grün). In dieser Gruppe gibt es nur wenige Kopienzahlveränderungen und seltene onkogene Mutationen. Eine kleine Gruppe besteht aus vier Fällen mit einer hohen Anzahl von Kopienzahlveränderungen und häufig epigenetischen Regulatormutationen (CNV high Gruppe, grau). RTx - Strahlentherapie, UND. - undefiniert, CNV - Kopienzahlveränderung, PITUI - Pituizyotom, GCT - Granularzelltumor, SCO – Spindelzellonkozytom“*

### 3.2.2 DNA-Methylierungsprofilierung deutet auf zwei Hauptuntergruppen von Hypophysenhinterlappentumoren hin

Zu Beginn unserer Arbeiten führten wir eine Sicherung der Diagnose unter Zuhilfenahme der Berechnung der auf DNA-Methylierung basierenden Classifier-Scores durch (<https://www.molecularneuropathology.org/mnp>; Classifier Version v11b4 [85]). Diese ergab für alle 47 Tumoren den höchsten Score für die DNA-Methylierungsklasse Pituizyotom/Granularzelltumor/Spindelzellonkozytom, wobei jedoch sieben Tumoren nicht den wünschenswerten Grenzwert von 0,9 für eine eindeutige Klassifikation erreichten (Abb. 2 in Schmid et al.).[85]

Wir führten eine tSNE-Analyse der 47 Fälle zusammen mit der kompletten Referenzkohorte des Brain Tumor Classifiers durch (supplementäre Abbildung 1 in Schmid et al.).[71,85] Hier bildete die überwiegende Mehrzahl der 47 Tumoren einen kompakten Cluster, der sich deutlich von anderen Tumorgruppen unterschied.

Zur vertiefenden Analyse der DNA-Methylierungsdaten führten wir mehrere tSNE-Analysen der 47 Hypophysenhinterlappentumoren alleine sowie in mit weiteren Referenzmethylierungsklassen unterschiedlich zusammengesetzten Kollektiven durch (Abb. 6, entnommen und modifiziert aus Schmid et al. 2021)

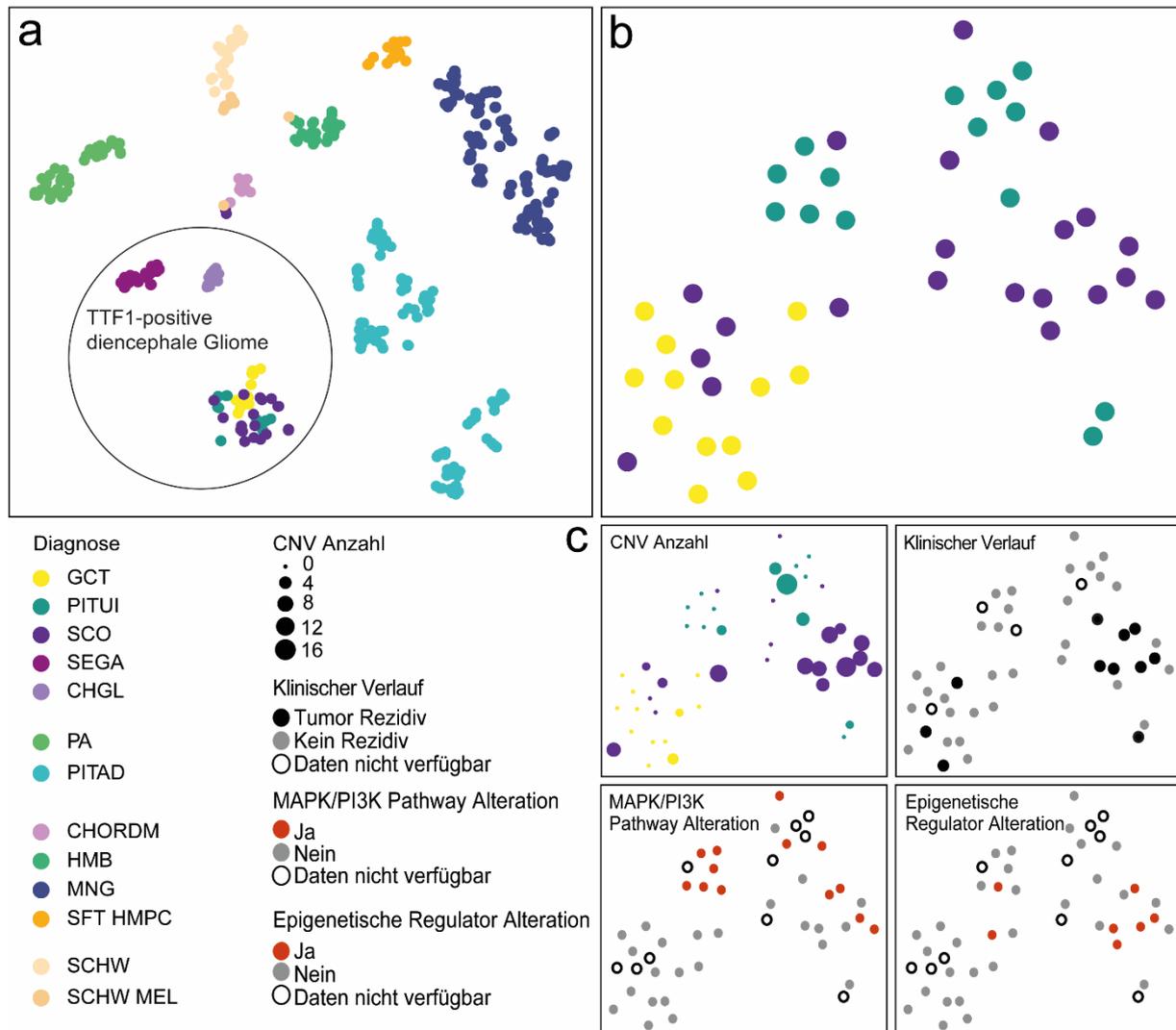


Abbildung 6: *t*-distributed stochastic neighbour embedding (tSNE) der DNA Methylierungsdaten. Abbildung entnommen und angepasst aus Schmid et al. 2021. „Darstellung des *t*-distributed stochastic neighbour embedding (tSNE) ausgewählter Gruppen der Brain Tumor Classifier-Kohorte [7] zusammen mit den Fällen dieser Serie. Die Tumoren dieser Studie gruppieren sich eng beieinander und grenzen sich gut von den anderen eingeschlossenen Gruppen, insbesondere von anderen TTF1-positiven Gliomen ab. PITUI Pituizyotom, GCT Granularzelltumor, SCO Spindelzellonkozytom, SEGA subependymales Riesenzellastrozytom, CHGL Chordoides Gliom des dritten Ventrikels, PA pilozytisches Astrozytom, PITAD Hypophysenadenom, CHORDM Chordom, HMB Hämangioblastom, MNG Meningeom, SFT HMPC solitärer fibröser Tumor/Hämangioperizyotom, SCHW Schwannom, SCHW MEL melanotisches Schwannom (a). tSNE-Plots der Hypophysenhinterlappentumoren zeigen eine leichte Trennung von granulären Tumoren unten links sowie Pituizyotomen und Spindelzellonkozytomen auf der rechten Seite (b). Die Überlagerung der NGS Daten zeigt, dass MAPK/PI3K-Signalweg-Alterationen und epigenetische Regulator-Alterationen überwiegend in der großen Gruppe, die von Spindelzellonkozytomen und Pituizyotomen dominiert wird,

*vorkommen (c). Eine Überlagerung mit Kopienzahlinformationen (c), zeigt, dass sich die meisten Fälle mit hohen Raten von Kopienzahlveränderungen zusammen gruppieren, und dass diese Fälle teilweise dieselben Fälle waren, die später ein Rezidiv aufwiesen (c) Fehlende Daten sind durch offene Kreise dargestellt.“*

In einer tSNE-Analyse der 47 Hypophysenhinterlappentumore zusammen mit ausgewählten Tumorklassen aus der Brain Tumor Classifier-Kohorte[85] bildeten die Hypophysenhinterlappentumoren ebenfalls einen separaten Cluster, der sich von den anderen Klassen abgrenzt (Abb. 6). Interessanterweise waren die engsten Nachbarn der Hypophysenhinterlappentumoren die beiden anderen TTF1-exprimierenden Tumorguppen subependymales Riesenzellastrozytom (SEGA) und chordoides Gliom.

Zudem führten wir ein unsupervidiertes hierarchisches Clustering der DNA-Methylierungsdaten der 47 Hypophysenhinterlappentumoren durch (Abb. 4). Dieser Abbildung kommt in unserer Arbeit eine zentrale Bedeutung zu, da nahezu alle durchgeführten Analysen (Histologische, Sequenzierungs- und chromosomale Kopiezahldaten, klinische Daten) in einer Übersicht zusammengefasst und so im gegenseitigen Kontext interpretierbar werden.

Die hierarchische Cluster Analyse legte die Aufteilung in zwei große Gruppen, eine mögliche kleine Gruppe und vier Ausreißerfälle nahe. Die Gruppen wurden von uns vorläufig nach ihrem auffälligsten molekularen Merkmal benannt: Die größte Gruppe war durch eine hohe Rate ( $n=12/17$ ; 71 %) an MAPK/PI3K-Signalwegveränderungen gekennzeichnet (MAPK/PI3K-Gruppe) und umfasste hauptsächlich Fälle aus dem morphologischen Spektrum der Pituizyome und Spindelzellonkozytome. Die zweitgrößte Gruppe wurde von Granularzelltumoren dominiert („granuläre Gruppe“). Die Tumoren der granulären Gruppe wiesen in der großen Mehrzahl der Fälle keine pathogenen Mutationen auf und zeigten keine oder nur sehr wenige Kopiezahlveränderungen. Außerdem beobachteten wir eine kleine Gruppe von vier Fällen mit zahlreichen Kopiezahlveränderungen (CNV-high-Gruppe: 4 Spindelzellonkozytome). Diese kleine Gruppe war angereichert mit epigenetischen Regulatormutationen ( $n=3/4$ ; 75%) und wies keine MAPK/PI3K-Signalwegveränderungen auf. Vier Fälle (ID 18, 21, 34, 38) fielen nicht in die oben genannten Gruppen, sondern stellten eher Ausreißer dar, die wir nicht als separate Gruppe betrachteten. Sie sind in Abb. 2 in Schmid et al. als „undefiniert“ (UND)

bezeichnet und stellen möglicherweise eine Ansammlung seltener zusätzlicher Tumorarten im Zusammenhang mit dem Hypophysenhinterlappen dar.

Bei einer tSNE-Analyse der Hypophysenhinterlappentumoren allein wurde ebenfalls eine leichte Trennung zwischen Granularzelltumoren und einer großen Gruppe aus Spindelzellonkozytome und Pituizytome (Abb. 6, entnommen aus Schmid et al.), passend zu der generellen Aufteilung der Fälle im hierarchischen Clustering, beobachtet.

### 3.2.3 Chromosomale Kopiezahlvariation

Es wurde eine Berechnung der Kopienzahlprofile aus DNA-Methylierungs-Array-Daten durchgeführt. 27 von 47 Fällen wiesen keine chromosomalen Veränderungen auf. Bei 61 % der Spindelzellonkozytome (13/21), 35 % der Pituizytome (5/14) und 17 % der Granularzelltumore (2/12) wurden eine oder mehrere chromosomale Veränderungen festgestellt. Die Gesamtzahl der Kopienzahlveränderungen pro Fall war beim Spindelzellonkozytom deutlich höher als in Pituizytomen oder Granularzelltumoren. Fokale Amplifikationen oder fokale tiefe/homozygote Deletionen wurden bei keinem der 47 Tumore beobachtet.

Um die Stabilität von Kopienzahlveränderungen in verschiedenen Regionen eines Tumors exemplarisch zu untersuchen, wählten wir einen Fall (ID 47, 10 CNVs) mit vier morphologisch unterschiedlichen Bereichen aus und führten von jedem dieser Bereiche separate DNA-Methylierungs- und Kopienzahlanalysen durch. In allen vier Bereichen waren die Kopienzahlveränderungen weitgehend identisch, wie in Abb. 7a ersichtlich (entnommen und modifiziert aus Schmid et al. 2021). Wir untersuchten drei weitere Fälle mit Gewebe aus zwei oder mehr Operationszeitpunkten (Primär- und Rezidiv Operation). Alle Fälle wiesen sowohl im Ersttumor als auch im Rezidiv chromosomale Kopienzahlveränderungen auf (Fall 39, Abb. 7b; Fall 38, Abb. 7c, Fall 45, Abb. 7d). In zwei der Fälle wurden einzelne chromosomale Veränderungen im Laufe der Zeit verloren oder hinzugewonnen, jedoch blieben die meisten der Veränderungen stabil (Abb. 7). Sowohl die granuläre- als auch die MAPK/PI3K- DNA-Methylierungsgruppe wiesen keine spezifischen, häufig in Tumoren dieser Gruppe wiederkehrenden Kopienzahlveränderungen auf. Die kleine epigenetische Gruppe der CNV-high-Tumoren

wies zahlreiche Chromosomenveränderungen auf, wobei alle vier Fälle einen Verlust von Chromosom 1p zeigten.

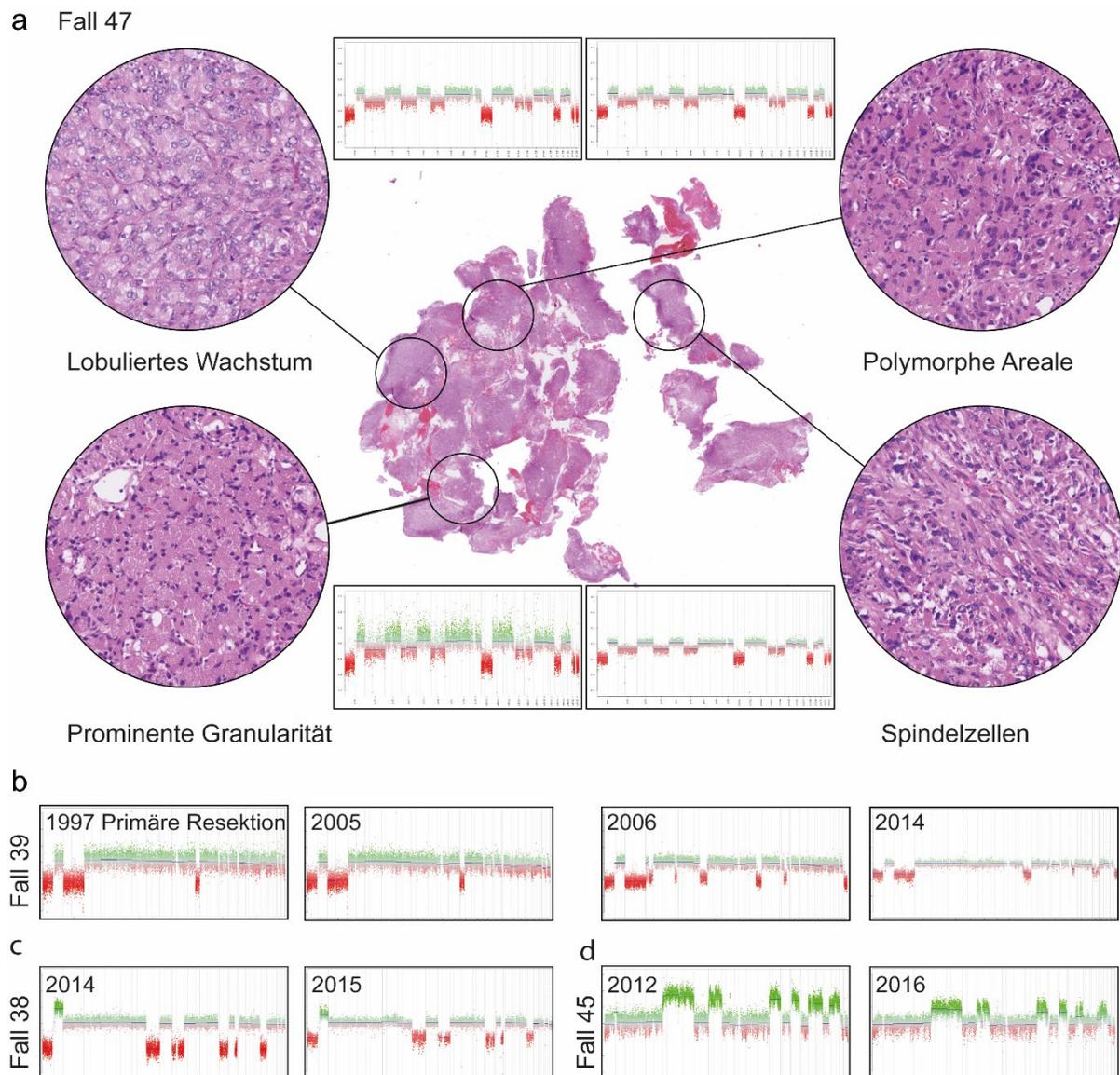


Abbildung 7: Stabilität von Kopiezahlveränderung an exemplarischen Fällen. Abbildung entnommen und modifiziert aus Schmid et al., 2021. „Veranschaulichung der Stabilität von Kopiezahlveränderungen in einem ausgewählten Fall (Fall 47, 10 CNVs) mit vier morphologisch unterschiedlichen Bereichen. Die Kopiezahlveränderungen sind in allen vier Bereichen identisch (a). Abbildung von Copy-Number-Plots von drei Fällen mit Gewebe aus zwei oder mehreren Operationszeitpunkten (b-d). In zwei der Fälle wurden einzelne chromosomale Veränderungen im Laufe der Zeit hinzugewonnen oder verloren, während die meisten Aberrationen stabil blieben.“

### 3.3 Analyse des progressionsfreien Überlebens

#### 3.3.1 Spindelzellonkozytome mit chromosomalen Kopiezahlvariationen wiesen die höchste Rezidivrate auf.

Daten zum progressionsfreien Überleben waren für 37 der 47 Patient\*innen der Serie verfügbar. Sieben Patient\*innen starben während der Nachbeobachtung (Median: 6.11 Jahre, Spanne: 11 Tage bis 17.83 Jahre), wobei keiner der Todesfälle eindeutig auf die Tumorbilogie zurückzuführen war. Daher führten wir nur eine Analyse des progressionsfreien Überlebens durch. Wir führten eine univariate Analyse des progressionsfreien Überlebens für die histologische Diagnose, die DNA-Methylierungsgruppe, das Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein von Kopiezahlveränderungen und das Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein einer MAPK/PI3K-Mutation durch (Abb. 8a-d, entnommen und modifiziert aus Schmid et al., 2021). Die Rezidivraten unterschieden sich für die drei histologischen Diagnosen. Spindelzellonkozytome wiesen die höchsten Rezidivraten auf: In 8 von 17 (47 %) Fällen war eine zweite Operation erforderlich und die mediane Zeit bis zum Rezidiv betrug 4,8 Jahre (Zeitspanne 5 Monate bis 9,4 Jahre). Nur bei zwei von 9 Granularzelltumoren kam es zu einem Rezidiv (Zeit bis zum Wiederauftreten 4,7 Jahre und 10,3 Jahre) und bei 2 von 11 Pituizytomen (Zeit bis zum Wiederauftreten 5,1 Jahre und 5 Jahre). In der Kaplan-Meier-Analyse zeigte sich ein Trend zu einem kürzeren progressionsfreien Überleben bei den Spindelzellonkozytomen im Vergleich zu den Pituizytomen, der jedoch keine statistische Signifikanz erreichte ( $p=0,21$ ; Abb. 8a in Schmid et al.). Bei der Analyse der drei DNA-Methylierungsgruppen hatte die Gruppe "CNV-high" das kürzeste progressionsfreie Überleben mit einem statistisch signifikanten Unterschied zur MAPK/PI3K-Gruppe ( $p=0,011$ , Abb. 8.). Wir untersuchten aufgrund der Ergebnisse der Clusteranalyse und der tSNE-Analyse (Abb. 5 und 6, entnommen aus Schmid et al.), ob Kopiezahlveränderungen mit dem progressionsfreien Überleben assoziiert sind. In der gesamten Kohorte hatten Patient\*innen mit Tumoren, die chromosomale Veränderungen aufwiesen, ein signifikant kürzeres progressionsfreies Überleben ( $p=0,0071$ ; Abb. 8c). Beim Vergleich von Mutationen der verschiedenen Signalwege mit Wildtypfällen wurde kein Zusammenhang zwischen dem Mutationsstatus und dem progressionsfreien Überleben festgestellt (Daten für MAPK/PI3K-Mutation,  $p=0,89$ , Abb. 8d).

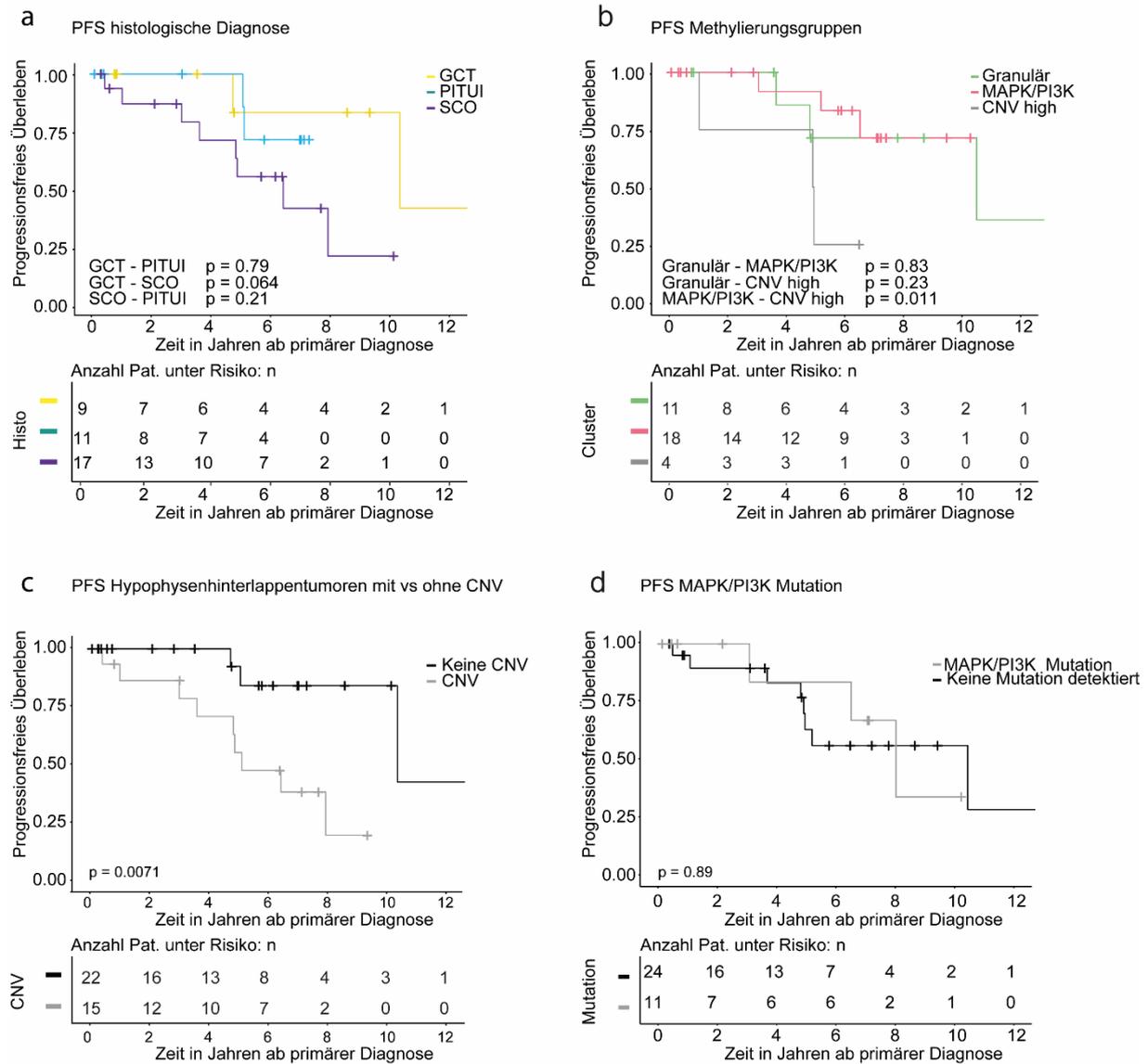
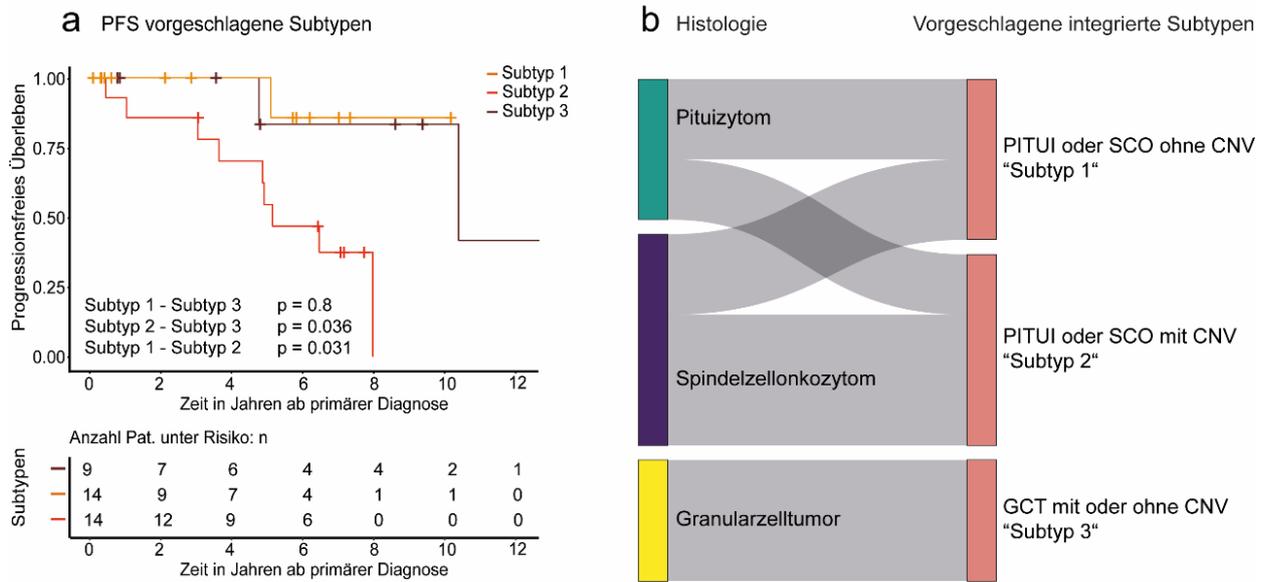


Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurven zum progressionsfreien Überleben. Abbildung entnommen und modifiziert aus Schmid et al., 2021. „Kaplan-Meier-Analyse des progressionsfreien Überlebens. Analyse stratifiziert nach zentraler histologischer Diagnose. Spindelzellonkozytome rezidierten häufiger und früher im Vergleich zu den beiden anderen histologischen Typen. Statistische Signifikanz wurde weder für Spindelzellonkozytome vs. Pituizytome ( $p = 0,21$ ) noch für die anderen Gruppen erreicht (a). Analyse nach DNA-Methylierungsgruppen zeigt ein kürzeres progressionsfreies Überleben für die CNV-high-Gruppe im Vergleich zur MAPK/PI3K-Gruppe ( $p = 0,011$ ), wobei die granuläre Gruppe zwischen den beiden anderen Gruppen liegt (nicht signifikant) (b). Analyse aller Hypophysenhinterlappentumoren nach dem Vorhandensein von Kopiezahlveränderungen (d.h. Chromosomenzugewinne oder -verluste) zeigte, dass Tumoren mit Kopiezahlveränderungen ein kürzeres progressionsfreies Überleben hatten ( $p = 0,0071$ ) (c). Analyse nach Vorhandensein einer Mutation im MAPK/PI3K Signalweg im Vergleich zu keiner Mutation erreichte keine statistische Signifikanz ( $p = 0,89$ ) (d).“

### 3.3.2 Integrierte histomolekulare Klassifizierung verbessert die Einteilung von Hypophysenhinterlappentumoren in prognostische Gruppen

Auf Grundlage unserer durchgeführten Analysen und basierend auf unserer Tumorkohorte scheint das Vorhandensein von Kopiezahlveränderungen der wichtigste Faktor für die Einteilung von Hypophysenhinterlappentumoren in prognostische Gruppen zu sein (Abb. 8c). Darüber hinaus bilden Pituizytome und Spindelzellonkozytome ein histologisches Kontinuum, und unsere molekularen Daten zeigen, dass beide Tumore ein gemeinsames Methylierungsprofil und ein gemeinsames Mutationsspektrum aufweisen. Basierend auf diesen Erkenntnissen schlagen wir eine integrierte histomolekulare Klassifizierung von Hypophysenhinterlappentumoren in 3 Subtypen vor (Abb. 9, entnommen und modifiziert aus Schmid et al.). Die Kaplan-Meier-Analyse von Tumoren, die in diese drei integrierten Subtypen stratifiziert wurden, zeigt eine signifikant bessere Trennung in prognostische Gruppen im Vergleich zu den histologischen Subtypen allein, dem Mutationsstatus allein oder den DNA-Methylierungsgruppen allein (Abb. 9a).

Subtyp 1 umfasst Pituizytome und Spindelzellonkozytome ohne Kopiezahlveränderung (n=16). Bei diesen Tumoren sind häufig Mutationen des MAPK/PI3K-Signalwegs, epigenetischer Regulatoren oder anderer Signalwege zu finden. Sie zeigen in der Regel einen gutartigen klinischen Verlauf. Nur ein Tumor aus dieser Gruppe trat während der Nachbeobachtung erneut auf. Dabei handelte es sich um ein Pituizyтом ohne Kopiezahlveränderungen. Die 9 Spindelzellonkozytome in dieser Gruppe rezidierten während der medianen Nachbeobachtungszeit von 2,8 Jahren nicht (Abb. 9b). Zum Subtyp 2 (n=19) gehören Pituizytome und Spindelzellonkozytome mit Vorhandensein von chromosomalen Kopiezahlveränderungen. 47% (8/17 Fälle mit Nachbeobachtungsdaten) der Tumoren in dieser Gruppe rezidierte während einer medianen Nachbeobachtungszeit von 7 Jahren. Subtyp 3 besteht aus Granularzelltumoren mit oder ohne Kopiezahlveränderungen (n=12). Nur 2 Tumoren dieser Gruppe rezidierten während der medianen Nachbeobachtungszeit von 4,7 Jahren, und die rezidivierenden Tumoren wiesen keine Kopiezahlveränderungen auf. Es könnte daher sein, dass die Tumorprogression in diesen Tumoren nicht mit dem Vorliegen von Kopiezahlvariationen assoziiert ist, sondern mit anderen Faktoren.



**Abbildung 9:** *Vorgeschlagene neue histomolekulare Subtypen der Hypophysenhinterlappentumoren. Abbildung entnommen und modifiziert aus Schmid et al., 2021. „Kaplan-Meier-Analyse des progressionsfreien Überlebens, stratifiziert nach den drei vorgeschlagenen Subtypen, zeigt eine verbesserte Trennung im Vergleich zur Stratifizierung auf Basis der histologischen Diagnose (a). Ein Sankey-Plot der Umgruppierung der Hypophysenhinterlappentumoren dieser Serie in die 3 vorgeschlagenen Subtypen zeigt die Verschiebung von 8 Spindelzellonkozytomen ohne CNV zum Subtyp 1 und die Verschiebung von 6 Pituizytomen mit CNV zum Subtyp 2 (b)“*

## 4 Diskussion

### 4.1 Kurze Zusammenfassung unserer Ergebnisse

In unsere Arbeit konnten wir zwei wesentliche molekulare Gruppen unter den Hypophysenhinterlappentumoren identifizieren, welche sich durch ihr Mutationsspektrum und das Vorhandensein chromosomaler Aberrationen unterscheiden. Wir konnten zeigen, dass in einem großen retrospektiven Kollektiv in der Gruppe der Spindelzellonkozytome und Pituizytome das Vorhandensein von Kopiezahlveränderungen assoziiert ist mit einem signifikant kürzeren progressionsfreien Überleben. Zudem ließen sich in der Gruppe der Pituizytome und Spindelzellonkozytome Alterationen von Genen des MAPK/PI3K-Signalweges sowie in epigenetischen Regulator

Genen nachweisen, welche mögliche Angriffspunkte für zielgerichtete Therapien darstellen könnten (Abb. 10, entnommen und modifiziert aus Schmid et al.).

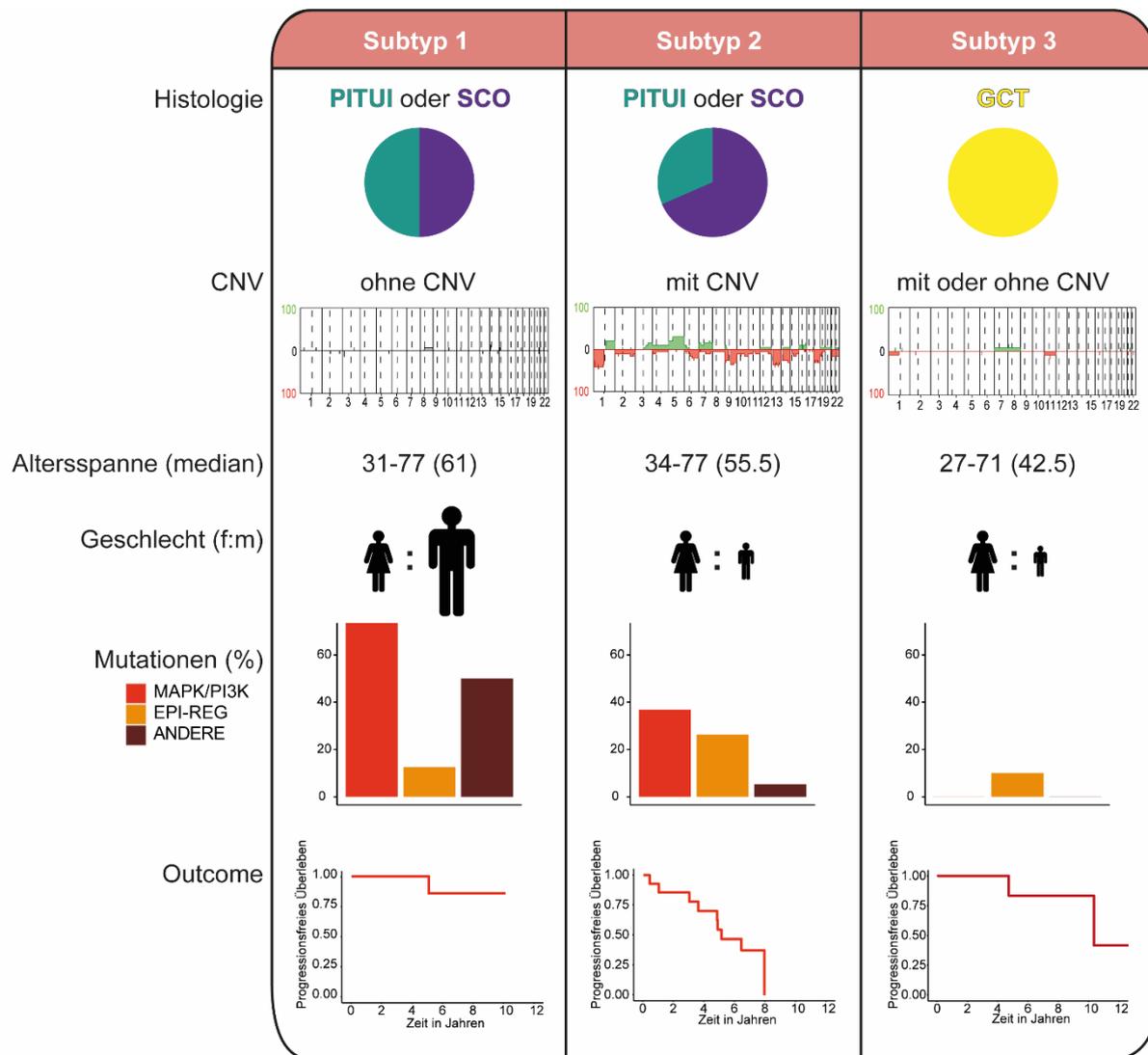


Abbildung 10: Piktogramm zu den vorgeschlagenen neuen histomolekularen Subtypen. Abbildung entnommen und modifiziert aus Schmid et al, 2021. „Piktogramm zu den Beziehungen zwischen histologischen Typen, Mutationshäufigkeiten, Kopiezahlveränderungen (CNV) und dem progressionsfreien Überleben (Outcome) der vorgeschlagenen histomolekularen Subtypen“

#### 4.2 Interpretation der Ergebnisse

Die Histomorphologie der 3 Tumorentitäten ist in der Literatur ausführlich beschrieben.[33,37,39] Die Resultate der Evaluation der Histomorphologie unserer Fälle entsprachen dem Spektrum an publizierten Daten. Die detaillierte morphologische Charakterisierung des Tumorkollektivs erfolgte, um Ergebnisse genomischer Analysen

mit morphologischen Merkmalen korrelieren zu können. Letztlich bleibt die visuelle Beurteilung eines histologischen Schnittpräparates der allen weiteren Untersuchungen vorangehende Schritt in der diagnostischen Routine. Auch ist routinemäßige Verfügbarkeit molekularer Analysen nicht an jedem Ort der Welt gegeben. Daher wären morphologische Merkmale, die eindeutig einem bestimmten molekularen Merkmal zuzuordnen wären, von großem Wert.

Eine über die histologischen Typen hinausgehende Assoziation einzelner morphologischer Eigenschaften mit molekularen Charakteristika ergab sich jedoch in unserer Fallserie nicht.

Bezüglich der diskutierten Ätiologie der drei Tumorentitäten legen unsere Analysen nahe, dass es sich um sehr eng verwandte Neoplasien handelt. Vor allem die Ergebnisse der auf DNA-Methylierung basierenden Clusteranalysen zeigen nur ausgesprochen geringe Unterschiede zwischen den Gruppen. In einem breiten Klassifikationsansatz, wie dem Brain Tumor Classifier ist eine Unterscheidung der drei Entitäten anhand der DNA Methylierung daher vermutlich nicht möglich.[85] Dennoch kann die Durchführung einer DNA-Methylierungsanalyse hilfreich sein, beispielsweise zur Differenzierung eines Hinterlappentumors von einem anderen TTF1 positiven Gliom bei kleinen Biopsien, oder zur Bestimmung des chromosomalen Kopiezahlprofils.

Bemerkenswert in den Sequenzierungsanalysen fanden wir das Vorliegen so vieler verschiedener alterierter Gene. Im Gegensatz zu chordoiden Gliomen, die typischerweise eine PRKCA-Mutation aufweisen[101], papillären glioneuronalen Tumoren, die typischerweise eine PRKCA-Fusion aufweisen[102,103], SEGAs, die typischerweise TSC1/2 inaktivierende Mutationen aufweisen[104,105], Gangliogliome und pilozytische Astrozytome, die fast einheitlich BRAF- oder andere MAPK-Veränderungen aufweisen[106–108] zeigen Hypophysenhinterlappentumoren eine erstaunliche Vielfalt an genetischen Veränderungen, darunter ein breites Spektrum an verschiedenen MAPK Treibermutationen (z. B. BRAF, HRAS, MAP2K2, CBL, FGFR1), PI3 Kinase Treibermutation (z. B. PTEN, CBL, FGFR1), Mutationen in epigenetischen Regulatoren (z. B. DNMT3A, EZH2, SMARCB1, EP300, CREBBP, KMT2D), und anderen Genen (TP53, TERT-Promotor, NFE2L2).

#### **4.3 Einbettung der Ergebnisse in den bisherigen Forschungsstand**

Einige Arbeiten haben in Einzelfällen und kleineren Serien von Spindelzellonkozytomen und Pituizytomen das Vorliegen von Mutationen mit unterschiedlichen technischen Ansätzen untersucht.[66,67,67,69,70] Mete et al. konnten 2013 in 14 Hypophysenhinterlappentumoren (7 Spindelzellonkozytome, 4 Pituizytome and 3 Granularzelltumoren) bei einer gezielten Sequenzierung des BRAF Hotspots keine BRAF V600E Mutationen oder KIAA1549/BRAF Fusionen nachweisen [39]. 2016 fanden Miller et al. in 4 whole exome sequenzierten Spindelzellonkozytomen Mutationen in Genen bzw. assoziierten Genen des MAPK Signalweges. Viaene et al. beschrieben 2019 in 2 von 3 sequenzierten Pituizytomen pathogene Mutationen in HRAS sowie in BRAF, NF1 und TSC1. Sie detektierten diese bei einem targeted DNA next generation sequencing von 152 Genen. 2021 berichteten Barresi et al. in ihrer Arbeit unter anderem die Sequenzierung von 409 Genen in 3 Spindelzellonkozytome und 1 Pituizyotom, wobei keine Mutationen identifiziert werden konnten. Wir haben in unserer Arbeit ebenfalls mittels eines targeted DNA next generation sequencing Ansatzes in 17 von 37 Fällen insgesamt 27 wahrscheinlich pathogene Mutationen nachgewiesen. Wir konnten in unserer Arbeit somit untermauern, dass MAPK/PI3K Signalweg Mutationen Phänomene sind, welche in Hypophysenhinterlappentumoren vom Typ Pituizyotom und Spindelzellonkozytom auftreten und eine Vielzahl an Genen dieser Signalwege betroffen sein können. Das Auftreten von Mutationen in epigenetischen Regulator-Genen, wie wir sie in unserer Serie nachweisen konnten, ist unseres Wissens nach für Tumoren des Hypophysenhinterlappens noch nicht beschrieben und unsere Arbeit liefert hierzu erste Daten. In Zusammenschau mit den aufgeführten, bereits publizierten Daten ist davon auszugehen, dass die Analyse des Mutationsstatus in Patient\*innen mit Hypophysenhinterlappentumoren mindestens mittels eines targeted DNA next generation sequencing Ansatz erfolgen sollte, da nur so eine ausreichende Anzahl an verschiedenen Genen abgeklärt werden kann.

Kopiezahlveränderungen wie wir sie vor allem auch in Spindelzellonkozytome unserer Serie beobachtet haben, sind auch von Barresi et al. beschrieben. So wiesen sie u.a. chromosomale Verluste von 1p und Chromosom 13q in 4 untersuchten Fällen nach[67], welche wir auch in einigen Fällen unserer Serie gefunden haben.

Eine Assoziation von Kopiezahlveränderungen mit einem reduziertem progressionsfreien Überleben konnte nun in unserer Arbeit erstmals nachgewiesen werden.

Capper et al. analysierten in ihrer Arbeit von 2018 die Methylierungsprofile von insgesamt 2.801 Tumoren und Geweben des Zentralnervensystems, welche auch 29 Hypophysenhinterlappentumoren einschlossen. Im Rahmen ihrer Entwicklung einer DNA-methylierungsbasierten Klassifikation der ZNS-Tumoren zeigte sich, dass die Methylierungsprofile der Hypophysenhinterlappentumoren eine Unterscheidung in ihre drei histologischen Subtypen nicht ermöglichten. Auch in unserer Arbeit, nach Einschluss weiterer 18 Fälle, zeigen sich weiterhin nur subtile Unterschiede in der DNA-Methylierung von Granularzelltumoren, Pituizytomen und Spindelzellonkozytomen.

#### **4.4 Stärken und Schwächen der Arbeit**

##### **4.4.1 Bias in retrospektiven Fallserien**

Bei unserer Arbeit handelt es sich um eine deskriptive retrospektive Fallserie ohne Durchführung einer spezifischen medizinischen Intervention, also um eine Beobachtungsstudie.[71] In der evidenzbasierten Medizin werden Studientypen anhand der Wahrscheinlichkeit bzw. Anfälligkeit für systemische Verzerrung (Bias o. confounding factors) in verschiedene Evidenzgrade (levels of evidence 1-5) eingeteilt. Da retrospektive Fallserien als allgemein anfällig für Verzerrungen (Bias) gelten, entspricht unsere Arbeit Level 4, also dem vorletzten Evidenzgrad.[109]

Bei der Untersuchung unserer Arbeit auf mögliche Verzerrungen wurde auf eine Vielzahl an bereits bekannten und definierten Biases, die im Catalogue of Biases des Centers for evidence based medicine, University of Oxford, zusammengefasst sind, zurückgegriffen.[109] Der Katalog basiert auf einer Publikation von David Sackett aus dem Jahr 1979 zu dem Thema *Bias in analytic Research*. [110]

Insbesondere unsere statistisch signifikanten Ergebnisse (reduziertes progressionsfreies Überleben bei Vorliegen von Kopiezahlveränderungen) haben wir kritisch hinterfragt. Hier ergaben sich mehrere mögliche Verzerrungsfaktoren. Als wesentlichste Bias konnten hier die uneinheitliche Behandlung (Zustand nach Bestrahlung vs. treatment naïv; sog. co-treatment bias[111]) der Patient\*innen sowie das Vorliegen von Tumormaterial unterschiedlicher Resektionszeitpunkte (Primärtumor vs. Rezidiv) identifiziert werden. Da es uns nicht möglich war, diese Verzerrungsfaktoren rückwirkend vollständig zu eliminieren, haben wir an exemplarischen Fällen ihren möglichen Einfluss auf unsere Resultate untersucht (Abb. 7) und konnten zeigen, dass das Vorliegen von

Kopiezahlveränderungen in diesen Fällen sowohl innerhalb eines Tumors als auch über den Erkrankungsverlauf hinweg weitestgehend stabil waren. Zudem haben wir in Kaplan-Meier-Analysen alle rezidierten Fälle und unklare Fälle sowie Fälle mit Zustand nach Bestrahlung ausgeschlossen. Hier waren die Ergebnisse weiterhin signifikant unterschiedlich zwischen den Gruppen ohne und mit Kopiezahlvariation (Abb. 11a und 11b, entnommen und modifiziert aus Schmid et al., 2021;  $p=0,05$  und  $p=0,02$ ).

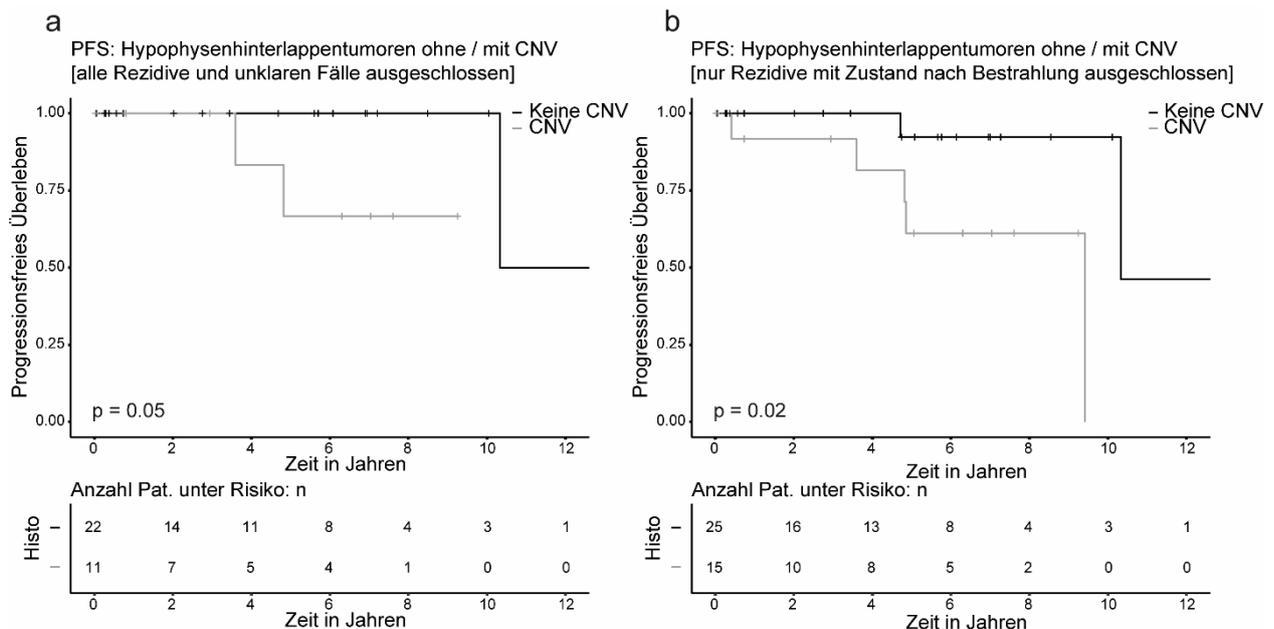


Abbildung 11: Abbildung entnommen und angepasst aus Schmid et al, 2021 (supplementär Material). Kaplan-Meier-Kurven zum progressionsfreien Überleben nach Ausschluss aller Rezidive und unklaren Fälle (a) sowie nach Ausschluss aller Fälle mit Zustand nach Bestrahlung (b).

Des Weiteren könnte in unserem Studientyp ein information bias vorliegen. Ein information bias bezeichnet jeden systemischen Unterschied von der Wahrheit, welcher beim Sammeln, Erinnern, der Aufnahme und Bearbeitung von Informationen in einer Studie auftritt. Hauptformen dieses Bias sind misclassification bias, observer bias, recall bias und reporting bias.[112] Da wir Fälle aus einem langen Zeitraum in unsere Studie eingeschlossen haben, kann es sein, dass die Veränderungen diagnostischer Richtlinien im Laufe der Zeit dazu geführt haben, dass in Einzelfällen nach heutigem diagnostischen Standard nicht der korrekte Tumortyp ermittelt wurde (z.B ein Spindelzellonkozytom, welches aber als Pituizyтом diagnostiziert wurde, weil die Diagnose „Spindelzellonkozytom“ erst später offiziell eingeführt wurde). Auch kann es möglich sein,

dass daher bei der systematischen Suche in Datenbanken aufgrund der Verwendung anderer Diagnosen in der Vergangenheit (z.B. „pilozytisches Astrozytom“ anstatt „Pituizyotom“) Fälle übersehen und nicht miteingeschlossen wurden. Wir haben versucht dem Effekt eines misclassification bias durch Evaluation der Histomorphologie und dem Einbeziehen der DNA-methylierungsbasierten Klassifikation zur Diagnosesicherung entgegenzuwirken. Im Rahmen der internen Datenbankrecherche wurden kombinierte Suchparameter verwendet, wie z.B. „Sella“ und „Hypophysenhinterlappen“ in Kombination mit der Tumordiagnose, um Fälle zu identifizieren, die sich möglicherweise nach Reevaluation doch als Hypophysenhinterlappentumoren herausstellen könnten. Zudem könnten die ungleichen Fallzahlen der histologischen Subtypen bzw. der neuen integrierten histomolekularen Subtypen einen Nachteil bei der Datenanalyse darstellen. Auch dürften die uneinheitlichen Follow-up Zeiten zwischen den unterschiedlichen Gruppen zu einer Verzerrung führen, ein sog. Transfer-Bias.[113] Zudem war es uns nicht möglich den Resektionsgrad des Tumors nach der primären Operation und die initiale Tumorgröße in einer einheitlichen und vergleichbaren Art und Weise zu ermitteln. Hieraus könnte sich eine Verzerrung bei der Betrachtung des progressionsfreien Überlebens ergeben.

#### 4.4.2 Wert von retrospektiven Fallserien

Obgleich retrospektive Fallserien anfällig für Verzerrungen sind, können sie von großer Bedeutung für den wissenschaftlichen Prozess sein. Fallserien oder Berichte können zur Identifizierung von Mustern und Beziehungen führen und Grundlage für die Generierung einer Theorie sein, sie können Anregungen geben bestehende Theorien zu erweitern oder eine Theorie in experimentellen Studien zu überprüfen.[114]

Ein Beispiel kann vielleicht die Entwicklung der Erkenntnisse über die Rolle der MGMT Promotermethylierung in IDH-Wildtyp Glioblastomen geben. Patient\*innen mit Tumoren mit einem erhöhten Methylierungsgrad des MGMT-Promoters sprechen besser auf alkylierenden Chemotherapeutika wie Temozolomid an und haben ein verbessertes Langzeitüberleben.[115] Es handelt sich also um einen prädiktiven Marker, der seit vielen Jahren in der Routinediagnostik angewendet wird. Erste Fallserien, die einen Zusammenhang eines hohen Expressionslevels von MGMT in 167 Gliomen mit einer reduzierten time to treatment failure darstellen und somit einen möglichen prädiktiven Wert in malignen Gliomen nahelegen, finden sich im Jahr 1996.[116] Prospektive Studien,

die den prädiktiven Wert der MGMT-Promoter-Methylierung in malignen Gliomen weiter untermauern, wurden beispielsweise in den Jahren 2000 und 2004 veröffentlicht.[117,118] Die deskriptiven Fallserien gingen also den prospektiven, interventionellen Studien um einige Jahre voraus. Es darf somit davon ausgegangen werden, dass Fallserien Inspiration und Datengrundlage zur Planung und Initialisierung großer randomisierter Studien waren.

Randomisierte kontrollierte Studien (Evidenzgradlevel 1a) gelten als Goldstandard der Studienplanung zum Beleg der Wirksamkeit einer neuen Therapie. Aus diesem Studientyp ergibt sich der höchsten Grad an Übertragbarkeit und klinischen Anwendbarkeit von Studienergebnissen. Allerdings sind sie meist planungs- und kostenintensiver, langwieriger und aufwändiger in der Durchführung. Bei sehr seltenen Krankheiten, wie zum Beispiel den Hypophysenhinterlappentumoren, erscheint die Durchführung von randomisierten kontrollierten Studien zudem sehr schwer umsetzbar. Eine Fallzahlplanung dürfte aufgrund der sehr begrenzten Verfügbarkeit epidemiologischer Daten sowie der geringen Anzahl an veröffentlichten molekularen Daten nur mit Einschränkungen möglich sein. Die Zusammenstellung einer definierten Studienpopulation hinsichtlich demografischer Merkmale, Begleiterkrankungen etc., sowie das Sorgen für Strukturgleichheit in Interventions- und Kontrollgruppe (Geschlecht, Alter, Gewicht) scheint nach aktueller Datenlage nur in einem gemeinsamen Bemühen mehrerer bevölkerungsreicher Länder, möglicherweise sogar einer weltweiten Kooperation über mehrere Jahre, wenn nicht sogar Jahrzehnte hinweg, möglich zu sein.

Kurzfristig sind daher die Erkenntnisse, die durch Fallserien gewonnen werden können, von großer Wichtigkeit, um eine Teilhabe an Fortschritten in Diagnostik und Therapie auch für Patient\*innen mit seltenen Erkrankungen zu ermöglichen.

## **4.5 Implikationen für Praxis und zukünftige Forschung**

### **4.5.1 Veränderungen der Klassifikation und Diagnostik von Hypophysenhinterlappentumoren seit der Einführung der WHO-Klassifikation**

Die Richtlinien der neuropathologischen Diagnostik der Hirntumoren, zu denen auch die Hypophysenhinterlappentumoren gerechnet werden, befinden sich unter der

Schirmherrschaft der Weltgesundheitsorganisation (WHO) und der International Agency for Research on Cancer (IARC) stets im Fluss der Zeit und ihrer neuen wissenschaftlichen Erkenntnisse. So wurden sie über die letzten Jahrzehnte stets verändert und angepasst.[29,32,34,119–121]

Ein Konsens über die Notwendigkeit zur Einführung international gültiger Klassifikationen für Krankheiten wurde von der WHO bereits im Rahmen einer Sitzung von 1952 formuliert.[122] Diskutiert wurde vor allem, wie man eine einheitliche und vergleichbare Morbiditätsstatistik weltweit einführen könne. Im Annex III des zweiten Teils des Reports finden sich unter „*Subcommittee on the Registration of cases of cancer as well as their statistical presentation*“ entsprechende Ausführungen. Bis zur tatsächlichen Einführung der ersten Ausgabe des so genannten „blauen Buches“ sollten noch 27 Jahre vergehen.[119]

In dem ersten „blauen Buch“ von Klaus Zülch (1979) finden Hypophysenhinterlappentumoren noch keine Erwähnung.[119] Auch in der darauffolgenden Edition von 1993 sind diese Läsionen noch nicht enthalten.[120] Erst im Jahr 2000, in der dritten Auflage der WHO-Klassifikation bzw. der „blauen Buch“ Reihe, wird die Diagnose „Granularzelltumor der Neurohypophyse (Synonyme: Pituizyom u.a.)“ eingeführt.[34] Es ist anzunehmen, dass diese Diagnose, gerade durch den synonymen Gebrauch des Begriffes Pituizyom, aus heutiger Sicht uneinheitlich für verschiedene Neoplasien im Bereich des Infundibulums und des Hypophysenhinterlappens verwendet wurde.

Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung der dritten Auflage der ZNS WHO-Klassifikation (2000) waren noch keine genetischen Daten der Hypophysenhinterlappentumoren publiziert. Die Diagnose stützte sich auf Histomorphologie, Immunhistochemie und ggfs. Elektronenmikroskopie.[34] In der WHO Klassifikation für Tumoren des Zentralnervensystems von 2007 (Vierte Auflage der ZNS WHO) werden die Diagnosen Pituizyom und Spindelzellonkozytom der Adenohypophyse erstmals als eigenständige Entitäten eingeführt.[123] Genetische Daten waren für diese Entitäten auch zum Zeitpunkt der Veröffentlichung der vierten Auflage nicht vorhanden. In der WHO-Klassifikation für Tumoren des Zentralnervensystems 2016 (revidierte vierte Auflage) erweitert sich die Definition aller 3 Neoplasien erstmals. Eingeführt wurde die immunhistochemische nukleäre Expression von TTF1 als diagnostisches Kriterium und als gemeinsames Merkmal dieser Entitäten. Erstmals wird auch diskutiert, dass es sich um Varianten einer einzigen nosologischen Entität handeln könnte. Diesen neuen

Überlegungen folgend entfällt in der Diagnose „Spindelzellonkozytom der Adenohypophyse“ in der 2016er Auflage der Zusatz „der Adenohypophyse“.[29] Es gab erste Serien (14 Fälle), die begannen diese Entitäten strukturiert vergleichend zu untersuchen.[39] Beispielsweise wurden hier einzelne Fälle mit chromosomalen Aberrationen berichtet. Für viele andere Tumorklassen wurden in der überarbeiteten vierten Auflage von 2016 schon grundlegende Änderungen in der Nomenklatur bzw. den diagnostischen Kriterien eingeführt. Erstmals wurden molekulare Marker definierender Bestandteil von mehreren Tumorklassen.

Diese intensivere molekulare Ausrichtung der WHO Klassifikation wird in der neuesten, fünften Auflage von 2021 fortgesetzt. Hier wird der rasante Erkenntniszuwachs durch ausgedehnte molekulare Analysen und daraus folgend die Zunahme der Bedeutsamkeit der Integration molekularer Techniken in die alltägliche Tumordiagnostik deutlich. Es werden in dieser neuen Auflage 22 neue (davon 3 provisorische) Entitäten, die molekular definiert sind und innerhalb der letzten 5 Jahre identifiziert wurden, eingeführt.[124] Die Einführung einer integrierten histomolekularen Diagnose beim Gebrauch der neuen 5. Auflage der ZNS-WHO-Klassifikation wird nun für zahlreiche Entitäten zwingend erforderlich.[125] Auch hier ergeben sich keine wesentlichen Änderungen im Unterkapitel der Hypophysenhinterlappentumoren.

Es ist somit nicht von der Hand zu weisen, dass sich die Durchführung unserer Arbeit in einen gewissen Zeitgeist einfügt. Darüber hinaus besteht allerdings auch ein eindeutiger Bedarf molekulare Daten zu dieser seltenen Tumorgruppe zu generieren. Wir gehen davon aus, dass die histomolekulare Klassifikation, die wir auf der Grundlage unserer Daten für die Hypophysenhinterlappentumoren vorschlagen, hilfreich in der individuellen Therapieplanung von Patient\*innen sein kann.

#### 4.5.2 Konsequenzen für die Routinediagnostik

Die Konsequenzen einer Integration molekularer Analysen in die Routinediagnostik von Tumorerkrankungen sind für die Patient\*innen oft ein Zugewinn an diagnostischer Sicherheit und durch Identifikation von prognostischen und/oder prädiktiven molekularen Faktoren ergibt sich gegebenenfalls die Chance auf eine verbesserte Therapieplanung und ggfs. eine individuelle, zielgerichtete Behandlung ihrer Tumorerkrankung.[126,127]

Unsere Daten legen nahe, dass auch Patient\*innen mit Hypophysenhinterlappentumoren von der Durchführung molekularer Analysen profitieren können (Kopiezahlveränderungen zur Prognoseabschätzung; Mutationen im Falle individueller Therapieansätze).

Die Kosten der hierfür notwendigen molekularen Analysen sind meist höher als für eine rein auf histochemischen und immunhistochemischen Färbungen basierende Diagnostik. Ihre Integration in routinediagnostische Abläufe, wie sie für einen Teil der Tumorerkrankungen des ZNS nun auf der Grundlage der 5. Auflage der ZNS WHO-Klassifikation notwendig werden wird, kann somit eine erhebliche finanzielle Belastung des Etats der anfordernden Abteilungen von Krankenhäusern darstellen und Neuplanungen und Anpassungen bei der Vergabe und Kalkulation finanzieller Ressourcen notwendig machen.

#### 4.5.3 Wie wird dies finanziert?

In Deutschland wird das DRG Prinzip zur Abrechnung von Leistungen im Gesundheitssystem angewendet. Hierbei handelt sich um ein im Jahr 2003 in Deutschland eingeführtes, pauschaliertes Abrechnungsverfahren, wonach Patient\*innen in Diagnose-Fallgruppen (disease related groups) anhand sog. Leistungsbezeichnern eingeordnet werden. Diese Leistungsbezeichner sind Haupt- und Nebendiagnosen (kodiert nach ICD, International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems), Prozedurencodes (kodiert nach OPS, Operationen- und Prozedurenschlüssel) und demographische Variablen.

Im Fall der molekularen Analysen ist insbesondere der Operationen- und Prozedurenschlüssel (OPS) von Interesse. Dieser wird jedes Jahr neu vom Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) im Auftrag des Gesundheitsministeriums herausgegeben.[128] Der OPS ist eine an die Erfordernisse des deutschen Gesundheitssystems angepasste und erweiterte Fassung der International Classification of Procedures in Medicine (ICPM) der Weltgesundheitsorganisation (WHO) aus dem Jahr 1978.[129]

Die Pauschalierung jeder DRG Fallgruppe basiert auf den Ziffern, die regelmäßig in der Diagnostik abgerechnet werden. Werden neue Analysen oder Untersuchungen über

einen entsprechend langen Zeitraum hinweg für ein bestimmtes DRG immer wieder abgerechnet, kann ggfs. erwogen werden die Pauschalierung der DRG Gruppe anzuheben. Der OPS und ICD-10-GM werden gepflegt und jährlich in einem Vorschlagsverfahren angepasst und erweitert.[128]

Die Einzelgen-DNA-Methylierungsanalyse wird erstmals konkret in der OPS-Version 2021 im Kapitel I „Diagnostische Maßnahmen“, in der Untersektion (1-90...1-99) Andere diagnostische Maßnahmen in der Untergruppe 1-99 „Andere diagnostische Maßnahmen“, unter Ziffer 1-995.2 *Untersuchung auf abnorme DNA-Methylierungsmuster; Inkl.:Methylierung eines CpG (z.B. MLH1-Promoter/Enhancer)*.[130,131] In der OPS-Version von 2020 und 2019 ist die DNA-Methylierungsanalyse als Leistungsziffer noch nicht enthalten.[132,133]

Seit 2022 besteht nun erstmals auch die Möglichkeit die arraybasierte DNA-Methylierungsanalyse innerhalb des OPS zu kodieren. Diese findet sich als Ziffer 1-997 *DNA-methylierungsspezifische Hochdurchsatzverfahren (Array- oder NGS-basiert) zur Analyse epigenetischer Veränderungen bei/in soliden bösartigen Neubildungen*.[130]

#### 4.5.4 Werden wir in Zukunft NGS und weitere molekulare Analysen von jedem Hypophysenhinterlappentumor durchführen?

Die Kosten einer NGS-Analyse und/oder einer DNA-Methylierungsanalyse sind nicht unerheblich. Im Fall der Hypophysenhinterlappentumoren, Tumoren, die insgesamt zumeist einen langsam progredienten Verlauf aufweisen und allgemein als benigne eingestuft werden, wäre ggfs. vor der Durchführung entsprechender Analysen für jeden Fall individuell abzuwägen, inwiefern die Analyseergebnisse für die weitere Therapieplanung des/der Patient\*innen eine Rolle spielen. Zu bedenken wäre jedoch auch, dass aufgrund der ausgesprochenen Seltenheit dieser Tumoren jeder auftretende Fall vom wissenschaftlichen Standpunkt aus als wertvoll anzusehen ist und eine genaue molekulare Abklärung den Erkenntnisstand vorantreibt und im Einzelfall überhaupt erst in Betracht kommende alternative Therapieansätze wie z.B. eine Inhibition des MAPK Signalweges, ermöglicht.

#### 4.5.5 Zukünftige Forschung

Unsere Daten lassen darüber spekulieren, dass es ein noch größeres Spektrum an Hypophysenhinterlappen geben könnte. Eine kleine Gruppe an Hypophysenhinterlappentumoren in unserer Serie grenzte sich durch das Vorhandensein von epigenetischen Regulatormutationen, einer hohen Anzahl an Kopiezahlveränderungen und durch Unterschiede ihrer DNA-Methylierungsprofile im hierarchischen Clustering von den übrigen Fällen ab (Abb.5; Gruppe „CNV-high“). Hier haben wir spekuliert, ob es sich um eine kleine Gruppe noch seltenerer Tumoren handeln könnte. Als weiterer Hinweis auf eine sich im Laufe der Zeit erweiternde Spektrum ergibt sich aus den kürzlich beschriebenen primären papillären epithelialen Tumoren der Sella Region.[134] In der Literatur finden sich einzelne Fallberichte über diese mögliche neue Tumorgruppe. Abbildung 12a zeigt exemplarisch die Histologie eines Falles, der dieser Diagnose entsprechen dürfte. Die Morphologie erinnert stark an ein Plexuspapillom, allerdings zeigt sich eine nukleäre Expression von TTF1 in einigen Tumorzellen sowie eine kräftige Expression von Zytokeratinen (Abb.12b und 12c). Der höchste Score in der DNA-methylierungsbasierten Klassifikation ergibt sich für die Klasse Pituitary / Granularzelltumor / Spindelzellonkozytom (Abb. 12 d). Auch in einem Clustering mit mehreren weiteren Tumorentitäten, u.a. auch Plexuspapillomen gruppierte sich der Fall eindeutig zu den Hypophysenhinterlappentumoren (Abb. 12e). Weitere Studien müssen zeigen, wie sich das Mutationsprofil und der klinische Verlauf dieser sehr seltenen Tumoren darstellt.

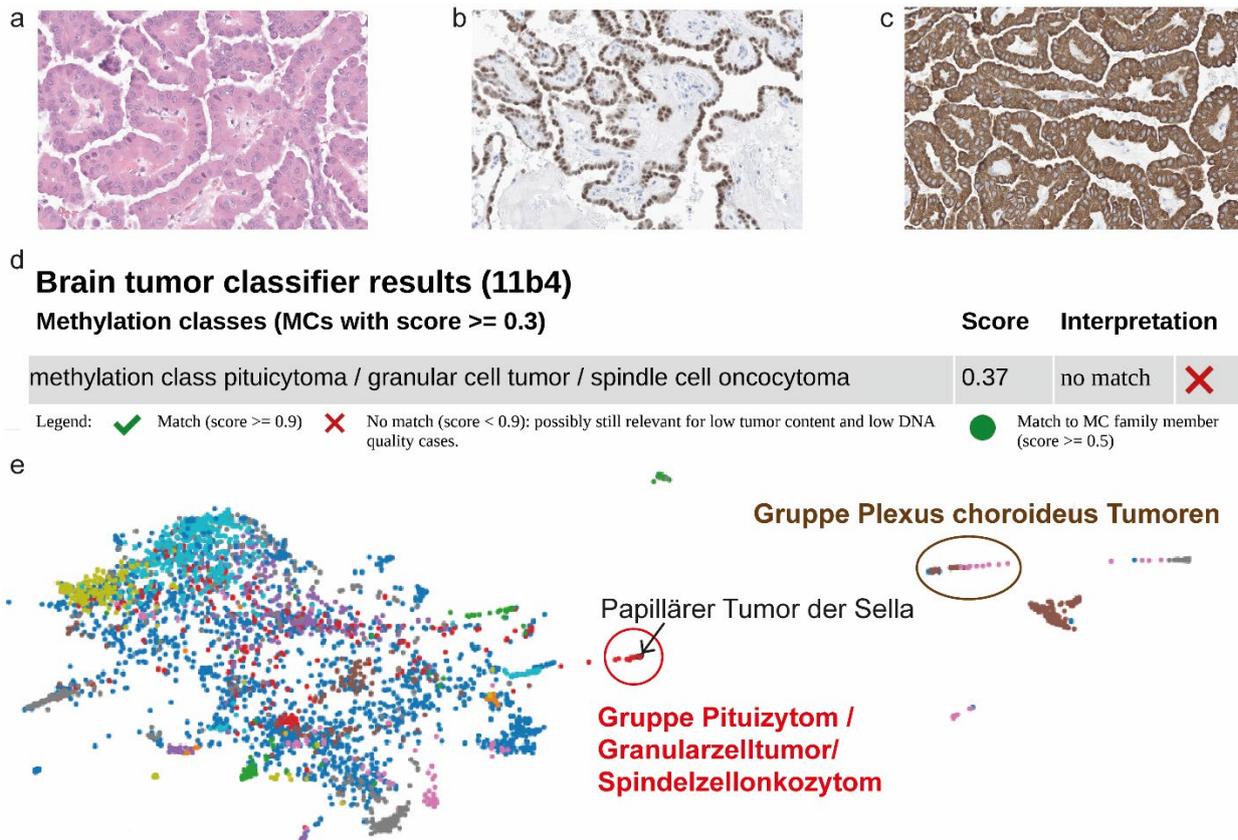


Abbildung 12: Primärer papillärer epithelialer Tumor der Sella (eigene Darstellung). Papilläre Morphologie des Tumors in der HE Färbung, 400x (a). In zahlreichen Tumorzellen zeigt sich eine nukleäre Expression von TTF1, im vorliegenden Beispiel mit geringer zytoplasmatischer Hintergrundfärbung, 400x (b). Zudem sind die Tumorzellen mit Zytokeratinen kräftig anfärbbar, 400x (c). Der höchste Score im Brain tumor classifier (v11b4) ergab sich für die Klasse Pituizytom/ Granularzelltumor/Spindelzellonkozytom (d). Zudem erfolgte ein Abgleich der Methylierungsdaten mit zahlreichen anderen Neoplasien (u.a. Neoplasien der Schilddrüse, Lungenkarzinome, Plexustumoren) in einem experimentellen UMAP Plot der EpiDip Plattform der Universität Basel; Prof. Dr. med. Jürgen Hench. Auch hier ordnete sich der Fall den Hypophysenhinterlappentumoren zu (e).

Des Weiteren ließ sich in unseren intensiven molekularen Analysen keine genetische Treibermutation für die Gruppe der Granularzelltumoren identifizieren. Hier könnten kommende Arbeiten noch intensivere Ansätze, wie z.B. whole genome sequencing einsetzen, um möglicherweise Alterationen in nicht kodierenden DNA-Bereichen oder in Genen, die in einem targeted sequencing Ansatz nicht repräsentiert sind nachzuweisen. Auch wären diese Tumoren interessante Kandidaten für weiterführende Analysen im Bereich von möglicherweise pathogenen DNA-Methylierungsmustern.

Künftige Studien könnten zudem untersuchen, ob Hypophysenhinterlappentumoren mit nachgewiesenen MAPK/PI3K-Signalweg-Alterationen von adjuvanten Therapien, wie beispielsweise einer Bestrahlung und/oder einer zielgerichteten Inhibition der MAPK Signalweges, profitieren können. Wie oben allerdings bereits ausgeführt, dürfte jedoch der Aufbau „großer“ randomisierter Fallkollektive bei dieser ausgesprochen seltenen Entität langwierig und die Auswertung der Daten am Ende möglicherweise schwierig sein.

## 5 Schlussfolgerungen

Aus unseren Daten lassen sich mehrere praktische Konsequenzen ableiten:

Erstens: die DNA-Methylierungsunterschiede zwischen den Hypophysenhinterlappentumoren sind sehr subtil, was darauf hindeutet, dass diese Tumoren am besten als Subtypen/Varianten eines einzigen Tumor Typs zu betrachten sind. DNA-Methylierungsprofile sind möglicherweise nicht geeignet für die routinemäßige Identifizierung dieser Subtypen/Varianten.

Zweitens: Die Abklärung von Kopiezahlveränderungen kann für die Identifizierung von Tumoren mit kürzerer Zeit bis zum Wiederauftreten hilfreich sein. Dies kann bei der Erstdiagnose von Wert sein, um Fälle zu identifizieren, die eine engmaschigere Nachsorge benötigen. In künftigen Studien könnte geprüft werden, ob diese Patient\*innen auch von einer adjuvanten Therapie (z. B. Bestrahlung) profitieren.

Drittens: Ein erheblicher Anteil der Hypophysenhinterlappentumoren weisen potenziell angreifbare MAPK/PI3K-Veränderungen auf. Eine Reihe von Genen innerhalb der MAPK/PI3K-Signalwege können betroffen sein, und diagnostische Tests sollten dies berücksichtigen. Spindelzellonkozytom- und Pituzytom-Subtypen sind besonders anfällig für diese Veränderungen und sollten zumindest bei einem Wiederauftreten oder wenn zusätzliche therapeutische Optionen erforderlich sind (z. B. residualer nicht resektabler Tumor) auf ihr Vorliegen untersucht werden.

Viertens: Wir schlagen eine Neuklassifizierung von Hypophysenhinterlappentumoren in drei klinisch relevante neue Subtypen vor. Eine Gruppe repräsentiert Granularzelltumore, wie sie bisher beschrieben wurden. Die beiden anderen Gruppen sind eine Mischung aus Spindelzellonkozytomen und Pituzytomen, werden aber durch das Vorhandensein oder Fehlen von chromosomalen Kopiezahlveränderungen in prognostische Gruppen

eingeteilt. Wir glauben, dass dies zu einer besser reproduzierbaren und klinisch relevanteren Untergruppierung führt.

## Literaturverzeichnis

1. Guerrero-Perez F, Marengo AP, Vidal N, Iglesias P, Villabona C. Primary tumors of the posterior pituitary: A systematic review. *Rev Endocr Metab Disord*. Juni 2019;20(2):219–38.
2. Takuma N, Sheng HZ, Furuta Y, Ward JM, Sharma K, Hogan BL, Pfaff SL, Westphal H, Kimura S, Mahon KA. Formation of Rathke's pouch requires dual induction from the diencephalon. *Development*. Dezember 1998;125(23):4835–40.
3. M T, As G, Sm O, Dp S, Ja M, Ap M, Mg R. Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev* [Internet]. 6. Januar 1998 [zitiert 4. Januar 2022];12(11). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9620855/>
4. Bucy PC. The pars nervosa of the bovine hypophysis. *J Comp Neurol*. August 1930;50(2):505–19.
5. Suess U, Pliska V. Identification of the pituicytes as astroglial cells by indirect immunofluorescence-staining for the glial fibrillary acidic protein. *Brain Res*. 21. September 1981;221(1):27–33.
6. Maurer S, Lewis D. THE STRUCTURE AND DIFFERENTIATION OF THE SPECIFIC CELLULAR ELEMENTS OF THE PARS INTERMEDIA OF THE HYPOPHYSIS OF THE DOMESTIC PIG. *J Exp Med*. 30. Juni 1922;36(1):141–56.
7. Herring PT. The Histological Appearances of the Mammalian Pituitary Body. *Q J Exp Physiol*. 1908;1(2):121–59.
8. Herring PT. A contribution to the comparative physiology of the pituitary body. 1908.
9. Lederis K. A Preliminary Report on the Ultrastructure of the Human Neurohypophysis. *J Endocrinol*. Oktober 1963;27:133–5.
10. Bergland RM, Torack RM. Microtubules and neurofilaments in axons of the human pituitary stalk. *Exp Cell Res*. Januar 1969;54(1):132–4.
11. Bergland RM, Torack RM. An electron microscopic study of the human infundibulum. *Z Zellforsch Mikrosk Anat Vienna Austria* 1948. 1969;99(1):1–12.
12. Seyama S, Pearl GS, Takei Y. Ultrastructural study of the human neurohypophysis. I. Neurosecretory axons and their dilatations in the pars nervosa. *Cell Tissue Res*. 1980;205(2):253–71.

13. Takei Y, Seyama S, Pearl GS, Tindall GT. Ultrastructural study of the human neurohypophysis. II. Cellular elements of neural parenchyma, the pituicytes. *Cell Tissue Res.* 1980;205(2):273–87.
14. Seyama S, Pearl GS, Takei Y. Ultrastructural study of the human neurohypophysis. III. Vascular and perivascular structures. *Cell Tissue Res.* 1980;206(2):291–302.
15. Scheithauer BW, Horvath E, Kovacs K. Ultrastructure of the neurohypophysis. *Microsc Res Tech.* 15. Januar 1992;20(2):177–86.
16. Hild W. Histological and endocrinological observations in tissue cultures of posterior pituitary of dog and rat. *Tex Rep Biol Med.* 1954;12(3):474–88.
17. Kohn A. Über das Pigment in der Neurohypophyse des Menschen. *Arch Für Mikrosk Anat.* 1. März 1910;75(2):337–74.
18. Krsulovic J, Bruckner G. Morphological characteristics of pituicytes in different functional stages. Light- and electronmicroscopy of the neurohypophysis of the albino rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1969;99(2):210–20.
19. RAVIOLA E, RAVIOLA G. HISTOCHEMISTRY OF RAT NEUROHYPOPHYSEAL PITUICYTE LIPID GRANULES: AUTOXIDATION OF UNSATURATED FATS DURING FIXATION. *J Histochem Cytochem.* 1. März 1963;11(2):176–87.
20. Dellmann HD, Owsley PA. Investigations on the hypothalamo-neurohypophysial neurosecretory system of the grass frog (*Rana pipiens*) after transection of the proximal neurohypophysis. II. Light- and electron microscopic findings in the disconnected distal neurohypophysis with special emphasis on the pituicytes. *Z Zellforsch Mikrosk Anat Vienna Austria* 1948. 1969;94(3):325–36.
21. Sterba G, Brückner G. [Electron microscopical investigation on the reaction of the pituicytes after stalk section in *Rana esculenta*]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat Vienna Austria* 1948. 1969;93(1):74–83.
22. Gersh I. "Glandular" Cells in the Pars Nervosa and Stalk of the Hypophysis. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1. November 1937;37(2):395–6.
23. Griffiths M. Relation between the Secretory Cells of the Pars Nervosa of the Hypophysis and Classical Neuroglia. *Nature.* Juni 1939;143(3632):984–5.
24. Zimmerman EA, Robinson AG. Hypothalamic neurons secreting vasopressin and neurophysin. *Kidney Int.* Juli 1976;10(1):12–24.
25. Brownstein MJ, Russell JT, Gainer H. Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones. *Science.* 25. Januar 1980;207(4429):373–8.
26. *The Neurohypophysis: Structure, Function and Control.* Elsevier; 2011. 563 S.
27. Palay SL, Wissig SL. Secretory granules and Nissl substance in fresh supraoptic neurones of the rabbit. *Anat Rec.* Juli 1953;116(3):301–13.

28. Horvath E, Kovacs K. Folliculo-stellate cells of the human pituitary: a type of adult stem cell? *Ultrastruct Pathol.* August 2002;26(4):219–28.
29. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Weltgesundheitsorganisation, International Agency for Research on C. WHO classification of tumours of the central nervous system. 2016.
30. Roxburgh R, Collis AJ. Notes on a Case of Acromegaly. *Br Med J.* 11. Juli 1896;2(1854):63–5.
31. Ewing J. *Neoplastic diseases; a treatise on tumors*, by James Ewing [Internet]. Pennsylvania: WBSaunders; 1928 [zitiert 19. Januar 2022]. Verfügbar unter: <https://hdl.handle.net/2027/uiug.30112068750303>
32. Louis D, Ohgaki H, Wiestler O, Cavenee W. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. 4th edn. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2007.
33. Brat DJ, Scheithauer BW, Staugaitis SM, Holtzman RN, Morgello S, Burger PC. Pituicytoma: a distinctive low-grade glioma of the neurohypophysis. *Am J Surg Pathol.* März 2000;24(3):362–8.
34. Kleihues P, Cavenee W. *Pathology and Genetics. Tumours of the Nervous System.* Lyon: IARC Press; 2000.
35. Goodman AL, Velazquez Vega JE, Rey Martinez LC, Brat DJ, Schniederjan MJ. Epithelioid Pituicytoma: Expanding the Morphologic Spectrum of a Rare Neoplasm. *J Neuropathol Exp Neurol.* 4. Dezember 2020;79(12):1376–8.
36. Vellutini EAS, Becker PHP, Godoy LF, Guerreiro NFC, Mattedi RL, de de Oliveira MF. Epithelioid pituicytoma: An unusual case report. *Surg Neurol Int.* 2018;9:145.
37. Roncaroli F, Scheithauer BW, Cenacchi G, Horvath E, Kovacs K, Lloyd RV, Abell-Aleff P, Santi M, Yates AJ. „Spindle cell oncocytoma“ of the adenohypophysis: a tumor of folliculostellate cells? *Am J Surg Pathol.* August 2002;26(8):1048–55.
38. Romero-Rojas AE, Melo-Urbe MA, Barajas-Solano PA, Chinchilla-Olaya SI, Escobar LI, Hernandez-Walteros DM. Spindle cell oncocytoma of the adenohypophysis. *Brain Tumor Pathol.* Oktober 2011;28(4):359–64.
39. Mete O, Lopes MB, Asa SL. Spindle cell oncocytomas and granular cell tumors of the pituitary are variants of pituicytoma. *Am J Surg Pathol.* November 2013;37(11):1694–9.
40. Guerrero-Perez F, Vidal N, Marengo AP, Pozo CD, Blanco C, Rivero-Celada D, Diez JJ, Iglesias P, Pico A, Villabona C. Posterior pituitary tumours: the spectrum of a unique entity. A clinical and histological study of a large case series. *Endocrine.* Januar 2019;63(1):36–43.
41. Wang J, Liu Z, Du J, Cui Y, Fang J, Xu L, Li G. The clinicopathological features of pituicytoma and the differential diagnosis of sellar glioma. *Neuropathology.* 2016;36(5):432–40.

42. Hagel C, Buslei R, Buchfelder M, Fahlbusch R, Bergmann M, Giese A, Flitsch J, Lüdecke DK, Glatzel M, Saeger W. Immunoprofiling of glial tumours of the neurohypophysis suggests a common pituicytic origin of neoplastic cells. *Pituitary*. April 2017;20(2):211–7.
43. Ulrich J, Landolt A, Benini A. [Granular-cell tumor of the third ventricle of the brain. Clinical findings, light and electron microscopy]. *Acta Neuropathol (Berl)*. 26. März 1974;27(3):215–23.
44. Sobel HJ, Marquet E, Avrin E, Schwarz R. Granular cell myoblastoma. An electron microscopic and cytochemical study illustrating the genesis of granules and aging of myoblastoma cells. *Am J Pathol*. Oktober 1971;65(1):59–78.
45. Boyce R, Beadles CF. A further contribution to the study of the pathology of the hypophysis cerebri. *J Pathol Bacteriol*. 1893;1(3):359–83.
46. Almaghrabi M, Almaghrabi H, Al-Maghrabi H. Granular Cell Tumor of Thyroid: Challenging Pitfalls and Mimickers in Diagnosis. *J Microsc Ultrastruct*. März 2020;8(1):1–6.
47. Davis R, Deak K, Glass CH. Pulmonary Granular Cell Tumors: A Study of 4 Cases Including a Malignant Phenotype. *Am J Surg Pathol*. Oktober 2019;43(10):1397–402.
48. Meani F, Di Lascio S, Wandschneider W, Montagna G, Vitale V, Zehbe S, Harder Y, Parvex SL, Spina P, Canonica C, Generali D, Pagani O. Granular cell tumor of the breast: a multidisciplinary challenge. *Crit Rev Oncol Hematol*. Dezember 2019;144:102828.
49. Said Ahmad H, Mahamid M, Jawabreh Q, Khoury T, Mari A. Granular Cell Tumor of the Colon: An Exceptionally Rare Finding. *Isr Med Assoc J*. Februar 2020;22(2):125–6.
50. Chow LTC, Chow M. Intraneural granular cell tumor: Histologic spectrum and histogenetic implication. *J Cutan Pathol*. Januar 2020;47(1):57–60.
51. Cohen JN, Yeh I, Jordan RC, Wolsky RJ, Horvai AE, McCalmont TH, LeBoit PE. Cutaneous Non-Neural Granular Cell Tumors Harbor Recurrent ALK Gene Fusions. *Am J Surg Pathol*. September 2018;42(9):1133–42.
52. Viores SA. Demonstration of glial fibrillary acidic (GFA) protein by electron immunocytochemistry in the granular cells of a choristoma of the neurohypophysis. *Histochemistry*. 1991;96(3):265–9.
53. Rickert CH, Paulus W. Genetic characterisation of granular cell tumours. *Acta Neuropathol*. April 2002;103(4):309–12.
54. Stahlman MT, Gray ME, Whitsett JA. Expression of thyroid transcription factor-1(TTF-1) in fetal and neonatal human lung. *J Histochem Cytochem*. Juli 1996;44(7):673–8.

55. Lazzaro D, Price M, de Felice M, Di Lauro R. The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development*. 1991;113(4):1093–104.
56. Fabbro D, Di Loreto C, Stamerra O, Beltrami CA, Lonigro R, Damante G. TTF-1 gene expression in human lung tumours. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. März 1996;32A(3):512–7.
57. Fabbro D, Loreto CD, Beltrami CA, Belfiore A, Lauro RD, Damante G. Expression of Thyroid-specific Transcription Factors TTF-1 and PAX-8 in Human Thyroid Neoplasms. *Cancer Res*. 1. September 1994;54(17):4744–9.
58. Harlamert HA, Mira J, Bejarano PA, Baughman RP, Miller MA, Whitsett JA, Yassin R. Thyroid Transcription Factor-1 and Cytokeratins 7 and 20 in Pulmonary and Breast Carcinoma. *Acta Cytol*. 1998;42(6):1382–8.
59. Nakamura K, Kimura S, Yamazaki M, Kawaguchi A, Inoue K, Sakai T. Immunohistochemical analyses of thyroid-specific enhancer-binding protein in the fetal and adult rat hypothalami and pituitary glands. *Dev Brain Res*. 24. Oktober 2001;130(2):159–66.
60. Lee EB, Tihan T, Scheithauer BW, Zhang PJ, Gonatas NK. Thyroid transcription factor 1 expression in sellar tumors: a histogenetic marker? *J Neuropathol Exp Neurol*. Mai 2009;68(5):482–8.
61. Cenacchi G, Giovenali P, Castrioto C, Giangaspero F. Pituicytoma: ultrastructural evidence of a possible origin from folliculo-stellate cells of the adenohypophysis. *Ultrastruct Pathol*. August 2001;25(4):309–12.
62. Zamecnik J, Chanova M, Kodet R. Expression of thyroid transcription factor 1 in primary brain tumours. *J Clin Pathol*. Oktober 2004;57(10):1111–3.
63. Hang JF, Hsu CY, Lin SC, Wu CC, Lee HJ, Ho DM. Thyroid transcription factor-1 distinguishes subependymal giant cell astrocytoma from its mimics and supports its cell origin from the progenitor cells in the medial ganglionic eminence. *Mod Pathol*. März 2017;30(3):318–28.
64. El Hussein S, Vincentelli C. Pituicytoma: Review of commonalities and distinguishing features among TTF-1 positive tumors of the central nervous system. *Ann Diagn Pathol*. August 2017;29:57–61.
65. Hewer E, Beck J, Kellner-Weldon F, Vajtai I. Suprasellar chordoid neoplasm with expression of thyroid transcription factor 1: evidence that chordoid glioma of the third ventricle and pituicytoma may form part of a spectrum of lineage-related tumors of the basal forebrain. *Hum Pathol*. Juli 2015;46(7):1045–9.
66. Viaene AN, Lee EB, Rosenbaum JN, Nasrallah IM, Nasrallah MP. Histologic, immunohistochemical, and molecular features of pituicytomas and atypical pituicytomas. *Acta Neuropathol Commun*. 2. Mai 2019;7(1):69.
67. Barresi V, Simbolo M, Gessi M, Rossi S, Caffo M, Eccher A, Angileri FF, Cannavò S, Brunelli M, Scarpa A. Clinical-Pathological, Immunohistochemical, and Genetic

- Characterization of a Series of Posterior Pituitary Tumors. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1. Januar 2021;80(1):45–51.
68. Sollfrank L, Lettmaier S, Erdmann M, Uslu U. Panniculitis Under Successful Targeted Inhibition of the MAPK/ERK Signaling Pathway in a Patient With BRAF V600E-mutated Spindle Cell Oncocytoma of the Pituitary Gland. *Anticancer Res.* Juli 2019;39(7):3955–9.
69. Dawoud FM, Naylor RM, Giannini C, Swanson AA, Meyer FB, Uhm JH. TTF-1 positive posterior pituitary tumor: Limitations of current treatment and potential new hope in BRAF V600E mutation variants. *Clin Neurol Neurosurg.* September 2020;196:106059.
70. Miller MB, Bi WL, Ramkissoon LA, Kang YJ, Abedalthagafi M, Knoff DS, Agarwalla PK, Wen PY, Reardon DA, Alexander BM, Laws ER, Dunn IF, Beroukhim R, Ligon KL, Ramkissoon SH. MAPK activation and HRAS mutation identified in pituitary spindle cell oncocytoma. *Oncotarget.* 14. Juni 2016;7(24):37054–63.
71. Schmid S, Solomon DA, Perez E, Thieme A, Kleinschmidt-DeMasters BK, Giannini C, Reinhardt A, Asa SL, Mete O, Stichel D, Siewert C, Dittmayer C, Hasselblatt M, Paulus W, Nagel C, Harter PN, Schittenhelm J, Honegger J, Rushing E, Coras R, Pfister SM, Buslei R, Koch A, Perry A, Jones DTW, von Deimling A, Capper D, Lopes MB. Genetic and epigenetic characterization of posterior pituitary tumors. *Acta Neuropathol (Berl).* Dezember 2021;142(6):1025–43.
72. Hotchkiss RD. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J Biol Chem.* August 1948;175(1):315–32.
73. Johnson TB, Coghill RD. RESEARCHES ON PYRIMIDINES. C111. THE DISCOVERY OF 5-METHYL-CYTOSINE IN TUBERCULINIC ACID, THE NUCLEIC ACID OF THE TUBERCLE BACILLUS1. *J Am Chem Soc.* 1. November 1925;47(11):2838–44.
74. Riggs AD. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Genome Res.* 1975;14(1):9–25.
75. Razin A, Riggs AD. DNA Methylation and Gene Function. *Science [Internet].* 7. November 1980 [zitiert 16. Januar 2022]; Verfügbar unter: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.6254144>
76. Van der Auwera I, Bovie C, Svensson C, Trinh XB, Limame R, van Dam P, van Laere SJ, van Marck EA, Dirix LY, Vermeulen PB. Quantitative methylation profiling in tumor and matched morphologically normal tissues from breast cancer patients. *BMC Cancer.* 12. März 2010;10:97.
77. Bihl MP, Foerster A, Lugli A, Zlobec I. Characterization of CDKN2A(p16) methylation and impact in colorectal cancer: systematic analysis using pyrosequencing. *J Transl Med.* 27. August 2012;10:173.
78. Zhang X, Ma Y, Wu Y, Lin L, Ma X, Zhang Y. Aberrant promoter methylation and silencing of RASSF2A gene in cervical cancer. *J Obstet Gynaecol Res.* 2014;40(5):1375–81.

79. Bibikova M, Le J, Barnes B, Saedinia-Melnyk S, Zhou L, Shen R, Gunderson KL. Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium® assay. *Epigenomics*. 1. Oktober 2009;1(1):177–200.
80. Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, Delano D, Zhang L, Schroth GP, Gunderson KL, Fan JB, Shen R. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*. 1. Oktober 2011;98(4):288–95.
81. Pidsley R, Zotenko E, Peters TJ, Lawrence MG, Risbridger GP, Molloy P, Van Dijk S, Muhlhausler B, Stirzaker C, Clark SJ. Critical evaluation of the Illumina MethylationEPIC BeadChip microarray for whole-genome DNA methylation profiling. *Genome Biol*. 7. Oktober 2016;17:208.
82. Chen Y, Breeze CE, Zhen S, Beck S, Teschendorff AE. Tissue-independent and tissue-specific patterns of DNA methylation alteration in cancer. *Epigenetics Chromatin*. 2016;9:10.
83. Pajtler KW, Witt H, Sill M, Jones DT, Hovestadt V, Kratochwil F, Wani K, Tatevossian R, Punchihewa C, Johann P, Reimand J, Warnatz HJ, Ryzhova M, Mack S, Ramaswamy V, Capper D, Schweizer L, Sieber L, Wittmann A, Huang Z, van Sluis P, Volckmann R, Koster J, Versteeg R, Fults D, Toledano H, Avigad S, Hoffman LM, Donson AM, Foreman N, Hewer E, Zitterbart K, Gilbert M, Armstrong TS, Gupta N, Allen JC, Karajannis MA, Zagzag D, Hasselblatt M, Kulozik AE, Witt O, Collins VP, von Hoff K, Rutkowski S, Pietsch T, Bader G, Yaspo ML, von Deimling A, Lichter P, Taylor MD, Gilbertson R, Ellison DW, Aldape K, Korshunov A, Kool M, Pfister SM. Molecular Classification of Ependymal Tumors across All CNS Compartments, Histopathological Grades, and Age Groups. *Cancer Cell*. 11. Mai 2015;27(5):728–43.
84. Sturm D, Orr BA, Toprak UH, Hovestadt V, Jones DTW, Capper D, Sill M, Buchhalter I, Northcott PA, Leis I, Ryzhova M, Koelsche C, Pfaff E, Allen SJ, Balasubramanian G, Worst BC, Pajtler KW, Brabetz S, Johann PD, Sahm F, Reimand J, Mackay A, Carvalho DM, Remke M, Phillips JJ, Perry A, Cowdrey C, Drissi R, Fouladi M, Giangaspero F, Lastowska M, Grajkowska W, Scheurlen W, Pietsch T, Hagel C, Gojo J, Lotsch D, Berger W, Slavc I, Haberler C, Jouvet A, Holm S, Hofer S, Prinz M, Keohane C, Fried I, Mawrin C, Scheie D, Mobley BC, Schniederjan MJ, Santi M, Buccoliero AM, Dahiya S, Kramm CM, von Bueren AO, von Hoff K, Rutkowski S, Herold-Mende C, Fruhwald MC, Milde T, Hasselblatt M, Wesseling P, Rossler J, Schuller U, Ebinger M, Schittenhelm J, Frank S, Grobholz R, Vajtai I, Hans V, Schneppenheim R, Zitterbart K, Collins VP, Aronica E, Varlet P, Puget S, Dufour C, Grill J, Figarella-Branger D, Wolter M, Schuhmann MU, Shalaby T, Grotzer M, van Meter T, Monoranu CM, Felsberg J, Reifenberger G, Snuderl M, Forrester LA, Koster J, Versteeg R, Volckmann R, van Sluis P, Wolf S, Mikkelsen T, Gajjar A, Aldape K, Moore AS, Taylor MD, Jones C, Jabado N, Karajannis MA, Eils R, Schlesner M, Lichter P, von Deimling A, Pfister SM, Ellison DW, Korshunov A, Kool M. New Brain Tumor Entities Emerge from Molecular Classification of CNS-PNETs. *Cell*. 25. Februar 2016;164(5):1060–72.
85. Capper D, Jones DTW, Sill M, Hovestadt V, Schrimpf D, Sturm D, Koelsche C, Sahm F, Chavez L, Reuss DE, Kratz A, Wefers AK, Huang K, Pajtler KW, Schweizer L, Stichel D, Olar A, Engel NW, Lindenberg K, Harter PN, Braczynski AK, Plate KH,

- Dohmen H, Garvalov BK, Coras R, Holsken A, Hewer E, Bewerunge-Hudler M, Schick M, Fischer R, Beschorner R, Schittenhelm J, Staszewski O, Wani K, Varlet P, Pages M, Temming P, Lohmann D, Selt F, Witt H, Milde T, Witt O, Aronica E, Giangaspero F, Rushing E, Scheurlen W, Geisenberger C, Rodriguez FJ, Becker A, Preusser M, Haberler C, Bjerkvig R, Cryan J, Farrell M, Deckert M, Hench J, Frank S, Serrano J, Kannan K, Tsirigos A, Bruck W, Hofer S, Brehmer S, Seiz-Rosenhagen M, Hanggi D, Hans V, Rozsnoki S, Hansford JR, Kohlhof P, Kristensen BW, Lechner M, Lopes B, Mawrin C, Ketter R, Kulozik A, Khatib Z, Heppner F, Koch A, Jouvet A, Keohane C, Muhleisen H, Mueller W, Pohl U, Prinz M, Benner A, Zapatka M, Gottardo NG, Driever PH, Kramm CM, Muller HL, Rutkowski S, von Hoff K, Fruhwald MC, Gnekow A, Fleischhack G, Tippelt S, Calaminus G, Monoranu CM, Perry A, Jones C, Jacques TS, Radlwimmer B, Gessi M, Pietsch T, Schramm J, Schackert G, Westphal M, Reifenberger G, Wesseling P, Weller M, Collins VP, Blumcke I, Bendszus M, Debus J, Huang A, Jabado N, Northcott PA, Paulus W, Gajjar A, Robinson GW, Taylor MD, Jaunmuktane Z, Ryzhova M, Platten M, Unterberg A, Wick W, Karajannis MA, Mittelbronn M, Acker T, Hartmann C, Aldape K, Schuller U, Buslei R, Lichter P, Kool M, Herold-Mende C, Ellison DW, Hasselblatt M, Snuderl M, Brandner S, Korshunov A, von Deimling A, Pfister SM. DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature*. 22. März 2018;555(7697):469–74.
86. An Integrated Encyclopedia of DNA Elements in the Human Genome. *Nature*. 6. September 2012;489(7414):57–74.
87. Davis CA, Hitz BC, Sloan CA, Chan ET, Davidson JM, Gabdank I, Hilton JA, Jain K, Baymuradov UK, Narayanan AK, Onate KC, Graham K, Miyasato SR, Dreszer TR, Strattan JS, Jolanki O, Tanaka FY, Cherry JM. The Encyclopedia of DNA elements (ENCODE): data portal update. *Nucleic Acids Res*. 4. Januar 2018;46(Database issue):D794–801.
88. Lizio M, Abugessaisa I, Noguchi S, Kondo A, Hasegawa A, Hon CC, de Hoon M, Severin J, Oki S, Hayashizaki Y, Carninci P, Kasukawa T, Kawaji H. Update of the FANTOM web resource: expansion to provide additional transcriptome atlases. *Nucleic Acids Res*. 8. Januar 2019;47(D1):D752–8.
89. Lizio M, Harshbarger J, Shimoji H, Severin J, Kasukawa T, Sahin S, Abugessaisa I, Fukuda S, Hori F, Ishikawa-Kato S, Mungall CJ, Arner E, Baillie JK, Bertin N, Bono H, de Hoon M, Diehl AD, Dimont E, Freeman TC, Fujieda K, Hide W, Kaliyaperumal R, Katayama T, Lassmann T, Meehan TF, Nishikata K, Ono H, Rehli M, Sandelin A, Schultes EA, 't Hoen PA, Tatum Z, Thompson M, Toyoda T, Wright DW, Daub CO, Itoh M, Carninci P, Hayashizaki Y, Forrest AR, Kawaji H, the FANTOM consortium. Gateways to the FANTOM5 promoter level mammalian expression atlas. *Genome Biol*. 5. Januar 2015;16(1):22.
90. Grigg G, Clark S. Genes and genomes: Sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA. *BioEssays*. 1994;16(6):431–6.
91. Gu Z. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*. 2016;

92. Malika Charrad, Nadia Ghazzali, Veronique Boiteau, Azam Niknafs. An R Package for Determining the Relevant Number of Clusters in a Data Set. *J Stat Softw.* 2014;61(6):1–36.
93. L. J.P. van der Maaten GEH. Visualizing High-Dimensional Data Using t-SNE. *J Mach Learn Res.* 2008;9:2579–605.
94. L. J.P. van der Maaten. Accelerating t-SNE using Tree-Based Algorithms. *J Mach Learn Res.* 2014;15:3221–45.
95. Hovestadt V ZM. conumee: Enhanced copy-number variation analysis using Illumina DNA methylation arrays. 2017;
96. Maksimovic J, Phipson B, Oshlack A. A cross-package Bioconductor workflow for analysing methylation array data. *F1000Res.* 2016;5:1281.
97. Peters TJ, Buckley MJ, Statham AL, Pidsley R, Samaras K, V. Lord R, Clark SJ, Molloy PL. De novo identification of differentially methylated regions in the human genome. *Epigenetics Chromatin.* 2015;8:6.
98. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 20. April 2015;43(7):e47.
99. Kline CN, Joseph NM, Grenert JP, van Ziffle J, Talevich E, Onodera C, Aboian M, Cha S, Raleigh DR, Braunstein S, Torkildson J, Samuel D, Bloomer M, Campomanes AGA, Banerjee A, Butowski N, Raffel C, Tihan T, Bollen AW, Phillips JJ, Korn WM, Yeh I, Bastian BC, Gupta N, Mueller S, Perry A, Nicolaides T, Solomon DA. Targeted next-generation sequencing of pediatric neuro-oncology patients improves diagnosis, identifies pathogenic germline mutations, and directs targeted therapy. *Neuro Oncol.* 1. Mai 2017;19(5):699–709.
100. Kassambara A, Kosinski M, Biecek P. survminer: Drawing Survival Curves using „ggplot2“ [Internet]. 2021. Verfügbar unter: <https://CRAN.R-project.org/package=survminer>
101. Goode B, Mondal G, Hyun M, Ruiz DG, Lin YH, Van Ziffle J, Joseph NM, Onodera C, Talevich E, Grenert JP, Hewedi IH, Snuderl M, Brat DJ, Kleinschmidt-DeMasters BK, Rodriguez FJ, Louis DN, Yong WH, Lopes MB, Rosenblum MK, Butowski N, Tihan T, Bollen AW, Phillips JJ, Wiita AP, Yeh I, Jacobson MP, Bastian BC, Perry A, Solomon DA. A recurrent kinase domain mutation in PRKCA defines chordoid glioma of the third ventricle. *Nat Commun.* 23. Februar 2018;9(1):810.
102. Bridge JA, Liu XQ, Sumegi J, Nelson M, Reyes C, Bruch LA, Rosenblum M, Puccioni MJ, Bowdino BS, McComb RD. Identification of a novel, recurrent SLC44A1-PRKCA fusion in papillary glioneuronal tumor. *Brain Pathol.* März 2013;23(2):121–8.
103. Hou Y, Pinheiro J, Sahm F, Reuss DE, Schrimpf D, Stichel D, Casalini B, Koelsche C, Sievers P, Wefers AK, Reinhardt A, Ebrahimi A, Fernandez-Klett F, Pusch S, Meier J, Schweizer L, Paulus W, Prinz M, Hartmann C, Plate KH, Reifenberger G, Pietsch T, Varlet P, Pages M, Schuller U, Scheie D, de Stricker K, Frank S, Hench

- J, Pollo B, Brandner S, Unterberg A, Pfister SM, Jones DTW, Korshunov A, Wick W, Capper D, Blumcke I, von Deimling A, Bertero L. Papillary glioneuronal tumor (PGNT) exhibits a characteristic methylation profile and fusions involving PRKCA. *Acta Neuropathol.* Mai 2019;137(5):837–46.
104. Chan JA, Zhang H, Roberts PS, Jozwiak S, Wieslawa G, Lewin-Kowalik J, Kotulska K, Kwiatkowski DJ. Pathogenesis of tuberous sclerosis subependymal giant cell astrocytomas: biallelic inactivation of TSC1 or TSC2 leads to mTOR activation. *J Neuropathol Exp Neurol.* Dezember 2004;63(12):1236–42.
105. Bongaarts A, Giannikou K, Reinten RJ, Anink JJ, Mills JD, Jansen FE, Spliet GMW, den Dunnen WFA, Coras R, Blumcke I, Paulus W, Scholl T, Feucht M, Kotulska K, Jozwiak S, Buccoliero AM, Caporalini C, Giordano F, Genitori L, Soylemezoglu F, Pimentel J, Nellist M, Schouten-van Meeteren AYN, Nag A, Muhlebner A, Kwiatkowski DJ, Aronica E. Subependymal giant cell astrocytomas in Tuberous Sclerosis Complex have consistent TSC1/TSC2 biallelic inactivation, and no BRAF mutations. *Oncotarget.* 10. November 2017;8(56):95516–29.
106. Jones DT, Kocialkowski S, Liu L, Pearson DM, Backlund LM, Ichimura K, Collins VP. Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer Res.* 1. November 2008;68(21):8673–7.
107. Pfister S, Janzarik WG, Remke M, Ernst A, Werft W, Becker N, Toedt G, Wittmann A, Kratz C, Olbrich H, Ahmadi R, Thieme B, Joos S, Radlwimmer B, Kulozik A, Pietsch T, Herold-Mende C, Gnekow A, Reifenberger G, Korshunov A, Scheurlen W, Omran H, Lichter P. BRAF gene duplication constitutes a mechanism of MAPK pathway activation in low-grade astrocytomas. *J Clin Invest.* Mai 2008;118(5):1739–49.
108. Schindler G, Capper D, Meyer J, Janzarik W, Omran H, Herold-Mende C, Schmieder K, Wesseling P, Mawrin C, Hasselblatt M, Louis DN, Korshunov A, Pfister S, Hartmann C, Paulus W, Reifenberger G, von Deimling A. Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol.* März 2011;121(3):397–405.
109. Oxford Centre for Evidence-Based Medicine: Levels of Evidence (March 2009) — Centre for Evidence-Based Medicine (CEBM), University of Oxford [Internet]. [zitiert 9. Januar 2022]. Verfügbar unter: <https://www.cebm.ox.ac.uk/resources/levels-of-evidence/oxford-centre-for-evidence-based-medicine-levels-of-evidence-march-2009>
110. Sackett DL. Bias in analytic research. *J Chronic Dis.* 1979;32(1–2):51–63.
111. Leopold SS. Editorial: Let's Talk About Level IV: The Bones of a Good Retrospective Case Series. *Clin Orthop.* Februar 2013;471(2):353–4.
112. Catalogue of Bias [Internet]. Catalog of Bias. 2017 [zitiert 6. Februar 2022]. Verfügbar unter: <https://catalogofbias.org/>
113. Pannucci CJ, Wilkins EG. Identifying and Avoiding Bias in Research. *Plast Reconstr Surg.* August 2010;126(2):619–25.

114. Ridder HG. The theory contribution of case study research designs. *Bus Res.* 1. Oktober 2017;10(2):281–305.
115. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JEC, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 10. März 2005;352(10):997–1003.
116. Belanich M, Pastor M, Randall T, Guerra D, Kibitel J, Alas L, Li B, Citron M, Wasserman P, White A, Eyre H, Jaeckle K, Schulman S, Rector D, Prados M, Coons S, Shapiro W, Yarosh D. Retrospective study of the correlation between the DNA repair protein alkyltransferase and survival of brain tumor patients treated with carmustine. *Cancer Res.* 15. Februar 1996;56(4):783–8.
117. Hegi ME, Diserens AC, Godard S, Dietrich PY, Regli L, Ostermann S, Otten P, Van Melle G, de Tribolet N, Stupp R. Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15. März 2004;10(6):1871–4.
118. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med.* 9. November 2000;343(19):1350–4.
119. Zülch K. *Histological Typing of Tumours of the Central Nervous System.* Geneva: World Health Organization; 1979.
120. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. *Histological Typing of Tumours of the Central Nervous System.* 2nd Edition. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest: Springer-Verlag; 1993.
121. WHO Classification of Tumours Editorial Board. *Central Nervous System Tumours.* Bd. Fifth Edition. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2021.
122. WHO Expert Committee on Health Statistics, Organization WH. *Expert Committee on Health Statistics: third report [of a meeting held in Geneva from 21 to 26 November 1951] [Internet].* World Health Organization; 1952 [zitiert 16. Januar 2022]. Verfügbar unter: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/40190>
123. Scheithauer BW. Development of the WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Historical Perspective. *Brain Pathol.* 2. September 2008;19(4):551–64.
124. Deng MY, Sill M, Sturm D, Stichel D, Witt H, Ecker J, Wittmann A, Schittenhelm J, Ebinger M, Schuhmann MU, Figarella-Branger D, Aronica E, Staszewski O, Preusser M, Haberler C, Lauten M, Schuller U, Hartmann C, Snuderl M, Dunham C, Jabado N, Wesseling P, Deckert M, Keyvani K, Gottardo N, Giangaspero F, von Hoff K, Ellison DW, Pietsch T, Herold-Mende C, Milde T, Witt O, Kool M, Korshunov A, Wick W, von Deimling A, Pfister SM, Jones DTW, Sahm F. Diffuse glioneuronal tumour with oligodendroglioma-like features and nuclear clusters (DGONC) - a

- molecularly defined glioneuronal CNS tumour class displaying recurrent monosomy 14. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 23. Dezember 2019;
125. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, Hawkins C, Ng HK, Pfister SM, Reifenberger G, Soffietti R, von Deimling A, Ellison DW. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncol.* 1. August 2021;23(8):1231–51.
126. Weller M, van den Bent M, Preusser M, Le Rhun E, Tonn JC, Minniti G, Bendszus M, Balana C, Chinot O, Dirven L, French P, Hegi ME, Jakola AS, Platten M, Roth P, Rudà R, Short S, Smits M, Taphoorn MJB, von Deimling A, Westphal M, Soffietti R, Reifenberger G, Wick W. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat Rev Clin Oncol.* März 2021;18(3):170–86.
127. Nobre L, Zapotocky M, Ramaswamy V, Ryall S, Bennett J, Alderete D, Balaguer Guill J, Baroni L, Bartels U, Bavle A, Bornhorst M, Boue DR, Canete A, Chintagumpala M, Coven SL, Cruz O, Dahiya S, Dirks P, Dunkel IJ, Eisenstat D, Faure Conter C, Finch E, Finlay JL, Frappaz D, Garre ML, Gauvain K, Bechensteen AG, Hansford JR, Harting I, Hauser P, Hazrati LN, Huang A, Injac SG, Iurilli V, Karajannis M, Kaur G, Kyncl M, Krskova L, Laperriere N, Larouche V, Lassaletta A, Leary S, Lin F, Mascelli S, McKeown T, Milde T, Morales La Madrid A, Morana G, Morse H, Mushtaq N, Osorio DS, Packer R, Pavelka Z, Quiroga-Cantero E, Rutka J, Sabel M, Salgado D, Solano P, Sterba J, Su J, Sumerauer D, Taylor MD, Toledano H, Tsang DS, Valente Fernandes M, van Landeghem F, van Tilburg CM, Wilson B, Witt O, Zamecnik J, Bouffet E, Hawkins C, Tabori U. Outcomes of BRAF V600E Pediatric Gliomas Treated With Targeted BRAF Inhibition. *JCO Precis Oncol.* 2020;4:PO.19.00298.
128. OPS [Internet]. [zitiert 15. Januar 2022]. Verfügbar unter: <https://www.dimdi.de/dynamic/de/klassifikationen/ops/>
129. World Health Organization. International classification of procedures in medicine [Internet]. World Health Organization; 1978 [zitiert 6. Februar 2022]. Verfügbar unter: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/40527>
130. BfArM - OPS Version 2022 [Internet]. [zitiert 15. Januar 2022]. Verfügbar unter: <https://www.dimdi.de/static/de/klassifikationen/ops/kode-suche/opshtml2022/>
131. BfArM - OPS Version 2021 [Internet]. [zitiert 15. Januar 2022]. Verfügbar unter: <https://www.dimdi.de/static/de/klassifikationen/ops/kode-suche/opshtml2021/block-1-90...1-99.htm>
132. DIMDI - OPS Version 2019 [Internet]. [zitiert 15. Januar 2022]. Verfügbar unter: <https://www.dimdi.de/static/de/klassifikationen/ops/kode-suche/opshtml2019/block-1-90...1-99.htm#code1-99>
133. DIMDI - OPS Version 2020 [Internet]. [zitiert 17. Januar 2022]. Verfügbar unter: <https://www.dimdi.de/static/de/klassifikationen/ops/kode-suche/opshtml2020/block-1-90...1-99.htm#code1-99>
134. Roncaroli F, Chatterjee D, Giannini C, Pereira M, La Rosa S, Brouland JP, Gnanalingham K, Galli C, Fernandes B, Lania A, Radotra B. Primary papillary

epithelial tumour of the sella: expanding the spectrum of TTF-1-positive sellar lesions. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2020;46(5):493–505.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Simone Schmid, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Molekulare Analyse der primären Neoplasien des Hypophysenhinterlappens; Molecular analysis of the primary neoplasms of the posterior pituitary lobe, selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

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

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

Datum 16.03.2022

Unterschrift

## Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Simone Schmid hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: [Autoren], [Titel], [Zeitschrift], [Erscheinungsjahr]

Schmid S, Solomon DA, Perez E, Thieme A, Kleinschmidt-DeMasters BK, Giannini C, Reinhardt A, Asa SL, Mete O, Stichel D, Siewert C, Dittmayer C, Hasselblatt M, Paulus W, Nagel C, Harter PN, Schittenhelm J, Honegger J, Rushing E, Coras R, Pfister SM, Buslei R, Koch A, Perry A, Jones DTW, von Deimling A, Capper D, Lopes MB.

Genetic and epigenetic characterization of posterior pituitary tumors.

Acta Neuropathol.

2021 Dec;142(6):1025-1043. doi: 10.1007/s00401-021-02377-1. Epub 2021 Oct 18.

PMID: 34661724; PMCID: PMC8568760.

Beiträge im Einzelnen:

- Verwalten des Probenmaterials (z.B. FFPE Blöcke, Gewebeschnitte)
- Anlage und verwalten der Probandaten und der molekularen Ergebnisse in einer Datenbank
- Anfordern von DNA-Methylierungsanalysen
- Bewerten der Qualität der DNA-Methylierungsanalysen
- Durchführen der bioinformatischen Auswertung der Methylierungsdaten:
  - Durchführung des unsupervidierten Clusterings
  - Durchführen der tSNE Analysen
  - Berechnung der Copy Number Plots
  - Berechnung der Summary Copy Number Plots
- Mikroskopieren der HE Schnitte und identifizieren und gradieren histologischer Features der 47 Tumoren
- Erheben/Verwalten der klinischen Daten
- Durchführen der Überlebenszeitanalysen
- Auswerten der histologischen Analysen
- Auswerten der DNA-Methylierungsanalysen
- Integration der extern durchgeführten targeted DNA next generation sequencing Ergebnisse
- Schreiben des Manuskript - Entwurfes
- Auf den Daten basierende von mir erstellte Abbildungen/Tabellen:
  - alle Abbildungen (Abbildung 1 - Abbildung 7)
  - Tabelle 1

- supplementäre Abbildung 2, 3, 4, 5, 6
- supplementäre Tabelle 1

---

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2019** Selected Editions:  
 SCIE,SSCI Selected Categories: **"NEUROSCIENCES"** Selected Category  
 Scheme: WoS **Gesamtanzahl: 271 Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE REVIEWS NEUROSCIENCE	42,809	33.654	0.055400
2	NATURE NEUROSCIENCE	62,933	20.071	0.144390
3	BEHAVIORAL AND BRAIN SCIENCES	9,395	17.333	0.008170
4	TRENDS IN COGNITIVE SCIENCES	27,705	15.218	0.036050
5	JOURNAL OF PINEAL RESEARCH	10,537	14.528	0.009430
6	NEURON	95,056	14.415	0.199640
<b>7</b>	<b>ACTA NEUROPATHOLOGICA</b>	<b>21,908</b>	<b>14.251</b>	<b>0.040740</b>
8	TRENDS IN NEUROSCIENCES	20,011	12.891	0.021220
9	Annual Review of Neuroscience	13,215	12.547	0.012740
10	MOLECULAR PSYCHIATRY	22,227	12.384	0.054730
11	Nature Human Behaviour	2,457	12.282	0.014190
12	BIOLOGICAL PSYCHIATRY	44,016	12.095	0.053910
13	BRAIN	53,282	11.337	0.067050
14	SLEEP MEDICINE REVIEWS	8,077	9.613	0.013000
15	Molecular Neurodegeneration	4,933	9.599	0.011840
16	PROGRESS IN NEUROBIOLOGY	12,791	9.371	0.011250
17	FRONTIERS IN NEUROENDOCRINOLOGY	4,491	9.059	0.007050
18	ANNALS OF NEUROLOGY	37,304	9.037	0.044120

## **Druckexemplar/e der ausgewählten Publikation/en**



# Genetic and epigenetic characterization of posterior pituitary tumors

Simone Schmid<sup>1</sup> · David A. Solomon<sup>2</sup> · Eilis Perez<sup>1</sup> · Anne Thieme<sup>1,3</sup> · Bette K. Kleinschmidt-DeMasters<sup>4</sup> · Caterina Giannini<sup>5</sup> · Annekathrin Reinhardt<sup>6,7</sup> · Sylvia L. Asa<sup>8,9</sup> · Ozgur Mete<sup>9</sup> · Damian Stichel<sup>7</sup> · Christin Siewert<sup>3</sup> · Carsten Dittmayer<sup>1</sup> · Martin Hasselblatt<sup>10</sup> · Werner Paulus<sup>10</sup> · Christoph Nagel<sup>11</sup> · Patrick N. Harter<sup>12,13,14,15</sup> · Jens Schittenhelm<sup>16,17</sup> · Jürgen Honegger<sup>18</sup> · Elisabeth Rushing<sup>19</sup> · Roland Coras<sup>20</sup> · Stefan M. Pfister<sup>21,22,23</sup> · Rolf Buslei<sup>24</sup> · Arend Koch<sup>1</sup> · Arie Perry<sup>2</sup> · David T. W. Jones<sup>21,25</sup> · Andreas von Deimling<sup>6,7</sup> · David Capper<sup>1,3</sup> · M. Beatriz Lopes<sup>26</sup>

Received: 24 June 2021 / Revised: 1 October 2021 / Accepted: 4 October 2021 / Published online: 18 October 2021  
© The Author(s) 2021

## Abstract

Pituicytoma (PITUI), granular cell tumor (GCT), and spindle cell oncocytoma (SCO) are rare tumors of the posterior pituitary. Histologically, they may be challenging to distinguish and have been proposed to represent a histological spectrum of a single entity. We performed targeted next-generation sequencing, DNA methylation profiling, and copy number analysis on 47 tumors (14 PITUI; 12 GCT; 21 SCO) to investigate molecular features and explore possibilities of clinically meaningful tumor subclassification. We detected two main epigenomic subgroups by unsupervised clustering of DNA methylation data, though the overall methylation differences were subtle. The largest group ( $n = 23$ ) contained most PITUIs and a subset of SCOs and was enriched for pathogenic mutations within genes in the MAPK/PI3K pathways (12/17 [71%] of sequenced tumors: *FGFR1* (3), *HRAS* (3), *BRAF* (2), *NF1* (2), *CBL* (1), *MAP2K2* (1), *PTEN* (1)) and two with accompanying *TERT* promoter mutation. The second group ( $n = 16$ ) contained most GCTs and a subset of SCOs, all of which mostly lacked identifiable genetic drivers. Outcome analysis demonstrated that the presence of chromosomal imbalances was significantly associated with reduced progression-free survival especially within the combined PITUI and SCO group ( $p = 0.031$ ). In summary, we observed only subtle DNA methylation differences between posterior pituitary tumors, indicating that these tumors may be best classified as subtypes of a single entity. Nevertheless, our data indicate differences in mutation patterns and clinical outcome. For a clinically meaningful subclassification, we propose a combined histo-molecular approach into three subtypes: one subtype is defined by granular cell histology, scarcity of identifiable oncogenic mutations, and favorable outcome. The other two subtypes have either SCO or PITUI histology but are segregated by chromosomal copy number profile into a favorable group (no copy number changes) and a less favorable group (copy number imbalances present). Both of the latter groups have recurrent MAPK/PI3K genetic alterations that represent potential therapeutic targets.

**Keywords** Pituicytoma · Spindle cell oncocytoma · Granular cell tumor · Posterior pituitary gland neoplasms · Molecular neuropathology · Brain tumor

## Introduction

Spindle cell oncocytoma, pituicytoma, and granular cell tumor of the sellar region are rare pituicyte-derived neo-

plasms. They are listed as independent entities in the 2016 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System and are assigned as WHO grade I neoplasms [37] due to their typically low-grade histological appearance, slow growth, and benign clinical course. Epidemiological data are not available for these rare neoplasms. A meta-analysis

---

David Capper and M. Beatriz Lopes shared last authorship.

---

Simone Schmid  
simone.schmid@charite.de

David Capper  
david.capper@charite.de

M. Beatriz Lopes  
msl2e@virginia.edu

Extended author information available on the last page of the article

of literature published in either English or Spanish language reported around 270 examples [19].

Granular cell tumors are typically composed of cells with isomorphic, round to polygonal cell bodies, rather small and often eccentric nuclei, and abundant granular cytoplasm. Pituicytomas most closely resemble the majority of normal pituicytes in the posterior pituitary, which are spindle and elongated cells arranged in fascicles. The morphology of spindle cell oncocytomas is less clearly defined. These tumors vary in appearance and may show, among other patterns, spindle and/or epithelioid cells, with varying oncogenic changes and fascicular growth [37, 38].

All three tumors originate in a very specific and confined region of the CNS, the posterior lobe, and the infundibulum of the pituitary gland, also called the neurohypophysis, which is formed during embryonic development from a protrusion of the developing diencephalon. In early gestation, it colocalizes with the early adenohypophysis, which derives from the oral ectoderm of Rathke's pouch and together they form the pituitary gland in the sella turcica [4, 31, 44, 59].

Due to the variety of cell types found in this small anatomic space, there have been various theories about the cellular origin of spindle cell oncocytomas, pituicytomas, and granular cell tumors of the sella [9, 52, 54]. Currently, it is widely accepted that all three tumors derive from pituicytes, the supportive glial parenchymal cells of the posterior pituitary, which also show a spectrum of morphologies in normal conditions [57, 58]. This is substantiated by the nuclear expression of thyroid transcription factor-1 (TTF-1, encoded by the *NKX2-1* gene) which is a marker expressed in normal pituicytes, spindle cell oncocytomas, pituicytomas, and granular cell tumors of the sella [35, 36, 64]. It has therefore been proposed that these tumor types should be classified as subtypes of a single entity [20, 41]. Interestingly, subependymal giant cell astrocytomas (SEGA), chordoid gliomas of the third ventricle, and hypothalamic gangliocytomas or neurocytomas have also been shown to express TTF-1, and it has been proposed that TTF-1 positive tumors may represent a spectrum of early forebrain derived neoplasms [2, 21–23, 42, 64].

In 2018, it was shown that CNS tumors can be distinguished and reliably classified by genome-wide DNA methylation profiling [7]. In the course of the increased utilization of the DNA methylation-based classifier tool (<https://www.molecularneuropathology.org/mnp>), several new entities have been recognized that typically share group-specific DNA methylation patterns, often in combination with common molecular features, like common gene fusions, mutations, or other genomic variants [14, 46, 56, 61]. The initial classifier cohort also included the profiles of 29 posterior pituitary lobe tumors, with representatives of each of the three histological types [7]. In that initial study, no separation of pituicytoma, granular cell tumor, and spindle cell

oncocytoma was observed and they were therefore assigned to a single DNA methylation class in the brain tumor classifier reference set v11b4 [7].

In this present study, we performed integrated histological and molecular analysis of an extended cohort of a total of 47 posterior pituitary tumors. We here focus on the question of molecular differences between the three histologic types using DNA methylation analysis, copy number analysis, and targeted next-generation sequencing of approximately 500 cancer-associated genes [43, 60]. We further included clinical follow up data to investigate potential associations of histological or molecular features with disease outcome and to develop a meaningful subgrouping of posterior pituitary tumors based on histological and molecular traits.

## Materials and methods

### Tissue samples

Formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumor tissue from 47 neoplasms of the posterior pituitary gland were collected from the pathology archives of neuropathology / pathology departments at the University Hospital Erlangen ( $n = 10$ ), University of Virginia ( $n = 6$ ), Mayo Clinic ( $n = 6$ ), University Hospital Heidelberg and Mannheim ( $n = 6$ ), University of Colorado ( $n = 4$ ), University of California San Francisco ( $n = 4$ ), University Hospital Charité Berlin ( $n = 3$ ), University Hospital Münster ( $n = 2$ ), University Hospital Frankfurt am Main ( $n = 2$ ), University Network Hospital Toronto ( $n = 2$ ), University Hospital Tübingen ( $n = 1$ ), and University Hospital Zürich ( $n = 1$ ). The studied tumors had been resected during the period of 1986–2018 and clinically diagnosed as either pituicytoma ( $n = 14$ ), spindle cell oncocytoma ( $n = 21$ ), or granular cell tumor of the sella ( $n = 12$ ). All cases were collected from centers with extensive experience in pituitary tumor diagnostics, and were well-characterized by immunohistochemistry and/or electron microscopy. Supplementary Table 1 summarizes the external diagnostic data. The original institutional pathologic diagnosis was used for this study (i.e. we did not centrally reclassify tumors). Thirty-four cases were initial tumor resections without prior therapy, four cases were recurrent tumors without prior radiotherapy, four cases were recurrences after radiotherapy, and for five cases the treatment data was not fully retrievable. For three of the recurrent cases (one case after irradiation and two cases without irradiation), DNA methylation analyses were additionally performed on the primary tumor to investigate if the presence of copy number changes was stable over time. The DNA methylation data of twenty-nine tumors was previously published [7]. In addition, methylation data were newly generated and analyzed from non-neoplastic samples of infundibulum ( $n = 7$ ) and

posterior pituitary lobe ( $n = 6$ ). These non-neoplastic tissue samples were from surgical specimens ( $n = 4$ ) or post-mortem autopsy specimens ( $n = 9$ ). Ethical approval was given by the local ethics committee of the Charité (EA2/151/18). For the supplying institutions, usage of material was approved by local Institutional Review Boards.

## Clinical data

Whenever possible the following patient data were provided by the supplying institution: patient sex, age at surgery, initial diagnosis, disease stage (primary lesion, first recurrence, second recurrence), prior therapies (e.g. radiation), and disease course (time to progression on MRI or time to second resection, disease associated death). Second resections represented tumor regrowth and thus true recurrences in all cases. Imaging could not be reviewed in a structured fashion because of the many participating institutions and the changes of imaging techniques within the acquisition period (1986–2018).

## Evaluation of histological features

H&E stained slides were available for evaluation of histological features from 46 of 47 tumors included in this study. For each case, two experienced pathologists (S.S. and D.C.) evaluated and graded a number of morphological features on H&E slides using a multihead microscope. Consensus was reached by discussion using the following scale: feature present in less than 1% of tumor cells (graded as “not present”), in 1–10% of tumor cells (“slight”), in 10–50% (“moderate”) of tumor cells, or in over 50% of tumor cells (“high”). The following features were graded in this way: fascicular growth of spindled cells, lobulated growth, granular cells (not differentiating between oncocyctic and lysosomal granularity), rounded to polygonal cells with distinct cell borders (epithelioid appearance), nuclear pleomorphism, prominent nucleoli, necrosis, and intraparenchymal sclerosis. In addition, we evaluated cell density by counting cells in an area of 1 mm<sup>2</sup>. Lymphocytic infiltrates were assessed by counting blood vessels with lymphocytic cuffs (defined as more than 10 lymphocytes surrounding one vessel) in the whole tissue section and scored as: not present—lymphocytic cuffs around 0 to 1 vessel; low—cuffs around 2 to 5 vessels; moderate—cuffs around 6 to 10 vessels; high—cuffs around more than 10 vessels. Further, mitotic figures were counted in 10 high power fields (HPF) [1 high power field = 0.26 mm<sup>2</sup>] of tumor tissue. Mitotic activity was scored as: not present—0 mitotic figures; low—1 mitotic figure in 10 HPF; moderate—2 mitotic figures in 10 HPF; high—3 or more mitotic figures in HPF.

## Anti-mitochondrial antigen immunohistochemistry

Immunohistochemistry for mitochondrial antigen was performed using antibody clone 113-1 from BioGenex on whole formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections at 1:500 dilution following ER1 antigen retrieval for selected cases. Immunostaining was performed in a Leica BOND-III automated stainer with diaminobenzidine used as the chromogen, followed by hematoxylin counterstain.

## DNA methylation analysis

DNA methylation and copy number analyses were performed using the Infinium Methylation450k and EPIC Bead-Chip array platforms (Illumina, USA). All analyses were performed according to the manufacturer’s instructions. In brief, DNA was extracted from FFPE tumor samples using the Maxwell RSC FFPE Plus DNA Purification Kit (Promega, USA). After bisulfite conversion using the Zymo EZ Methylation Kit (Zymo Research Irvine, USA), the Infinium HD FFPE DNA Restore Kit was used for DNA restoration. The beadchips were scanned on the iScan system (Illumina, USA). The unprocessed output data (.idat files) from the iScan reader were checked for general quality measures as indicated by the manufacturer. DNA methylation based classification was performed for both 450 k and 850 k data using the publically available “brain tumor classifier”, version v11b4 (<https://www.moleculareuropathology.org/mnp>) [7].

## Dimensionality reduction

For DNA methylation data, dimensionality reduction was performed. All analyses were conducted on R version 3.6.1 (2019–07-05) – “Action of the Toes” [49]. Raw summary intensity signals were processed using the R package minfi, version 1.26.2. [1]. rgSets of EPIC array and 450k array data from our tumor set and from the brain tumor classifier reference data set [7] were merged. A combined rgSet in 450k output format was generated using the setof overlap probes on both array types. Functional normalization preprocessing was done for all samples [15]. Quality control and filtering of probes were performed as recommended [40]. The  $m + u$  method implemented in the detectP function of the minfi package compares the total DNA signal (methylated + unmethylated) for each position to the background signal level. The background is estimated using negative control positions, assuming a normal distribution. Only samples with a mean  $p$  value of  $< 0.01$  and only probes with a  $p$  value less than 0.01 in over 90% of the samples were kept for further analysis. Probes on sex chromosomes, probes of CpG sites that include single-nucleotide polymorphisms (SNP), as well as cross reactive probes were excluded [12]. After

filtering and normalization, 415,907 probes remained for further analysis. The variance in the data set was estimated by applying standard deviation over the  $\beta$ -values of all probes of all samples. The 25,000 probes showing the highest variance were kept for dimensionality reduction using the Rtsne package, version: 0.13 [33, 34, 39]. A Pearson distance matrix was used as input object, theta of 0.5, perplexity of 10 and iteration of 1000 were used. Basic plots were generated with the ggplot2 package version: 3.2.1 [62]. Graphs were finalized with Adobe Illustrator CC 2017, version 2017.0.2 (1998–2017 Adobe). The unprocessed.idat files are available from the NCBI Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under study ID GSE185041.

### Unsupervised hierarchical cluster analysis

We performed unsupervised hierarchical clustering analysis for further investigation of variation in our DNA methylation data and to determine the optimal number of clusters. These analyses were done using the R packages base:stats, NbClust (v.3.0) and ComplexHeatmap (v.2.0.0) [11, 18].  $\beta$ -values of the 25,000 most variant CpG probes across all samples were used for analysis. We found Pearson distance measure and complete linkage clustering method yielded optimum results in our dataset, and these were used for further analysis. Further characterization of possible outlier tumors was done using the R function estimateCellCounts() implemented in the R package minfi and with the RFpurity package [28].

### Differentially methylated regions and gene set analysis

Analysis of differentially methylated regions (DMRs) was done using the R packages limma (v.3.46.0) and DMRcate (v.2.4.1) as previously described [40, 47, 51]. Cases from the reference set of the brain tumor classifier (pilocytic astrocytoma, posterior fossa; pilocytic astrocytoma, midline; and pleomorphic xanthoastrocytoma) were included in the analysis [7]. Normalization and filtering of probes were the same as stated above and followed established workflow recommendations [40]. Investigation of DMRs was performed with a cutoff of false discovery rate (FDR) > 0.05 and a mean beta value difference of  $\geq 0.2$  across the CpGs.

Gene set enrichment analysis was performed on the CpG site level comparisons using the R package methylGSA (v.1.8.0) [50]. The function methylRRA() was used to adjust for number of CpGs per each gene. Further annotation of the DMR results was done using the R package clusterProfiler (v3.18.0) and the public databases Ensembl, Reactome and The Gene Ontology (GO) knowledgebase [3, 16, 26, 27, 63].

### Targeted next-generation DNA sequencing analysis

A total of 37 of 47 tumor samples had sufficient material available for targeted DNA sequencing analysis. Capture-based next-generation sequencing was performed using an assay that targets all coding exons of 479 cancer-related genes, select introns and upstream regulatory regions of 47 genes to enable detection of structural variants including gene fusions, and DNA segments at regular intervals along each chromosome to enable genome-wide copy number and zygosity analysis, with a total sequencing footprint of 2.8 Mb (UCSF500 Cancer Panel; Supplementary Table 2) [32]. Multiplex library preparation was performed using the KAPA Hyper Prep Kit (Roche) according to the manufacturer's specifications using 250 ng of sample DNA. Hybrid capture of pooled libraries was performed using a custom oligonucleotide library (Nimblegen SeqCap EZ Choice). Captured libraries were sequenced as paired-end 100 bp reads on an Illumina HiSeq 2500 instrument. Sequence reads were mapped to the reference human genome build GRCh37(hg19) using the Burrows-Wheeler aligner (BWA). Recalibration and deduplication of reads was performed using the Genome Analysis Toolkit (GATK). Single nucleotide variant and insertion/deletion mutation calling was performed with Unified Genotyper, FreeBayes, and PinDel. Structural variant calling was performed with Delly. Variant annotation was performed with Annovar. Single nucleotide variants, insertions/deletions, and structural variants were visualized and verified using Integrative Genomics Viewer. Genome-wide copy number analysis based on on-target and off-target reads was performed by CNVkit and visualized using Nexus Copy Number (Biodiscovery).

All single nucleotide variants and insertions/deletions that were present at less than 0.1% frequency in each of the ExAC, ESP6500, or 1000 genomes human population datasets were filtered for further evaluation and predicted pathogenicity. Each of these filtered variants were reviewed against known cancer genomics data in the COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) and cBioPortal (<http://www.cbioportal.org/>) databases and also assessed where in the protein the mutations are located (i.e. within the active site of the kinase domain), the predicted effect of the variant, the mutant allele frequency, and other variables.

### Analysis of copy number variation

Changes of chromosomal copy number were determined from both methylation array data and the targeted next-generation sequencing data. Calculation of copy number profiles from methylation array data were done using the conumee package, version: 1.18.0 [25]. The evaluation was carried out manually with consideration of the histological tumor cell content for the evaluation of chromosomal gains or losses.

In general, changes were considered potentially relevant if the intensity ratio of a segment deviated from the baseline by more than 0.1 [8]. In addition, we created summary copy number profiles for various groups. This analysis was done using an adaptation of the *cnmme* script (provided by Dr. Damian Stichel, Neuropathology Heidelberg).

## Progression free survival analysis

Outcome data were available for 37 patients. Progression-free survival analysis was performed using the R packages *survival*, package version: 2.44-1.1 and *survminer*, package version: 0.4.6. [30]. We used Kaplan–Meier estimates to investigate differences in progression free survival. Availability of clinical data was limited for a subset of patients. The start point for outcome analysis was the date of the first histological diagnosis of a posterior pituitary tumor. As an “event” for progression analysis, we defined either the performance of a further surgical intervention (using the date of surgery as event date) or if available tumor progression on MRI (using the date of the MRI as event date). Seven patients died during follow up period (four died of unknown reasons, three died of post-surgery complications). Definite tumor-associated death could not be determined for the patients in this series. Median follow up time was 5.1 years (range 11 days to 17 years).

## Results

### Evaluation of histological features

Evaluation of histological features was performed on H&E stained slides which were available for 46 of 47 cases (original institutional diagnosis  $n = 12$  granular cell tumor (Fig. 1a);  $n = 14$  pituicytoma (Fig. 1b);  $n = 21$  spindle cell oncocyoma (Fig. 1c and d)). Several cases exhibited increased cell density (Fig. 1e left), lobulated growth (Fig. 1e right), increased nuclear pleomorphism (Fig. 1f left) or extensive epithelioid cytology (Fig. 1f right). Cytoplasmic granularity was seen in varying degrees in tumors diagnosed as spindle cell oncocyoma (Fig. 1c and d). The graded histological features are listed with clinical and molecular data for individual cases in Fig. 2. As expected from the literature, spindle cell oncocytomas showed a particularly high variability of morphological features. Pituicytomas and spindle cell oncocytomas showed overlapping features in many tumors based on H&E evaluation.

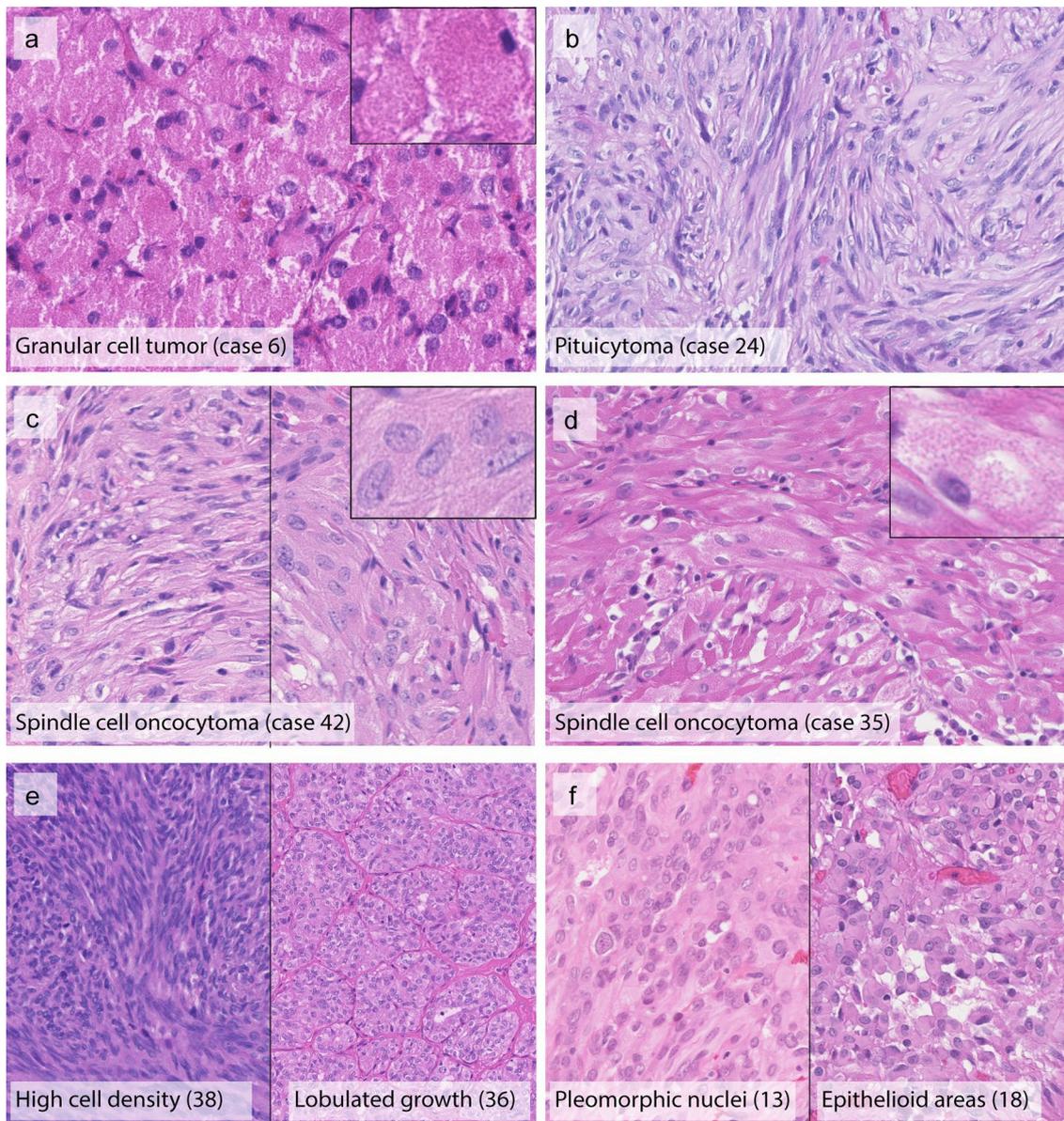
### Molecular evaluation

For the molecular characterization of posterior pituitary tumors, we performed targeted next-generation DNA

sequencing ( $n = 37$ ), genome-wide DNA methylation profiling ( $n = 47$ ), and chromosomal copy number analysis from DNA methylation data ( $n = 47$ ).

### Spindle cell oncocyoma and pituicytoma show recurrent MAPK/PI3K pathway and epigenetic regulator mutations

We performed next-generation sequencing using the UCSF500 Cancer Gene Panel. Sufficient material was available for 37 cases (10 granular cell tumors, 18 spindle cell oncocytomas, 9 pituicytomas). We detected 27 likely pathogenic variants in 17 of the 37 cases (Table 1 and Fig. 2). Fourteen of the variants were in genes within the MAPK and PI3K signaling pathways, and many of these are known cancer driving mutations. Two tumors harbored the activating p.V600E hotspot mutation in *BRAF*, three tumors harbored the activating p.N546K or p.K656E hotspot mutations in *FGFR1*, two tumors harbored activating hotspot mutations at codon p.Q61 in *HRAS*, and another tumor harbored a potentially pathogenic mutation in *HRAS* at p.P169. Two tumors harbored recurrent hotspot missense mutations in the *CBL* oncogene (one of which is a major hotspot in dozens of myeloid neoplasms and other tumor types [p.Y371C], and the other of which is a minor hotspot in a few myeloid neoplasms and other tumors [p.P495Q]), two tumors harbored mutations in the *NFI* tumor suppressor gene (one with two different truncating mutations and the other with a potentially pathogenic missense mutation), and one harbored both a start-loss mutation in the *PTEN* tumor suppressor gene and a missense mutation in the *MAP2K2* oncogene (which encodes MEK2) at a codon recurrently targeted by somatic mutation in melanomas and other tumor types [45]. Seven tumors harbored truncating frameshift, nonsense, or splice site variants or known pathogenic missense mutations in genes involved in epigenetic regulation including histone tail modification (*EP300*, *CREBBP*, *EZH2*, *KMT2D*), chromatin remodeling (*SMARCB1*), or DNA methylation (*DNMT3A*). Two tumors harbored the c.-124C > T hotspot mutation in the promoter region of the *TERT* gene known to activate telomerase gene expression. One tumor harbored a known deleterious missense mutation in the *TP53* tumor suppressor gene, and another tumor harbored a small in-frame deletion in the *NFE2L2* gene (also known as NRF2), which affected a known mutational hotspot in the gene recurrently targeted by missense variants or similar small in-frame indels in squamous cell carcinomas of the lung, esophagus, and oropharynx. We also searched for in-frame fusions involving the genes on the panel with intronic regions tiled for detection of structural rearrangements (e.g. *BRAF*, *RAF1*, *FGFR1-3*, *NTRK1-3*, *MET*, *ALK*, *ROS1*, *MYB*, *MYBL1*, *RELA*), but did not detect any. No focal amplifications or deep deletions were observed in any of the investigated tumors. In 20 of



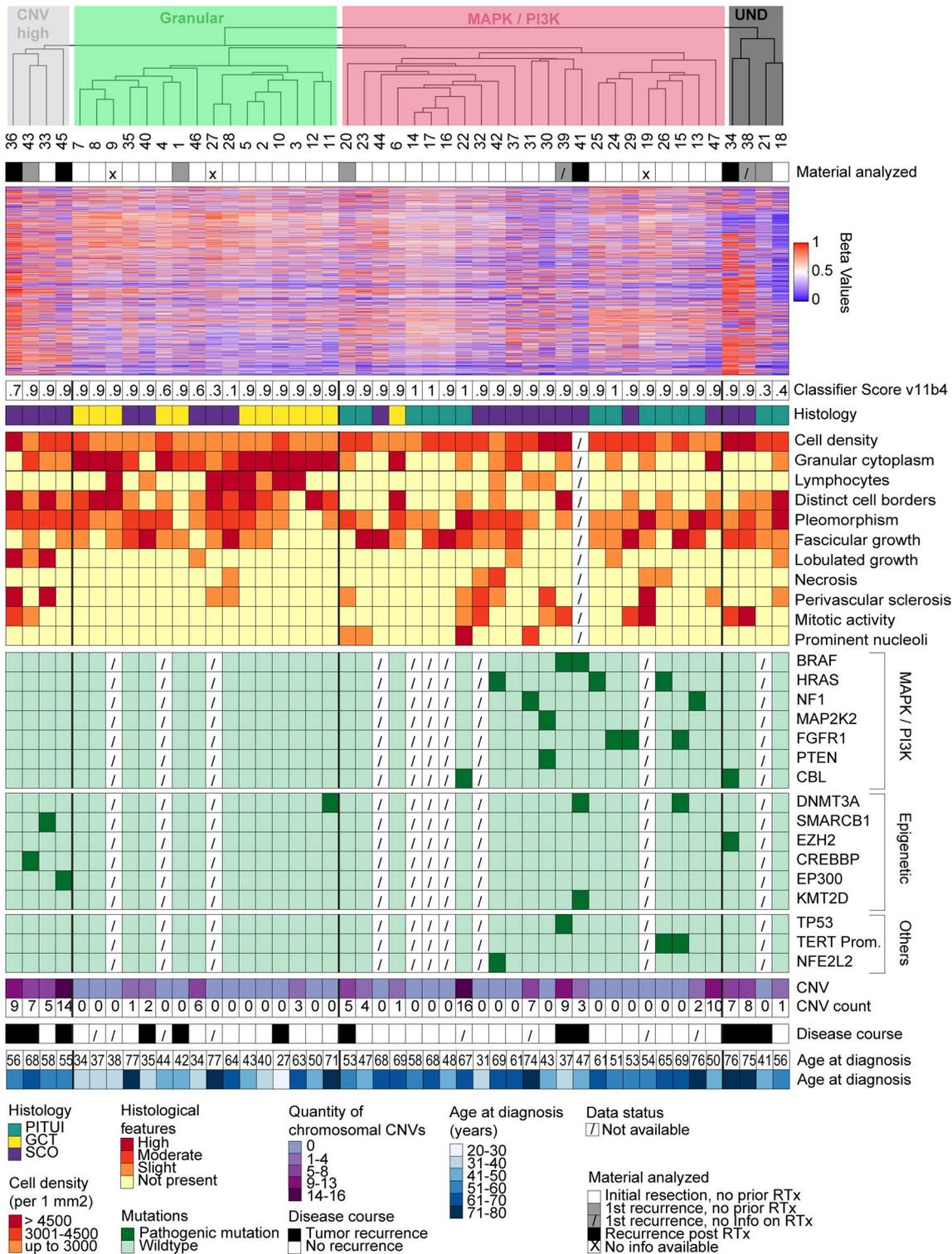
**Fig. 1** Representative hematoxylin and eosin stained images illustrating the histomorphological spectrum of the different posterior pituitary tumor entities. Granular cell tumors typically present with polygonal cells, granular cytoplasm and small eccentric nuclei (a). Pituicytomas typically present with predominantly spindled cells lacking granular or oncocytic changes (b). Spindle cell oncocytomas have more variable histological appearances; prototypical specimens

show storiform or fascicular growth (c). Some degree of granular cytoplasmic changes was observed among spindle cell oncocytomas of this series. Some samples showed only focal granular cytoplasm (c) whereas those changes were prominent in other tumors (d). Some tumors presented with morphological features such as high cell density, lobulated growth pattern (e), pleomorphic nuclei, or epithelioid cytology (f). Original magnification of all images 400 $\times$ , inset 800 $\times$

the tumors, no likely pathogenic variants were identified by the targeted sequencing assay.

Interestingly, the distribution of identified genetic alterations was clearly not random among the different histologic types of posterior pituitary tumors (Fig. 2). Within the 10 sequenced granular cell tumors, we only detected a single case with a driver variant (in the epigenetic regulator *DNMT3A*). In contrast, driver variants were frequently

identified in pituicytomas (10 variants in 9 cases) and spindle cell oncocytomas (14 variants in 18 cases). In the 4 sequenced spindle cell oncocytomas falling in the granular DNA methylation group by clustering, no mutations were observed, comparable to the low frequency of detectable oncogenic alterations in granular cell tumors. Mutations of MAPK/PI3K pathway genes were observed at high rates in both pituicytomas (66%, 6 of 9 cases) and spindle cell



**Fig. 2** Unsupervised hierarchical clustering of DNA methylation data in comparison to clinical and molecular data. The analysis indicates two main methylation groups, one small group, and four undefined cases. The largest group is enriched for spindle cell oncocyomas and pituicytomas and strongly enriched for mutations of the MAPK/PI3K pathway (MAPK/PI3K group, red). The 2nd largest group is enriched for granular cell tumors (Granular group, green). This group shows

a paucity of copy number changes and rare oncogenic mutations. A small group consists of four cases with high numbers of copy number changes and frequent epigenetic regulator mutations (CNV high group, grey). *RTx* radiotherapy, *UND* undefined, *CNV* copy number variation, *PITUI* pituicytoma, *GCT* granular cell tumor, *SCO* spindle cell oncocyoma

**Table 1** Likely pathogenic single nucleotide variants and indels identified in the 37 posterior pituitary tumors analyzed by targeted next-generation DNA sequencing

Histologic type	Case ID	Detected genomic variant	
Granular cell tumor	1	None	
	2	None	
	3	None	
	5	None	
	6	None	
	7	None <sup>#</sup>	
	8	None <sup>#</sup>	
	10	None	
	11	DNMT3A c.2408+2 T>G	
	12	None	
	Pituicytoma	13	NF1 p.S2549*, NF1 p.R997fs
		15	FGFR1 p.N546K, DNMT3A p.P256fs, TERT c.-124C>T
18		None	
20		None	
22		CBL p.Y371C	
23		None	
24		FGFR1 p.N546K	
25		HRAS p.Q61R	
26		HRAS p.Q61K, TERT c.-124C>T	
Spindle cell oncocytoma		29	FGFR1 p.K656E
		30	MAP2K2 p.F57I, PTEN p.0?
		31	NF1 p.H389Y
	33	SMARCB1 p.A163fs	
	34	CBL p.P495Q, EZH2 p.Y646N	
	36	None	
	37	None	
	38	None	
	39	BRAF p.V600E, TP53 p.V218E	
	41	BRAF p.V600E, DNMT3A p.P904L, KMT2D p.V1674fs	
	42	<i>HRAS p.P169L</i> , NFE2L2 p.78_79del	
	43	CREBBP p.S318_V319delins*	
45	EP300 p.M136fs		
47	None		
35 <sup>x</sup>	None		
40 <sup>x</sup>	None		
46 <sup>x</sup>	None		
28 <sup>x</sup>	None		

Potentially pathogenic variants are written in italics

<sup>#</sup>Low sequencing coverage was obtained for these samples that may have impeded the ability to detect pathogenic mutations in genes targeted for sequencing

<sup>x</sup>SCOs clustering with granular DNA methylation group

oncocytomas (38%, 7 of 18 cases), but were not observed in any of the granular cell tumors. Epigenetic regulator mutations were observed in all histologic types but were enriched in spindle cell oncocytomas (spindle cell oncocytoma: 6 variants in 18 cases; granular cell tumor: 1/10; pituicytoma: 1/9). The two tumors with *TERT* promoter mutations both had accompanying MAPK/PI3K pathway mutations present (one with *HRAS* p.Q61K and one with

*FGFR1* p.N546K) (Table 1, Fig. 2). Detailed information on all detected variants is provided in Supplementary Table 3.

In two of the evaluated tumors (case ID 39 and 41), the genetic data indicated the presence of intratumoral heterogeneity. In tumor case 39, *BRAF* p.V600E mutation was present at a clonal allele frequency of 35%, indicating that it was likely to have been acquired as an early event during

tumorigenesis and to be present in the majority of tumor cells in the heterozygous state. In contrast, *TP53* p.V218E mutation was found in this tumor at a subclonal allele frequency of 13%, indicating that it was likely to have been acquired later during tumor development and therefore only present in a subset of tumor cells. In tumor case 41, *BRAF* p.V600E and *DNMT3A* p.P904L mutations were both present at clonal allele frequencies of 32%, indicating their acquisition early during tumorigenesis and presence in the majority of tumor cells. In contrast, *KMT2D* p.V1674fs mutation was found in this tumor at a subclonal allele frequency of 5%, indicating its presence in only a subset of tumor cells.

### DNA methylation profiling suggests two main subgroups of posterior pituitary tumors

We next performed a tSNE analysis of our 47 cases together with the reference cohort of the brain tumor classifier (Supplementary Fig. 1) [7]. This analysis demonstrated that all but two tumors of our cohort formed a well-defined group distinct from the other 81 tumor classes.

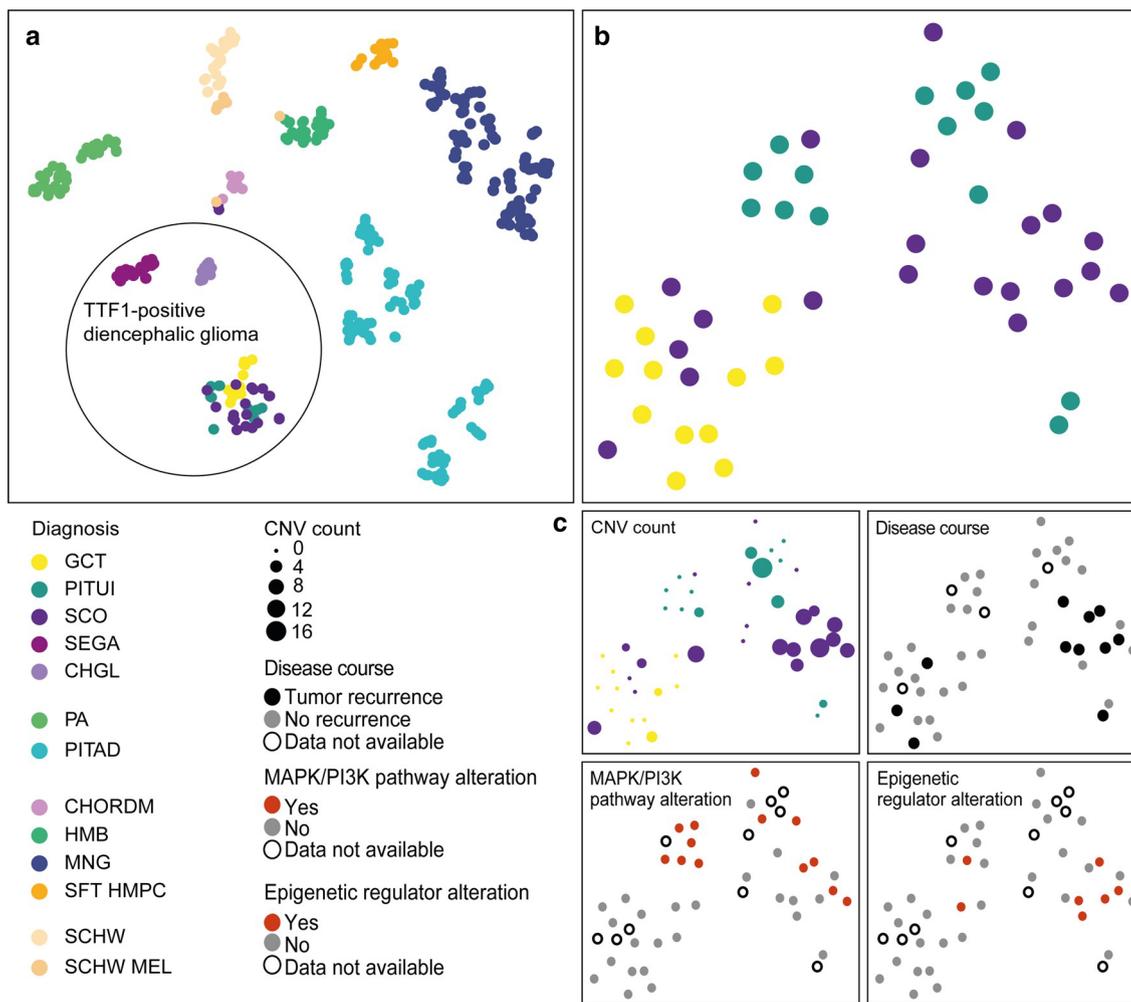
Calculation of DNA methylation based classification scores (classifier version v11b4 [7]) indicated that for all tumors, the highest score was of the DNA methylation class pituitaryoma/granular cell tumor/spindle cell oncocyoma, but seven did not reach the cutoff of 0.9 for a valid classification (Fig. 2). The classifier score provides information on the degree of similarity or match of a methylation profile to a specific methylation class. It ranges from 0 [no similarity] to 1 [highest similarity] [7]. Nonetheless, the histology of these seven tumors closely aligned with that of the posterior pituitary tumor spectrum, so we kept these cases as part of this series. Two aberrant cases from the above tSNE analysis showed particularly low classification scores (Fig. 2). Both of these cases showed abundant lymphoplasmacytic infiltrates (Supplementary Fig. 2a, b), potentially explaining the lower classification score. For the other 5 cases (case IDs 4, 18, 21, 36, 46), no particular reason for the low classification scores could be identified. Three of these tumors were primary lesions without prior treatment, one tumor was a biopsy of a recurrent tumor without prior treatment, and one tumor was a second recurrence following prior radiotherapy.

We next performed an unsupervised hierarchical clustering of the DNA methylation data of the 47 posterior pituitary tumors (Fig. 2). Histological, sequencing, and copy number data is displayed alongside this unsupervised clustering data. The clustering suggested the separation into two large groups, one possible small group, and four outlier cases (see below). The groups were provisionally named according to their most prominent molecular feature: the largest DNA methylation-clustering group was characterized by a high rate ( $n = 12/17$ ; 71%) of

MAPK/PI3K pathway alterations (MAPK/PI3K group) and included cases mainly from the morphological spectrum of pituitaryoma and spindle cell oncocyoma. The mean patient age at diagnosis in this group was 58 years (range 31–76 years), with a slight male predominance (female:male ratio 1:1.5). The second largest group was dominated by granular cell tumors (Granular group: 11 granular cell tumors, 5 spindle cell oncocytomas). For 4 of the 5 spindle cell oncocytomas falling into this group (case ID 35, 46, 27, 28), material for additional immunostaining for mitochondrial antigen was available. All cases showed extensive cytoplasmic labeling compatible with the diagnosis of spindle cell oncocyoma (Supplementary Fig. 3). The tumors in the Granular group were mostly devoid of identifiable pathogenic mutations and showed no or very few copy number changes. The mean patient age at diagnosis in this group was 42.5 years (range 27–77 years) and the female:male ratio was 1:0.6. We further observed a small group of four cases with abundant copy number alterations (CNV high group: 4 spindle cell oncocytomas). This small group was enriched for epigenetic regulator mutations ( $n = 3/4$ ; 75%) and did not show MAPK/PI3K pathway alterations. The mean patient age was 57 years (range 55–68 years) and female:male ratio was 4:0.

Four cases (ID 18, 21, 34, 38) did not fall into the above groups but rather represented outliers that we did not consider to form a separate group. They are designated as “undefined” (UND) in Fig. 2 and may represent a collection of rare additional tumor types related to the posterior pituitary. Cases 34 and 38 were diagnosed as spindle cell oncocytomas but had unusual hypercellularity (Supplementary Fig. 2c, d). Case 38 further showed an increased mitotic count of up to 3 mitotic figures per 10 HPF. Cases 18 and 21 were diagnosed as pituitaryomas and we did not identify specific unifying histomorphological features.

tSNE dimensionality reduction of the 47 posterior pituitary tumors together with selected tumor classes from the brain tumor classifier cohort [7] demonstrated a grouping of posterior pituitary tumors compared to the other classes (Fig. 3a). Interestingly, the closest neighbors of posterior pituitary tumors were the other two TTF1 expressing tumor groups SEGA and chordoid glioma. In a tSNE analysis of only posterior pituitary tumors, a slight separation of granular cell tumors was observed whereas most of the spindle cell oncocytomas and pituitaryomas grouped together in one large group (Fig. 3b). When the NGS data are overlaid, the MAPK/PI3K pathway and epigenetic regulator mutations all occurred in the large group dominated by spindle cell oncocytomas and pituitaryomas (Fig. 3c). When overlaid with the copy number information (Fig. 3c), it was evident that most cases with high rates of copy number changes grouped together and that



**Fig. 3** Depiction of  $t$  distributed stochastic neighbor embedding (tSNE) of selected groups of the brain tumor classifier cohort [7] together with the cases of this series. The tumors of this study all group together closely and separate well from the other included groups, in particular from other TTF1-positive glioma types. Two cases (case 27 and 28) fall slightly to the side together with two cases of other groups. (see Supplementary Fig. 1). *PITUI* pituitaryoma, *GCT* granular cell tumor, *SCO* spindle cell oncocytoma, *SEGA* subependymal giant cell astrocytoma, *CHGL* chordoid glioma of the third ventricle, *PA* pilocytic astrocytoma, *PITAD* pituitary adenoma, *CHORDM* chordoma, *HMB* hemangioblastoma, *MNG* meningioma, *SFT HMPC* solitary fibrous tumor/hemangiopericytoma, *SCHW*

schwannoma, *SCHW MEL* melanotic schwannoma (a). tSNE plots based on Pearson correlation distance matrix of posterior pituitary tumors illustrates a slight separation of granular tumors in the lower left from pituitaryomas and spindle cell oncocytomas on the right (b). When the NGS data is overlaid, the MAPK/PI3K pathway and epigenetic regulator mutations predominantly occurred in the large group dominated by spindle cell oncocytomas and pituitaryomas (c). When overlaid with the copy number information (c), it was evident that most cases with high rates of copy number changes grouped together and that the cases with high copy number load were partially the same cases later showing recurrence (c) Missing data is indicated by open circles

the cases with high copy number load were partially the same cases later showing recurrence (Fig. 3c).

### Analysis of differentially methylated regions

In contrast to most other brain tumors, the tumors of this study only occur in a single location, the posterior pituitary lobe or the connection to the hypothalamic region termed the “infundibulum”. This allows a direct comparison of tumor DNA methylation profiles to the potential tissue of origin.

In both tSNE analysis and hierarchical clustering of DNA methylation data, we observed a close clustering of posterior pituitary tumors and normal posterior lobe/infundibulum (Supplementary Fig. 4). To have a more exact measure of how different the two main methylation groups are from the normal tissue, we calculated the number of differentially methylated regions (DMR) with a mean beta value difference of at least 0.2. The potential third group (CNV high) was too small to be included in this analysis. This resulted in the finding that the MAPK/PI3K group shows remarkably

little difference to normal posterior pituitary tissue (only 16 DMR). In contrast, the Granular group harbored 69 DMRs compared to normal posterior pituitary. For cases with additional information available, annotation of the DMRs was done using the public databases Ensembl, Reactome, and Gene Ontology (Supplementary Tables 4 and 5). While it is not possible to directly infer gene expression changes from methylation data, we categorized the DMR as likely inhibitory, possible inhibitory, or unknown concerning expected effect on gene expression. It was of interest that among the 69 DMR of the Granular group, 6 of the affected genes were associated with G protein-coupled receptor signaling or signaling by receptor tyrosine kinases (Supplementary Table 4). This was not observed among the 16 DMR of the MAPK/PI3K group (Supplementary Table 5).

We further calculated the number of DMR between the MAPK/PI3K group and Granular group with the same cutoffs above. This indicated 50 DMRs between the two main methylation groups (data not shown). To compare these groups, we performed the same DMR calculations for the brain tumor reference classes midline pilocytic astrocytoma vs posterior fossa pilocytic astrocytoma and identified 133 DMR (data not shown) and for midline pilocytic astrocytoma vs. pleomorphic xanthoastrocytoma we identified 1304 DMR (data not shown).

### Copy number analysis

Copy number profiles were determined from both NGS and DNA methylation array data, which showed highly concordant results (data not shown). For copy number changes inferred from NGS data see Supplementary Table 6.

In 27/47 cases, we detected no chromosomal changes. We observed one or more chromosomal gains or losses in 61% of spindle cell oncocyoma (13/21), 35% of pituicytoma (5/14), and 17% of granular cell tumors (2/12). The total number of copy number changes per case was clearly higher in spindle cell oncocyoma with 10/21 cases (47%) showing 5 or more chromosomal changes. This occurred in only 2/14 (14%) pituicytomas, and none of the granular cell tumors. Further, the type of chromosomal aberrations differed with the gains and losses always affecting whole chromosomes or whole chromosome arms (breakpoint at/near the centromere) in granular cell tumors and pituicytomas but also occurring within a chromosome arm in spindle cell oncocyoma. Focal amplifications or focal deep/homozygous deletions were not observed in any of the 47 tumors. To investigate the stability of copy number changes within different regions of a sample we selected a case (ID 47, 10 CNVs) with four distinct morphological areas and separately performed DNA methylation and copy number analyses. In all four areas, the copy number changes were identical (Fig. 4a). We further investigated three cases with tissue from two or more time

points (primary and recurrence). All cases harbored chromosomal copy number aberrations at initial resection (Case 39, Fig. 4b; Case 38, Fig. 4c, Case 45, Fig. 4d). In two of the cases single chromosomal changes were gained or lost over time, whereas most aberrations remained stable.

Supplementary Fig. 5 shows summary copy number plots for the three methylation clustering groups illustrating the fraction of tumors belonging to the group harboring chromosomal gains/losses. Both the Granular and the MAPK/PI3K group did not demonstrate any highly recurrent copy number alterations. The small epigenetic group of CNV high tumors shows numerous chromosomal alterations, with all four cases showing a loss of chromosome 1p and two cases showing additional gains of 1q, as well as other recurrent chromosomal alterations.

### Patient outcome analysis

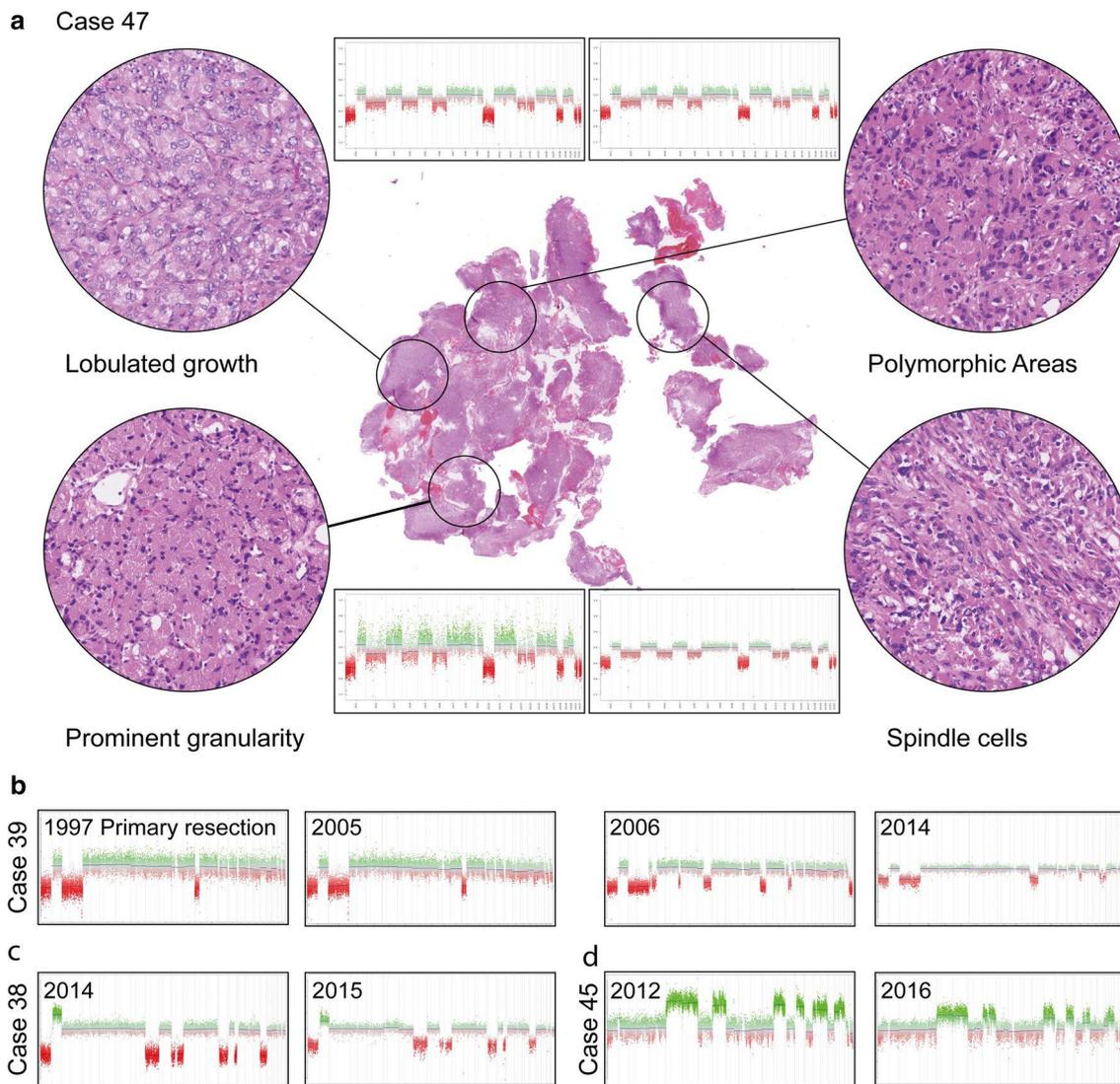
#### Tumors with spindle cell oncocyoma morphology and chromosomal copy number imbalances showed the highest rate of recurrence

Outcome data was available for 37 of the 47 patients of the series. Seven patients died during follow up: four patients died of unknown reason, one patient died after cerebral bleeding of unknown reason (no prior radiotherapy), one patient died from an occlusion of the internal carotid artery and subarachnoid hemorrhage one month after repeated tumor surgery (prior radiotherapy), and another patient died 5 days after tumor associated bleeding and occlusion of the internal carotid artery (no prior radiotherapy). As none of the patient deaths was clearly attributable to tumor biology, we only performed outcome analysis for progression free survival.

We performed univariate progression free survival analysis for central histological diagnosis, DNA methylation clusters, presence of no vs any copy number alteration, and presence of MAPK/PI3K mutation vs no detected mutation in the respective pathway (Fig. 5a–d).

Recurrence rates differed between the three main histological diagnoses. Spindle cell oncocyomas showed the highest rates of recurrence with 8/21 (38%) cases requiring a second surgery with a median time to recurrence of 4.8 years (range 5 months to 9.4 years). Only two granular cell tumors relapsed (time to recurrence 4.7 years and 10.3 years) and two of the pituicytomas (time to recurrence 5.1 years and 5 years). In Kaplan–Meier analysis there was a trend for worse outcome of spindle cell oncocyoma compared to pituicytoma, but this did not reach statistical significance ( $p = 0.21$ ; Fig. 5a).

When analyzed for the three DNA methylation groups, the “CNV high” group had shortest progression free survival



**Fig. 4** Illustration of the stability of copy number changes within a selected sample (case 47, 10 CNVs) with four distinct morphological areas. Copy number changes are identical in all four areas (a). Illustration of copy number plots of three cases with tissue from two or

more operation time points (b–d). In two of the cases single chromosomal changes were gained or lost over time, whereas most aberrations remained stable

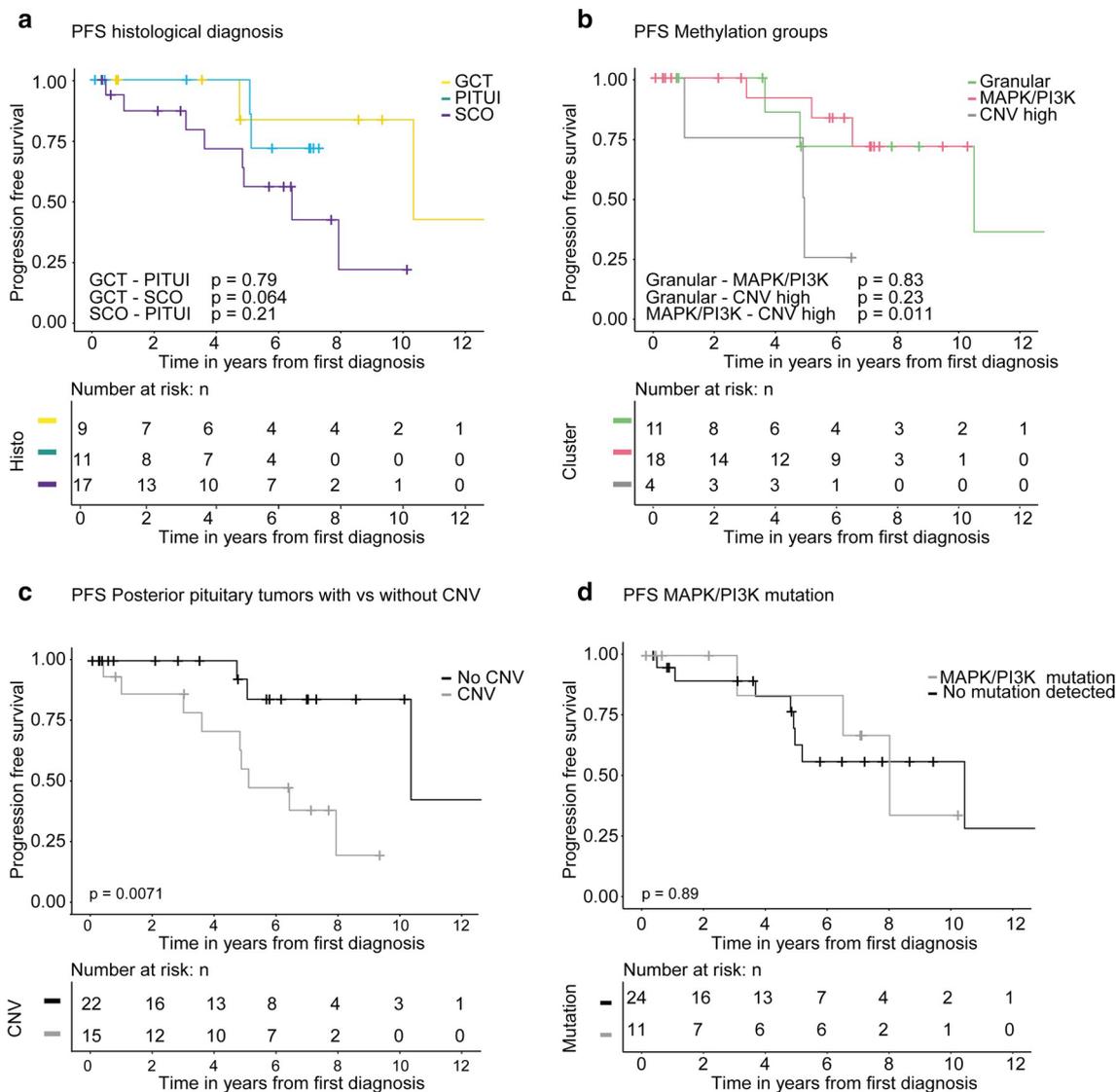
with a statistically significant difference to the MAPK/PI3K group ( $p=0.011$ , Fig. 5b).

We further analyzed if copy number alterations were associated with progression free survival. Among the whole cohort, patients with tumors showing chromosomal imbalances had a worse progression free survival ( $p=0.0071$ ; Fig. 5c). This association with progression free survival was still observed when excluding all cases where the initial tumor was not available for analysis ( $p=0.05$  [all recurrences and unclear cases excluded], Supplementary Fig. 6a,  $p=0.02$  [only recurrences with prior radiation therapy excluded], Supplementary Fig. 6b).

No association of the mutation status and disease progression was observed when comparing mutation of the different pathways vs wildtype (data shown for MAPK/PI3K mutation,  $p=0.89$ , Fig. 5d).

#### Integrated histomolecular classification improves separation of posterior pituitary tumors into prognostic groups

The presence of any versus no copy number alteration seemed to be the most relevant factor for separating posterior pituitary tumors into prognostic groups based on our



**Fig. 5** Kaplan–Meier analysis of progression free survival. Analysis stratified by central histological diagnosis. Spindle cell oncocytomas relapsed more frequently and earlier compared to the two other groups. Statistical significance was not reached for spindle cell oncocytoma vs pituicytoma ( $p = 0.21$ ) or for the other groups (a). Analysis according to DNA methylation subgroups shows shorter progression free survival for CNV high group vs. the MAPK/PI3K group

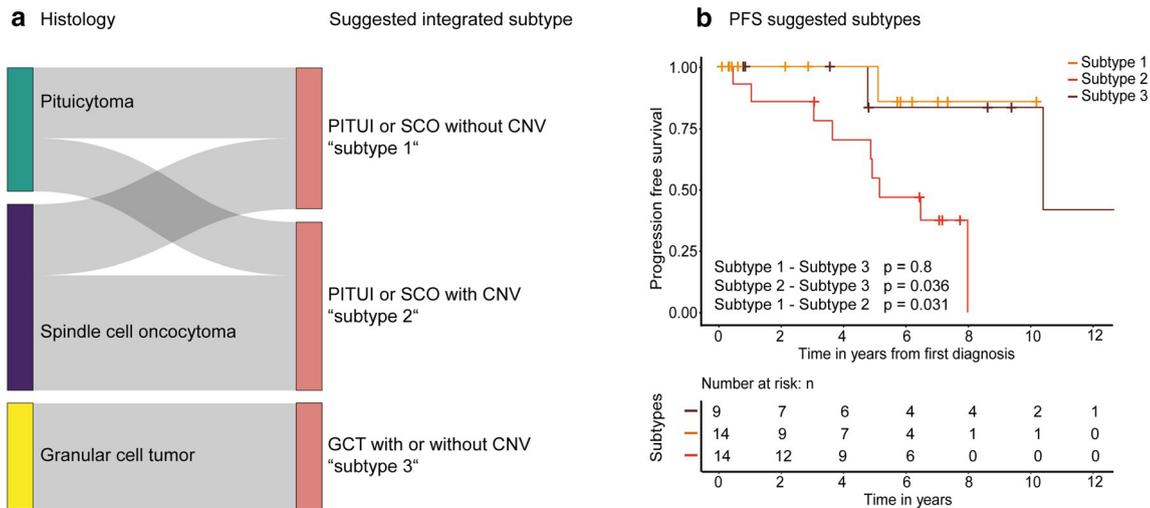
( $p = 0.011$ ) with the granular group being in-between these two (not significant) (b). Grouping of all posterior pituitary tumors according to presence of copy number alterations (i.e. any chromosomal gains/losses) showed that tumors with any copy number variation had shorter progression free survival ( $p = 0.0071$ ) (c). Analysis according to presence of any mutation of MAPK/PI3K pathway vs no detected mutation did not reach statistical significance ( $p = 0.89$ ) (d)

tumor cohort (Fig. 5c). Further, pituicytoma and spindle cell oncocytoma clearly form a histological continuum and our molecular data indicates that both tumors share a common methylation profile and have a common spectrum of mutations. Granular cell tumors in contrast are both distinct in histology and molecular pathogenesis.

Based on these findings we propose an integrated histomolecular classification of posterior pituitary tumors into 3 subtypes (Fig. 6):

Subtype 1 includes tumors of pituicytoma or spindle cell oncocytoma morphology without any copy number

alteration ( $n = 16$ ). These tumors are most likely to harbor mutations of MAPK/PI3K pathway, epigenetic regulators, or other pathways. They usually follow a benign clinical course. Only 1 tumor belonging to this group recurred during follow up, which was a pituicytoma without copy number alterations and without material available for DNA sequencing analysis. It is of interest that this group included 9 spindle cell oncocytomas that did not recur during median follow up period of 2.8 years. Thus, this group likely indicates spindle cell oncocytomas with low risk of recurrence (Fig. 6a). Subtype 2 ( $n = 19$ ) includes tumors of pituicytoma or spindle



**Fig. 6** A sankey plot for re-grouping of the posterior pituitary tumors of this series in the 3 suggested subtypes shows mainly shifting of 8 spindle cell oncocytomas without CNV to subtype 1 and shifting of 6 pituicytomas with CNV to subtype 2 (a). Kaplan–Meier analysis

of progression free survival stratified by the three proposed subtypes shows improved separation compared to stratification based on histologic diagnosis (b)

cell oncocytoma morphology with presence of chromosomal copy number alterations. 47% (8/17 cases with follow up data) of the tumors in this group recurred during a median follow up period of 7 years. Among those tumors was the only other pituicytoma in this study that recurred during follow up. It harbored 5 CNV and no detectable driver mutation. Subtype 3 is composed of granular cell tumors with or without copy number alterations ( $n = 12$ ). Only 2 tumors of this group recurred during median follow up of 4.7 years and those did not harbor any copy number alterations. Only a single tumor in this group contained an identifiable pathogenic variant (in an epigenetic regulatory gene).

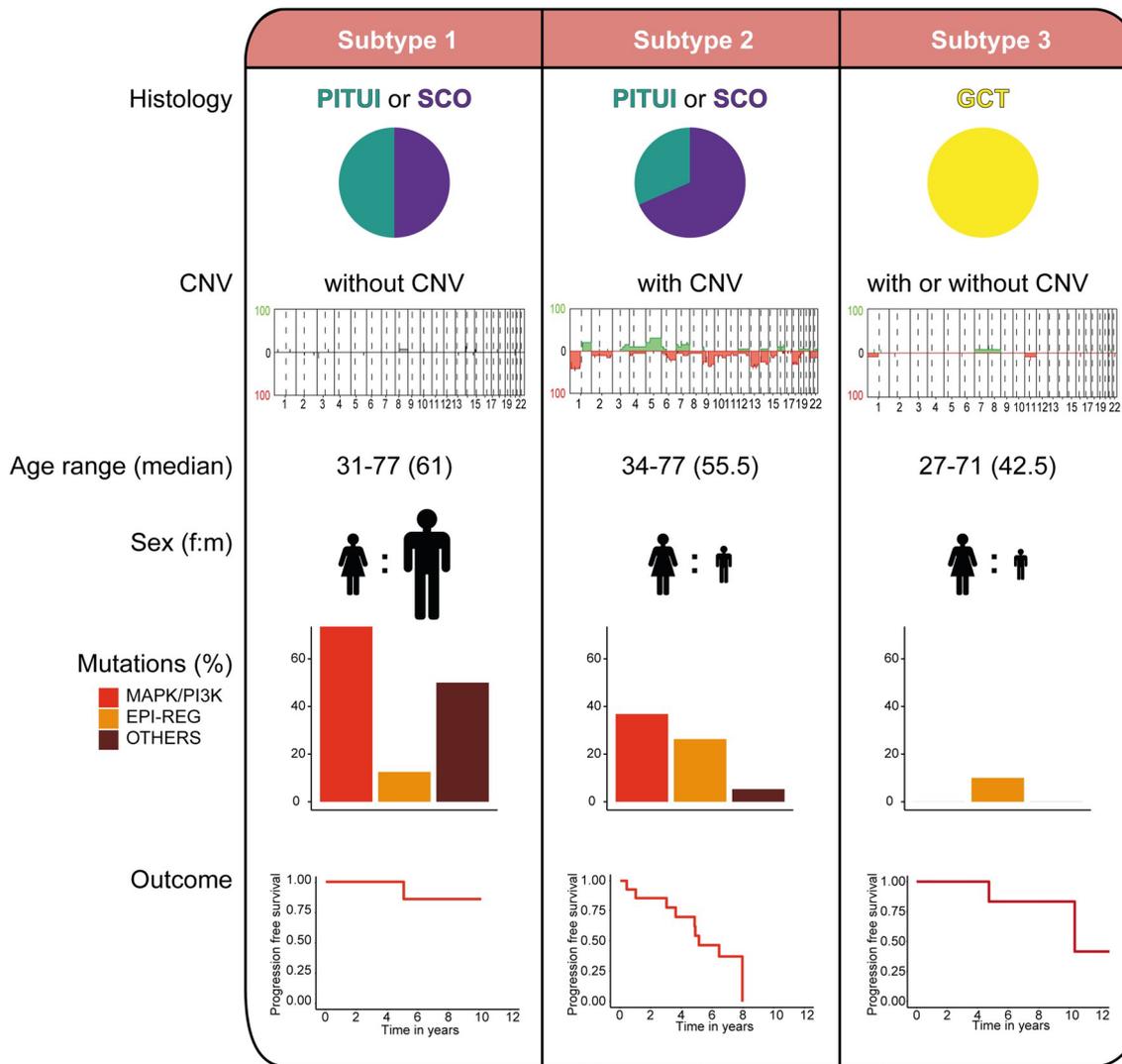
Kaplan–Meier analysis of tumors stratified into these 3 integrated subtypes shows increased separation of the tumors into prognostic groups compared to histological subtypes alone, mutation status alone, or DNA methylation groups alone ( $p = 0.031$ ; Fig. 6b).

## Discussion

We here describe the presence of two main molecular groups among posterior pituitary tumors that partially overlap with the established histological classes. While these new groups show only subtle differences of genome-wide DNA methylation, they vary considerably concerning mutation spectrum and rate of chromosomal imbalances. One of these groups can be further separated by the presence of copy number alterations into tumors with low versus high recurrence rates. Hence, we propose the integrated histo-molecular

classification of posterior pituitary tumors into 3 clinically meaningful subtypes (Fig. 7).

DNA methylation differences among tumors of the posterior pituitary are only subtle. Between the two main molecular groups, only 50 DMR were detected in our analyses. When compared to other tumor classes, this is for example lower than the differences observed between midline and posterior fossa pilocytic astrocytomas (133 DMR). This strongly suggests that posterior pituitary tumors have a common cell of origin. Accordingly, the current version of the brain tumor classifier does not separate posterior pituitary tumor subtypes and the subtle differences we found make it likely that a diagnostic DNA methylation based separation will not be possible in such a broad classification tool. Interestingly, in our comparison of DNA methylation data of posterior pituitary tumors with normal posterior pituitary tissue, posterior pituitary tumors enriched for MAPK/PI3K alterations (MAPK/PI3K group) harbored as little as 16 DMR and are thus almost indistinguishable from normal tissue. Tumors from the Granular group harbored slightly more (69 DMR) but were still surprisingly similar to normal tissue. This indicates that the methylation profile of tumors of the main groups of posterior pituitary tumors is almost identical to adult posterior pituitary tissue. This intriguing observation may be the first indication that tumors of the posterior pituitary develop from fully differentiated adult tissue and not necessarily from less differentiated cells (e.g., precursor cells) as expected for most other types of brain tumors.



**Fig. 7** Pictogram summarizing the relation of histological groups, mutation frequencies, chromosomal imbalances, and outcome of the three suggested histomolecular subtypes

Yet, a clearly non-random distribution of the histological subtypes and mutations among the DNA methylation groups was evident.

The largest DNA methylation group consists of pituitaryomas and a large proportion of spindle cell oncocyomas (MAPK/PI3K group, Fig. 2). These tumors have a high rate of MAPK/PI3K pathway alterations in combination with alterations of epigenetic regulators. Single cases or small series of MAPK mutant pituitaryoma or spindle cell oncocyoma have recently also been identified by others [13, 43, 55, 60]. These data strongly indicate that activation of the MAPK/PI3K pathway is a common molecular feature in tumors of this group. Our combined histomolecular data indicate that tumors of the morphological spectrum of pituitaryoma and spindle cell oncocyoma may be best considered as a single group.

Despite our extensive sequencing attempts using a large 500 gene panel, we were not able to identify any significant driver genetic alterations for tumors of the second largest DNA methylation group. This group consisted mostly of granular cell tumors and spindle cell oncocyomas (Fig. 2). Because of the homogenous histological appearance of most cases, a common genetic driver seems likely and these cases may be good targets for more extensive genetic sequencing studies. Five of the 16 cases of this DNA methylation group had not been histologically classified as granular cell tumors (institutional pathologic diagnosis for all five tumors was spindle cell oncocyoma). In line with the other cases of the granular group, none of these cases had any genetic alterations detected by our sequencing approach. This finding suggests that these five cases differ molecularly from other spindle

cell oncocytoomas. For four of these cases, we performed immunohistochemistry for anti-mitochondrial antigen and all cases showed clear cytoplasmic reactivity as would primarily be expected for spindle cell oncocytoomas. Thus these tumors are molecularly closer to granular cell tumors but histologically closer to spindle cell oncocytoomas and we currently cannot fully resolve the assignment for these cases. Of the 16 tumors in the Granular group, only four harbored copy number alterations. Interestingly, three of these four tumors were histologically classified as spindle cell oncocytoomas. As discussed above, the comparison of DNA methylation data of the Granular group with normal posterior pituitary indicated 69 DMR. While this seems like very few DMR overall, it can be noted that these genetically mostly silent tumors (very few mutations, very few copy number changes), may harbour somewhat more DMR than tumors of the MAPK/PI3K group (16 DMR). When we inferred the DMR of the Granular group individually, it was apparent that six of the genes associated with the DMR were involved in G protein-coupled receptor signaling or signaling by receptor tyrosine kinases (Supplementary Table 4). Further study is required to investigate if these methylation changes also affect gene expression. Still, it is interesting to speculate that possibly the Granular group may be driven by epigenetic alterations of MAPK signaling rather than by genetic mutations of this pathway.

We further identified a small fraction of four spindle cell oncocytoomas that formed a putative additional molecular group harboring high numbers of copy number alterations and epigenetic regulator mutations without MAPK alteration (labeled CNV high group, Fig. 2). Two of the cases of this group further showed an unusual histological growth pattern with prominent lobulation and prominent intraparenchymal sclerosis. More cases are required to further define if these cases indeed represent an additional rare tumor sub-group and if these cases have a recognizable histological appearance.

One of the most important findings of this study is the observation of considerable rates of MAPK/PI3K pathway alterations in tumors of either pituitary or spindle cell oncocytooma morphology. Several of the here identified MAPK pathway alterations have shown to be targetable by specific therapeutic agents in other entities and diagnostic testing for these alterations seems advisable when additional treatment options are being considered. First cases of treatment success of posterior pituitary tumors by targeted agents have even been reported [13, 55].

Interestingly, we were not able to identify a more uniform genetic driver (or even a more uniform signaling pathway) that was recurrently altered across all tumors. Unlike chordoid gliomas that all have *PRKCA* mutation [17], papillary glioneuronal tumors that all have *PRKCA* fusion [6, 24],

SEGA's that all have *TSC1/2* inactivating mutations [5, 10], gangliogliomas and pilocytic astrocytoomas that almost uniformly have *BRAF* or other MAPK alteration [29, 48, 53], posterior pituitary tumors display a truly remarkable diversity of genetic alterations, including a wide spectrum of different MAPK drivers (e.g. *BRAF*, *HRAS*, *MAP2K2*, *CBL*, *FGFR1*), PI3-kinase drivers (e.g. *PTEN*, *CBL*, *FGFR1*), epigenetic regulators (e.g. *DNMT3A*, *EZH2*, *SMARCB1*, *EP300*, *CREBBP*, *KMT2D*), and others (*TP53*, *TERT* promoter, *NFE2L2*).

Several practical consequences can be derived from our data: first, DNA methylation differences between the posterior pituitary tumors are very subtle, indicating that these tumors may be best classified as subtypes/variants of a single type/entity. DNA methylation profiling may not be suitable for routine identification of subtypes/variants. Second, copy number alterations may be of value for identifying tumors with shorter time to recurrence. This may be of value at first diagnosis to identify cases with need for closer follow up. Future studies may test if these patients may also benefit from adjuvant therapy (e.g. irradiation). Third, a substantial fraction of posterior pituitary tumors harbors potentially targetable MAPK/PI3K alterations. A range of genes within the MAPK/PI3K pathways may be affected and diagnostic testing should account for this. The spindle cell oncocytooma and pituitary subtypes are particularly prone to these alterations and should be interrogated at least at recurrence or when additional therapeutic options are required (e.g. residual non-resectable tumor). Fourth, we propose a reclassification of pituitary-derived tumors into three clinically relevant new subtypes. One group represents granular cell tumors as previously established. The other two groups both represent a mix of spindle cell oncocytooma and pituitary histology but are separated by the presence or absence of chromosomal copy number alterations into prognostic groups. We believe this will result in a more reproducible and clinically practical subgrouping of posterior pituitary tumors.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00401-021-02377-1>.

**Acknowledgements** We thank the staff of the UCSF Clinical Cancer Genomics Laboratory for assistance with genetic profiling. This study was supported in part by the NIH Director's Early Independence Award from the Office of the Director, National Institutes of Health (DP5 OD021403) to David A. Solomon. Further funding was provided from the German Cancer Consortium (DKTK), partner site Berlin and the Brain Tumour Charity (UK) for the Everest Centre for Paediatric Low-Grade Brain Tumour Research. Eilís Perez is grateful for scholarship support by the German Academic Exchange Service (DAAD) and the Berlin School of Integrative Oncology (BSIO) graduate school program.

**Funding** Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

**Data availability** DNA methylation array data are available from the Gene Expression Omnibus (GEO) repository under accession number GSE185041 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). DNA sequencing results are available in the online supplementary material. Raw sequencing data files are available from the authors upon request.

## Declarations

**Conflict of interest** DC, DTWJ, SMP, and AvD have a patent pending: DNA methylation-based method for classifying tumor species (EP 16710700.2). The remaining authors declare that they have no competing interest related to the presented work. The authors WP, CG, AP and DAS are members of the Acta Neuropathologica Editorial Board. These authors were not involved in the editorial handling of the manuscript.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

- Aryee MJ, Jaffe AE, Corrada-Bravo H, Ladd-Acosta C, Feinberg AP, Hansen KD et al (2014) Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics* 30:1363–1369. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu049>
- Asa SL, Ezzat S, Kelly DF, Cohan P, Takasumi Y, Barkhoudarian G et al (2019) Hypothalamic vasopressin-producing tumors: often inappropriate diuresis but occasionally Cushing disease. *Am J Surg Pathol* 43:251–260. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001185>
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM et al (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The gene ontology consortium. *Nat Genet* 25:25–29. <https://doi.org/10.1038/75556>
- Bancalari RE, Gregory LC, McCabe MJ, Dattani MT (2012) Pituitary gland development: an update. *Endocr Dev* 23:1–15. <https://doi.org/10.1159/000341733>
- Bongaarts A, Giannikou K, Reinten RJ, Anink JJ, Mills JD, Jansen FE et al (2017) Subependymal giant cell astrocytomas in Tuberous Sclerosis Complex have consistent TSC1/TSC2 biallelic inactivation, and no BRAF mutations. *Oncotarget* 8:95516–95529. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20764>
- Bridge JA, Liu XQ, Sumegi J, Nelson M, Reyes C, Bruch LA et al (2013) Identification of a novel, recurrent SLC44A1-PRKCA fusion in papillary glioneuronal tumor. *Brain Pathol* 23:121–128. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2012.00612.x>
- Capper D, Jones DTW, Sill M, Hovestadt V, Schrimpf D, Sturm D et al (2018) DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature* 555:469–474. <https://doi.org/10.1038/nature26000>
- Capper D, Stichel D, Sahm F, Jones DTW, Schrimpf D, Sill M et al (2018) Practical implementation of DNA methylation and copy-number-based CNS tumor diagnostics: the Heidelberg experience. *Acta Neuropathol* 136:181–210. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1879-y>
- Cenacchi G, Giovenali P, Castrioto C, Giangaspero F (2001) Pituitaryoma: ultrastructural evidence of a possible origin from folliculo-stellate cells of the adenohypophysis. *Ultrastruct Pathol* 25:309–312. <https://doi.org/10.1080/019131201753136331>
- Chan JA, Zhang H, Roberts PS, Jozwiak S, Wieslawa G, Lewin-Kowalik J et al (2004) Pathogenesis of tuberous sclerosis subependymal giant cell astrocytomas: biallelic inactivation of TSC1 or TSC2 leads to mTOR activation. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:1236–1242. <https://doi.org/10.1093/jnen/63.12.1236>
- Charrad M, Ghazzali N, Boiteau V, Niknafs A (2014) An R package for determining the relevant number of clusters in a data set. *J Stat Softw* 61(6):1–36
- Chen YA, Lemire M, Choufani S, Butcher DT, Grafodatskaya D, Zanke BW et al (2013) Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium HumanMethylation450 microarray. *Epigenetics* 8:203–209. <https://doi.org/10.4161/epi.23470>
- Dawoud FM, Naylor RM, Giannini C, Swanson AA, Meyer FB, Uhm JH (2020) TTF-1 positive posterior pituitary tumor: limitations of current treatment and potential new hope in BRAF V600E mutation variants. *Clin Neurol Neurosurg* 196:106059. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2020.106059>
- Deng MY, Sill M, Sturm D, Stichel D, Witt H, Ecker J et al (2019) Diffuse glioneuronal tumour with oligodendroglioma-like features and nuclear clusters (DGONC)—a molecularly defined glioneuronal CNS tumour class displaying recurrent monosomy 14. *Neuropathol Appl Neurobiol*. <https://doi.org/10.1111/nan.12590>
- Fortin JP, Labbe A, Lemire M, Zanke BW, Hudson TJ, Fertig EJ et al (2014) Functional normalization of 450k methylation array data improves replication in large cancer studies. *Genome Biol* 15:503. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0503-2>
- Gene Ontology C (2021) The Gene Ontology resource: enriching a GOLD mine. *Nucleic Acids Res* 49:D325–D334. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1113>
- Goode B, Mondal G, Hyun M, Ruiz DG, Lin YH, Van Ziffle J et al (2018) A recurrent kinase domain mutation in PRKCA defines chordoid glioma of the third ventricle. *Nat Commun* 9:810. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02826-8>
- Gu Z (2016) Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* 32(18):2847–2849
- Guerrero-Perez F, Marengo AP, Vidal N, Iglesias P, Villabona C (2019) Primary tumors of the posterior pituitary: a systematic review. *Rev Endocr Metab Disord* 20:219–238. <https://doi.org/10.1007/s11154-019-09484-1>
- Gupta RK, Batra VV, Singh D, Sharma MC, Kumar V (2018) Is spindle cell oncocytoma a true entity or a variant of pituitaryoma? A case report with review of literature. *Neurol India* 66:1413–1418. <https://doi.org/10.4103/0028-3886.241353>
- Hang JF, Hsu CY, Lin SC, Wu CC, Lee HJ, Ho DM (2017) Thyroid transcription factor-1 distinguishes subependymal giant cell astrocytoma from its mimics and supports its cell origin from the progenitor cells in the medial ganglionic eminence. *Mod Pathol* 30:318–328. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.205>
- Hewer E, Beck J, Kellner-Weldon F, Vajtai I (2015) Suprasellar chordoid neoplasm with expression of thyroid transcription factor 1: evidence that chordoid glioma of the third ventricle and pituitaryoma may form part of a spectrum of lineage-related tumors of the basal forebrain. *Hum Pathol* 46:1045–1049. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.03.005>
- Hewer E, Vajtai I (2015) Consistent nuclear expression of thyroid transcription factor 1 in subependymal giant cell astrocytomas suggests lineage-restricted histogenesis. *Clin Neuropathol* 34:128–131. <https://doi.org/10.5414/NP300818>

24. Hou Y, Pinheiro J, Sahn F, Reuss DE, Schrimpf D, Stichel D et al (2019) Papillary glioneuronal tumor (PGNT) exhibits a characteristic methylation profile and fusions involving PRKCA. *Acta Neuropathol* 137:837–846. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-01969-2>
25. Hovestadt V, Zapatka M (2017) conumee: enhanced copy-number variation analysis using Illumina DNA methylation arrays. R package version 1.9.0. <http://bioconductor.org/packages/conumee/>
26. Hunt SE, McLaren W, Gil L, Thormann A, Schuilenburg H, Sheppard D et al (2018) Ensembl variation resources. Database (Oxford). <https://doi.org/10.1093/database/bay119>
27. Jassal B, Matthews L, Viteri G, Gong C, Lorente P, Fabregat A et al (2020) The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 48:D498–D503. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1031>
28. Johann PD, Jager N, Pfister SM, Sill M (2019) RF\_Purify: a novel tool for comprehensive analysis of tumor-purity in methylation array data based on random forest regression. *BMC Bioinformatics* 20:428. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-3014-z>
29. Jones DT, Kocialkowski S, Liu L, Pearson DM, Backlund LM, Ichimura K et al (2008) Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer Res* 68:8673–8677. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2097>
30. Kassambara A, Kosinski M, Biecek P (2021) survminer: Drawing Survival Curves using 'ggplot2'. R package version 0.4.9. <https://CRAN.R-project.org/package=survminer>
31. Kiecker C (2018) The origins of the circumventricular organs. *J Anat* 232:540–553. <https://doi.org/10.1111/joa.12771>
32. Kline CN, Joseph NM, Grenert JP, van Ziffle J, Talevich E, Onodera C et al (2017) Targeted next-generation sequencing of pediatric neuro-oncology patients improves diagnosis, identifies pathogenic germline mutations, and directs targeted therapy. *Neuro Oncol* 19:699–709. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now254>
33. Krijthe JH (2015) Rtsne: T-Distributed Stochastic Neighbor Embedding using Barnes-Hut Implementation
34. van der Maaten LJP, Hinton G (2008) Visualizing high-dimensional data using t-SNE. *J Mach Learn Res* 9:2579–2605
35. Lazzaro D, Price M, de Felice M, Di Lauro R (1991) The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development* 113:1093–1104
36. Lee EB, Tihan T, Scheithauer BW, Zhang PJ, Gonatas NK (2009) Thyroid transcription factor 1 expression in sellar tumors: a histogenetic marker? *J Neuropathol Exp Neurol* 68:482–488. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181a13fca>
37. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Weltgesundheitsorganisation, International Agency for Research on C (2016) WHO classification of tumours of the central nervous system. City
38. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK et al (2016) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 131:803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
39. van Maaten LJP (2014) Accelerating t-SNE using tree-based algorithms. *J Mach Learn Res* 15:3221–3245
40. Maksimovic J, Phipson B, Oshlack A (2016) A cross-package Bioconductor workflow for analysing methylation array data. *F1000Res* 5:1281
41. Mete O, Lopes MB, Asa SL (2013) Spindle cell oncocytomas and granular cell tumors of the pituitary are variants of pituitaryoma. *Am J Surg Pathol* 37:1694–1699. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e31829723e7>
42. Michotte A, Van Der Veken J, Huylebrouck M, Duerinckx J, D'Haens J, Hoorens A (2014) Expression of thyroid transcription factor 1 in a chordoid glioma. *J Neurol Sci* 346:362–363. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2014.09.005>
43. Miller MB, Bi WL, Ramkissoon LA, Kang YJ, Abedalthagafi M, Knoff DS et al (2016) MAPK activation and HRAS mutation identified in pituitary spindle cell oncocytoma. *Oncotarget* 7:37054–37063. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9244>
44. Mollard P, Hodson DJ, Lafont C, Rizzotti K, Drouin J (2012) A tridimensional view of pituitary development and function. *Trends Endocrinol Metab* 23:261–269. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.02.004>
45. Nikolaev SI, Rimoldi D, Iseli C, Valsesia A, Robyr D, Gehrig C et al (2011) Exome sequencing identifies recurrent somatic MAP2K1 and MAP2K2 mutations in melanoma. *Nat Genet* 44:133–139. <https://doi.org/10.1038/ng.1026>
46. Pajtler KW, Witt H, Sill M, Jones DT, Hovestadt V, Kratochwil F et al (2015) Molecular classification of ependymal tumors across all CNS compartments, histopathological grades, and age groups. *Cancer Cell* 27:728–743. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.04.002>
47. Peters TJ, Buckley MJ, Statham AL, Pidsley R, Samaraks K, Reginald VL et al (2015) De novo identification of differentially methylated regions in the human genome. *Epigenetics Chromatin* 8:6. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-8-6>
48. Pfister S, Janzarik WG, Remke M, Ernst A, Werft W, Becker N et al (2008) BRAF gene duplication constitutes a mechanism of MAPK pathway activation in low-grade astrocytomas. *J Clin Invest* 118:1739–1749. <https://doi.org/10.1172/JCI33656>
49. R Core Team (2018) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
50. Ren X, Kuan PF (2019) methylGSA: a Bioconductor package and Shiny app for DNA methylation data length bias adjustment in gene set testing. *Bioinformatics* 35:1958–1959. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty892>
51. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W et al (2015) limma powers differential expression analyses for RNA-seq and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 43:e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
52. Roncaroli F, Scheithauer BW, Cenacchi G, Horvath E, Kovacs K, Lloyd RV et al (2002) “Spindle cell oncocytoma” of the adenohypophysis: a tumor of folliculostellate cells? *Am J Surg Pathol* 26:1048–1055. <https://doi.org/10.1097/0000478-200208000-00010>
53. Schindler G, Capper D, Meyer J, Janzarik W, Omran H, Herold-Mende C et al (2011) Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol* 121:397–405. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0802-6>
54. Scothorne CM (1955) A glioma of the posterior lobe of the pituitary gland. *J Pathol Bacteriol* 69:109–112. <https://doi.org/10.1002/path.1700690115>
55. Sollfrank L, Lettmaier S, Erdmann M, Uslu U (2019) Panniculitis under successful targeted inhibition of the MAPK/ERK signaling pathway in a patient with BRAF V600E-mutated spindle cell oncocytoma of the pituitary gland. *Anticancer Res* 39:3955–3959. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13549>
56. Sturm D, Orr BA, Toprak UH, Hovestadt V, Jones DTW, Capper D et al (2016) New brain tumor entities emerge from molecular classification of CNS-PNETs. *Cell* 164:1060–1072. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.015>
57. Suess U, Pliska V (1981) Identification of the pituitary cells by indirect immunofluorescence-staining for the glial fibrillary acidic protein. *Brain Res* 221:27–33. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(81\)91061-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)91061-1)
58. Takei Y, Seyama S, Pearl GS, Tindall GT (1980) Ultrastructural study of the human neurohypophysis. II. Cellular elements of neural parenchyma, the pituitary cells. *Cell Tissue Res* 205:273–287. <https://doi.org/10.1007/bf00234685>
59. Takuma N, Sheng HZ, Furuta Y, Ward JM, Sharma K, Hogan BL et al (1998) Formation of Rathke’s pouch requires dual induction from the diencephalon. *Development* 125:4835–4840

60. Viaene AN, Lee EB, Rosenbaum JN, Nasrallah IM, Nasrallah MP (2019) Histologic, immunohistochemical, and molecular features of pituicytomas and atypical pituicytomas. *Acta Neuropathol Commun* 7:69. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0722-6>
61. Wefers AK, Stichel D, Schrimpf D, Coras R, Pages M, Tuzi Espariat A et al (2020) Isomorphic diffuse glioma is a morphologically and molecularly distinct tumour entity with recurrent gene fusions of MYBL1 or MYB and a benign disease course. *Acta Neuropathol* 139:193–209. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02078-w>
62. Wickham H (2016) *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Springer-Verlag, New York
63. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY (2012) clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS* 16:284–287. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118>
64. Zamecnik J, Chanova M, Kodet R (2004) Expression of thyroid transcription factor 1 in primary brain tumours. *J Clin Pathol* 57:1111–1113. <https://doi.org/10.1136/jcp.2004.017467>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Authors and Affiliations

Simone Schmid<sup>1</sup>  · David A. Solomon<sup>2</sup>  · Elis Perez<sup>1</sup> · Anne Thieme<sup>1,3</sup> · Bette K. Kleinschmidt-DeMasters<sup>4</sup> · Caterina Giannini<sup>5</sup> · Annekathrin Reinhardt<sup>6,7</sup> · Sylvia L. Asa<sup>8,9</sup> · Ozgur Mete<sup>9</sup> · Damian Stichel<sup>7</sup> · Christin Siewert<sup>3</sup> · Carsten Dittmayer<sup>1</sup> · Martin Hasselblatt<sup>10</sup> · Werner Paulus<sup>10</sup> · Christoph Nagel<sup>11</sup> · Patrick N. Harter<sup>12,13,14,15</sup> · Jens Schittenhelm<sup>16,17</sup> · Jürgen Honegger<sup>18</sup> · Elisabeth Rushing<sup>19</sup> · Roland Coras<sup>20</sup> · Stefan M. Pfister<sup>21,22,23</sup> · Rolf Buslei<sup>24</sup> · Arend Koch<sup>1</sup> · Arie Perry<sup>2</sup> · David T. W. Jones<sup>21,25</sup> · Andreas von Deimling<sup>6,7</sup> · David Capper<sup>1,3</sup>  · M. Beatriz Lopes<sup>26</sup> 

- <sup>1</sup> Charité – Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Department of Neuropathology, Charitéplatz 1, Berlin, Germany
- <sup>2</sup> Department of Pathology, University of California, San Francisco, CA, USA
- <sup>3</sup> German Cancer Consortium (DKTK), Partner Site Berlin, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany
- <sup>4</sup> Department of Pathology, University of Colorado, Aurora, CO, USA
- <sup>5</sup> Department of Pathology and Laboratory Medicine, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA
- <sup>6</sup> Department of Neuropathology, Institute of Pathology, Heidelberg University Hospital, Heidelberg, Germany
- <sup>7</sup> Clinical Cooperation Unit Neuropathology, German Cancer Consortium (DKTK), German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany
- <sup>8</sup> Department of Pathology, Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA
- <sup>9</sup> Department of Pathology, University Health Network, Toronto, ON, Canada
- <sup>10</sup> Institute of Neuropathology, University Hospital Münster, Münster, Germany
- <sup>11</sup> Division of Neurosurgery, Sankt Gertrauden Hospital, Berlin, Germany
- <sup>12</sup> Institute of Neurology (Edinger Institute), Goethe University, Frankfurt, Germany
- <sup>13</sup> German Cancer Consortium (DKTK), Partner Site Frankfurt/Mainz, Frankfurt am Main, Germany
- <sup>14</sup> German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany
- <sup>15</sup> Frankfurt Cancer Institute (FCI), Frankfurt am Main, Germany
- <sup>16</sup> Center for Neuro-Oncology, Comprehensive Cancer Center Tübingen-Stuttgart, University Hospital Tübingen, Eberhard Karls University, Tübingen, Germany
- <sup>17</sup> Department of Neuropathology, University Hospital Tübingen, Eberhard Karls University, Tübingen, Germany
- <sup>18</sup> Department of Neurosurgery, University of Tübingen, Tübingen, Germany
- <sup>19</sup> Institute of Neuropathology, University Hospital and University of Zurich, Zurich, Switzerland
- <sup>20</sup> Department of Neuropathology, Institute of Neuropathology, Affiliated Partner of the ERNEpiCARE, Universitätsklinikum Erlangen, Friedrich-Alexander-University of Erlangen-Nürnberg (FAU), Schwabachanlage 6, 91054 Erlangen, Germany
- <sup>21</sup> Hopp Children's Cancer Center (KiTZ), Heidelberg, Germany
- <sup>22</sup> Department of Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, University Hospital Heidelberg, Heidelberg, Germany
- <sup>23</sup> Division of Pediatric Neurooncology, German Cancer Consortium (DKTK), German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany
- <sup>24</sup> Institute of Pathology, Sozialstiftung Bamberg, Buger Str. 80, 96049 Bamberg, Germany
- <sup>25</sup> Pediatric Glioma Research Group, German Consortium for Translational Cancer Research (DKTK), German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany
- <sup>26</sup> Department of Pathology, Neuropathology, University of Virginia Health System, Charlottesville, Virginia, USA

## **Lebenslauf**

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

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

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

## Komplette Publikationsliste

1. **Schmid S**, Solomon DA, Perez E, Thieme A, Kleinschmidt-DeMasters BK, Giannini C, Reinhardt A, Asa SL, Mete O, Stichel D, Siewert C, Dittmayer C, Hasselblatt M, Paulus W, Nagel C, Harter PN, Schittenhelm J, Honegger J, Rushing E, Coras R, Pfister SM, Buslei R, Koch A, Perry A, Jones DTW, von Deimling A, Capper D, Lopes MB. Genetic and epigenetic characterization of posterior pituitary tumors. *Acta Neuropathol.* 2021 Dec;142(6):1025-1043. doi: 10.1007/s00401-021-02377-1.

**Impact-Faktor: 17,088**

2. Glöss S, Jurmeister P, Thieme A, **Schmid S**, Cai WY, Serrette RN, Perner S, Ribbat-Idel J, Pagenstecher A, Bläker H, Keber U, Stadelmann C, Zechel S, Johann PD, Hasselblatt M, Paulus W, Thomas C, Dohmen H, Baumhoer D, Frank S, Agaimy A, Schüller U, Vasudevaraja V, Snuderl M, Liu CZ, Pfister DG, Jungbluth AA, Ghossein RA, Xu B, Capper D, Dogan S. IDH2 R172 Mutations Across Poorly Differentiated Sinonasal Tract Malignancies: Forty Molecularly Homogenous and Histologically Variable Cases With Favorable Outcome. *Am J Surg Pathol.* 2021 Sep 1;45(9):1190-1204. doi: 10.1097/PAS.0000000000001697.

**Impact-Faktor: 6,394**

3. Schweizer L, Thierfelder F, Thomas C, Soschinski P, Kim HY, Jödicke R, Woltering N, Förster A, Teichmann D, Siewert C, Klein K, **Schmid S**, Nunninger M, Thomale UW, Onken J, Mühleisen H, Schittenhelm J, Tatagiba M, von Deimling A, Reuss DE, Solomon DA, Heppner FL, Koch A, Hartmann C, Staszewski O, Capper D. Molecular characterisation of sporadic endolymphatic sac tumours and comparison to von Hippel-Lindau disease-related tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2021 Oct;47(6):756-767. doi: 10.1111/nan.12741.

**Impact-Faktor: 8,09**

4. Ricklefs FL, Fita KD, Rotermund R, Piffko A, **Schmid S**, Capper D, Buslei R, Buchfelder M, Burkhardt T, Matschke J, Lamszus K, Westphal M, Schüller U, Flitsch J. Genome-wide DNA methylation profiles distinguish silent from non-silent ACTH adenomas. *Acta Neuropathol.* 2020 Jul;140(1):95-97. doi: 10.1007/s00401-020-02149-3.

**Impact-Faktor: 17,088**

5. Sievers P, Appay R, Schrimpf D, Stichel D, Reuss DE, Wefers AK, Reinhardt A, Coras R, Ruf VC, **Schmid S**, de Stricker K, Boldt HB, Kristensen BW, Petersen JK, Uihøi BP, Gardberg M, Aronica E, Hasselblatt M, Brück W, Bielle F, Mokhtari K, Lhermitte B, Wick W, Herold-Mende C, Hänggi D, Brandner S, Giangaspero F, Capper D, Rushing E, Wesseling P, Pfister SM, Figarella-Branger D, von Deimling A, Sahm F, Jones DTW. Rosette-forming glioneuronal tumors share a distinct DNA methylation profile and mutations in FGFR1, with recurrent co-mutation of PIK3CA and NF1. *Acta Neuropathol.* 2019 Sep;138(3):497-504. doi: 10.1007/s00401-019-02038-4.

**Impact-Faktor: 14,251**

6. Capper D, Stichel D, Sahm F, Jones DTW, Schrimpf D, Sill M, **Schmid S**, Hovestadt V, Reuss DE, Koelsche C, Reinhardt A, Wefers AK, Huang K, Sievers P, Ebrahimi A, Schöler A, Teichmann D, Koch A, Hänggi D, Unterberg A, Platten M, Wick W, Witt O, Milde T, Korshunov A, Pfister SM, von Deimling A. Practical implementation of DNA methylation and copy-number-based CNS tumor diagnostics: the Heidelberg experience. *Acta Neuropathol.* 2018 Aug;136(2):181-210. doi: 10.1007/s00401-018-1879-y.

**Impact-Faktor: 18,174**

7. Capper D, Engel NW, Stichel D, Lechner M, Glöss S, **Schmid S**, Koelsche C, Schrimpf D, Niesen J, Wefers AK, Jones DTW, Sill M, Weigert O, Ligon KL, Olar A, Koch A, Forster M, Moran S, Tirado OM, Sáinz-Jaspeado M, Mora J, Esteller M, Alonso J, Del Muro XG, Paulus W, Felsberg J, Reifenberger G, Glatzel M, Frank S, Monoranu CM, Lund VJ, von Deimling A, Pfister S, Buslei R, Ribbat-Idel J, Perner S, Gudziol V, Meinhardt M, Schüller U. DNA methylation-based reclassification of olfactory neuroblastoma. *Acta Neuropathol.* 2018 Aug;136(2):255-271. doi: 10.1007/s00401-018-1854-7.

**Impact-Faktor: 18,174**

8. Alhalabi KT, Stichel D, Sievers P, Peterziel H, Sommerkamp AC, Sturm D, Wittmann A, Sill M, Jäger N, Beck P, Pajtler KW, Snuderl M, Jour G, Delorenzo M, Martin AM, Levy A, Dalvi N, Hansford JR, Gottardo NG, Uro-Coste E, Maurage CA, Godfraind C, Vandenbos F, Pietsch T, Kramm C, Filippidou M, Kattamis A, Jones C, Øra I, Mikkelsen TS, Zapotocky M, Sumerauer D, Scheie D, McCabe M, Wesseling P, Tops BBJ, Kranendonk MEG, Karajannis MA,

Bouvier N, Papaemmanuil E, Dohmen H, Acker T, von Hoff K, **Schmid S**, Miele E, Filipinski K, Kitanovski L, Krskova L, Gojo J, Haberler C, Alvaro F, Ecker J, Selt F, Milde T, Witt O, Oehme I, Kool M, von Deimling A, Korshunov A, Pfister SM, Sahm F, Jones DTW. PATZ1 fusions define a novel molecularly distinct neuroepithelial tumor entity with a broad histological spectrum. *Acta Neuropathol.* 2021 Nov;142(5):841-857. doi: 10.1007/s00401-021-02354-8.

**Impact-Faktor: 17,088**

9. Rocha ML, Dittmayer C, Uruha A, Korinth D, Chaoui R, Schlembach D, Rossi R, Pelin K, Suk EK, **Schmid S**, Goebel HH, Schuelke M, Stenzel W, Englert B. A novel mutation in NEB causing foetal nemaline myopathy with arthrogyrosis during early gestation. *Neuromuscul Disord.* 2021 Mar;31(3):239-245. doi: 10.1016/j.nmd.2020.11.014.

**Impact-Faktor: 4,296**

10. Uruha A, Kliesch S, **Schmid S**, Dittmayer C, Goebel HH, Dressel A, Stenzel W, Handreka R. Anaplastic lymphoma kinase inhibitor-associated myositis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2020 May 6;7(4):e735. doi: 10.1212/NXI.0000000000000735.

**Impact-Faktor: 8,485**

11. Tattoli L, **Schmid S**, Tsokos M. Three rounds as "tandem bullets": unusual findings in a case of a suicidal gunshot to the head. *Forensic Sci Med Pathol.* 2014 Dec;10(4):613-8. doi: 10.1007/s12024-014-9591-2.

**Impact-Faktor: 1,983**

12. Buschmann CT, **Schmid S**, Tsokos M. Gastric mucosal lacerations in drowning: resuscitation artifact or sign of death by drowning ("Sehrt's sign")? *Forensic Sci Med Pathol.* 2015 Jun;11(2):312-3. doi: 10.1007/s12024-014-9641-9.

**Impact-Faktor: 1,896**

## Persönliche Danksagung

Ich möchte allen herzlich danken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt David Capper für die ausgezeichnete Betreuung und die Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit. Ich bedanke mich insbesondere für das Augenmaß bei der Bemessung von Freiheit und Anleitung. Auch Arend Koch danke ich sehr für seine Unterstützung und seinen Rat und die stets offene Tür.

Ein herzlicher Dank auch an meinen Chef und Institutsdirektor, Herrn Prof. Dr. med. Frank Hoppner, für sein Zutrauen in mich als Mitarbeiterin und für die Freiheiten und die Unterstützung, die mir an seinem Institut zuteilwurden.

Auch danke ich herzlich Beatriz Lopes, David Solomon und allen Kooperationspartnern für die große Bereitschaft dieses Projekt mit ihren jeweiligen Beiträgen, insbesondere ihrer Zeit und ihrer hochgeschätzten Expertise zu unterstützen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Christin Siewert und Anne Thieme für ihre stets offenen Ohren, ihren fachlichen Rat und ihre Unterstützung bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei allen Kollegys aus der Neuropathologie bedanken, für Geduld, Rat und Humoriges, wenn Not an der Frau war. Insbesondere gilt mein Dank Carsten Dittmayer, der mich auf meinem Weg mit Rat, Anregungen und produktiven Gesprächen über Unmengen an persischem Essen, „Goebi Normschokolade“ und dem ein oder anderen „Don Schnulze“ Ausfall begleitet hat.

Unserem lieben und kompetenten Laborteam der Molekularpathologie und des Eingangs/ der Immunhistochemie möchte ich Danke sagen, da sie meine Arbeit sehr unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie. Für die Durchsicht, die Begleitung und immerwährende Unterstützung danke ich ganz herzlich meinem Mann, Stefan Schmid. Meinen Kindern danke ich besonders für ihre Geduld und ihre Fröhlichkeit.