

Pädiatrische Oligodendroglome: Ein eigenständiger Tumor-Typ?

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)
der Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Svenja Nöldeke
aus Moers
2026

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Torsten Pietsch
2. Gutachter: Dr. Stephan Leonhard Baader

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.2026

Aus dem Institut für Neuropathologie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	11
1.1 Die WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems	11
1.2 Neuroepitheliale Tumoren	11
1.2.1 Astrozytäre Tumoren	12
1.2.2 Oligodendrogliale Tumoren	13
1.2.3 Mischgliome	13
1.3 Neuropathologische Diagnostik diffuser Gliome bei Erwachsenen und Kindern	14
1.4 Mögliche Differentialdiagnosen	16
1.5 Wissenschaftliche Fragestellung	17
2. Material und Methoden	18
2.1 Auswahl der Patient*innen und Tumorproben	18
2.2 Immunhistochemische Analyse	19
2.3 DNA- und RNA-Extraktion	22
2.4 Pyrosequenzierungsanalyse der Mutationshotspots der Gene <i>IDH-1/-2</i> und der Promotorregion des <i>TERT</i> -Gens	22
2.5 Multiplex-Ligations-abhängige Sondenamplifikation	23
2.6 Analyse der DNA-Methylierung	24
2.7 DNA-Sequenzierung mittels <i>Next-generation-sequencing</i>	25
2.8 Molekularer Inversionssonden-Test	25
2.9 RNA-Fusionsanalyse mittels Nanostring	26
2.10 RNA-Panel-Sequenzierung	28
2.11 UMAP	29
3. Ergebnisse	30
3.1 Klinische und histopathologische Merkmale	30
3.2 Reevaluation der Diagnosen nach der aktuellen WHO-Klassifikation 2021	34

3.2.1	Bestätigung der Diagnose bei Nachweis einer oligodendroglialen Differenzierung	34
3.2.1.1	Oligodendroliom, IDH-mutiert, 1p/19q-codeletiert ZNS WHO Grad 3	34
3.2.1.2	Malignes diffuses Gliom, IDH-mutiert, duality Phänotyp	35
3.2.2	Änderung der Diagnose bei Nachweis einer vorrangig astrozytären Differenzierung	36
3.2.2.1	Hochgradige Astrozytome	36
3.2.2.1.1	Astrozytom, IDH-mutiert ZNS WHO Grad 4	36
3.2.2.1.2	GBM, päd. RTK-1-Typ (Subtyp B und C) ZNS WHO Grad 4	37
3.2.2.2	Niedriggradige Astrozytome	37
3.2.3	Änderung der Diagnose bei Nachweis einer glioneuronalen Differenzierung	38
3.2.3.1	Höhergradige glioneuronale Tumoren	39
3.2.3.2	Niedriggradige glioneuronale Tumoren	39
3.2.3.2.1	DLGNT, analog ZNS WHO Grad 2	39
3.2.3.2.2	DNT, komplexe Variante ZNS WHO Grad 1	40
3.2.4	Änderung der Diagnose durch Zuordnung zu neu definierten Tumortypen	40
3.2.4.1	DGONC	40
3.2.4.2	Supratentorielles Ependymom, ZFTA-Fusion positiv ZNS WHO Grad 3	41
3.2.5	Nicht reklassifizierbare Tumoren	41
3.2.5.1	Malignes diffuses Gliom, IDH-WT, NOS und malignes diffuses Gliom, H3- und IDH-WT	42
3.2.5.2	Malignes diffuses Gliom, NOS	42
3.3	UMAP	48
4.	Diskussion	50
5.	Zusammenfassung	58
6.	Abbildungsverzeichnis	59
7.	Tabellenverzeichnis	60
8.	Literaturverzeichnis	61

9.	Erklärung zum Eigenanteil	66
10.	Danksagung	67

Abkürzungsverzeichnis

A	Astrozytom
Abb.	Abbildung
Ampl	Engl. <i>Amplification</i> (Amplifikation)
AO	Anaplastisches Oligodendrogiom
AOA	Anaplastisches Oligoastrozytom
ATRX	Engl. <i>Mental retardation syndrome x-linked</i>
APS	Adenosinphosphosulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCOR	<i>BCL6</i> (engl. <i>B-cell lymphoma 6-protein</i>)-Corepressor
<i>BRAF</i> (V600E)	Engl. <i>V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog</i> (Punktmutation im <i>BRAF</i> -Gen)
BWA	Engl. <i>Burrows-Wheeler-Aligner</i> (Software-Modul)
Bzw.	Beziehungsweise
<i>CDKN2A/B</i>	Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 2A/B
Chr.	Chromosom
Codel / codel	Codeletion / codeletiert
CT	Computertomografie
DGONC	Engl. <i>Diffuse glioneuronal tumor with oligodendrogioma-like features and nuclear clusters</i> (Diffuser glioneuronaler Tumor mit Oligodendrogiom-

ähnlichen Merkmalen und nukleären Clustern)

DGNN Deutschen Gesellschaft für Neuropathologie und
Neuroanatomie

DLGNT Engl. *Diffuse leptomeningeal glioneuronal tumor*
(Diffuser leptomeningealer glioneuronaler Tumor)

DNA Engl. *Deoxyribonucleic acid* (Desoxyribonukleinsäure)

DNA_DEGR Engl. *Deoxyribonucleic acid degraded*

DNT Engl. *Dysembryoplastic neuroepithelial tumor*
(Dysembryoplastischer neuroepithelialer Tumor)

EGFR Engl. *Epidermal growth factor receptor*
(Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)

EMA Engl. *Epithelial membrane antigen*
(Epitheliales Membranantigen)

Engl. Englisch

EZHIP Anti-CXorf67

FGFR Engl. *Fibroblast growth factor receptor*
(Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor)

FFPE Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettet

Fs Engl. *Frameshift* (Rasterschub)

Fus Fusion

GBM Glioblastoma multiforme

GBM_MES GBM mesenchymaler Subtyp

GFAP	Engl. <i>Glial fibrillary acidic protein</i> (Saures Gliafaserprotein)
HGG	Engl. <i>High-grade glioma</i> (Hochgradiges Gliom)
HIT-HGG	Hirntumor hochgradige Gliome (Akronym der Studie)
HIT-GBM	Hirntumor Glioblastoma multiforme (Akronym der Studien)
HE	Hämatoxylin-Eosin
IDH-1/-2	Isocitrat-Dehydrogenase-1/-2
<i>IDH-1</i> (R132H)	Punktmutation R132H des Isocitratdehydrogenase 1-Gens
IHC	Immunhistochemie
Ki-67	Kiel Antigen 67
KRAS	Kirsten Rat Sarkoma Onkogen
LGG	Engl. <i>Low-grade glioma</i> (Niedriggradiges Gliom)
LGG_PA_MID	Engl. <i>Low-grade glioma pilocytic astrocytoma midline</i>
MAPK	Engl. <i>Mitogen-activated protein kinase</i> (Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinasen)
MAP-2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MIB-1	Engl. <i>Made in Borstel-1</i>
MIP	Engl. <i>Molecular inversion probes</i> (Molekularer Inversionssonden-Test)
MLPA	Engl. <i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i> (Multiplex-Ligations-abhängige Sondenamplifikation)
mM	Milimolar

MRT	Magnetresonanztomographie
Mut / mut	Mutation / mutiert
NeuN	Engl. <i>Neuronal nuclei</i> (Neuronale Zellkerne)
NF1	Neurofibromatose Typ 1
NOS	Engl. <i>Not otherwise specified</i> (nicht anderweitig spezifiziert)
<i>NTRK1</i>	Engl. <i>Neurotrophic receptor tyrosine kinase 1</i>
OD	Oligodendroliom
OA	Oligoastrozytom
Olig-2	Engl. <i>Oligodendrocyte transcription factor</i> (Oligodendrozyten Transkriptionsfaktor)
PA	Pilozytisches Astrozytom
Päd.	Pädiatrisch
PCR	Engl. <i>Polymerase chase reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
<i>PDGFRA</i>	Engl. <i>Platelet-derived growth factor receptor alpha</i> (Thrombozyten-Wachstums-Rezeptor-Faktor alpha)
PHH3	Phosphoryliertes Histon H3-Protein
PMS-2	Postmeiotischer Segregationsdefekt 2
PPi	Pyrophosphat
RIG	Engl. <i>Radiation induced glioma</i> (strahlungsinduziertes Gliom)
RNA-Seq	Engl. <i>Ribonucleic acid-sequencing</i> (RNA-Sequenzierung)
RNA	Engl. <i>Ribonucleid acid</i> (Ribonukleinsäure)
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase

S-100	Saures Calcium-bindendes Protein
Sog.	Sogenannte
Tab.	Tabelle
<i>TERT</i>	Engl. <i>Telomerase-reverse-transcriptase</i> (Telomerase Reverse Transkriptase)
<i>TP53</i>	Tumor Protein p53
TPR	Engl. <i>Translocated promoter region (Nuclear Basket Protein)</i>
t-SNE	Engl. <i>T-distributed stochastic neighbor embedding</i>
UMAP	Engl. <i>Uniform manifold approximation and projection</i>
WHO	Engl. <i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)
WT	Wildtyp
<i>ZFTA</i>	Engl. <i>Zinc finger translocation associated</i> (Zinkfinger translokationsverbunden)
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.B.	Zum Beispiel
1p	Kurzer Arm von Chromosom 1
19q	Langer Arm von Chromosom 19

1. Einleitung

1.1 Die WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems

Die WHO-Klassifikation (engl. *World Health Organization*, Weltgesundheitsorganisation) der Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) definiert und kategorisiert verschiedene Typen von Hirn- und Rückenmarkstumoren auf Grundlage ihrer histologischen und molekularpathologischen Merkmale. Die Klassifikation bietet einen weltweit gültigen, einheitlichen Rahmen für multidisziplinäre und/oder internationale Teams, um diagnostische Prozesse zu standardisieren, neue Therapieansätze zu erforschen und wissenschaftlich basierte Behandlungsentscheidungen treffen zu können. Um neue wissenschaftliche Erkenntnisse und Fortschritte der Forschung zu berücksichtigen, findet eine regelmäßige Aktualisierung der Klassifikation statt, zuletzt im September 2021 mit der 5. Ausgabe der WHO-Klassifikation von Tumoren des ZNS.

Die ursprüngliche Zellart eines Tumors, sein histologisches Erscheinungsbild, molekulare Parameter und das klinische Verhalten bilden die Basis des Klassifikationssystems, welche eine Einteilung von ZNS-Tumoren in verschiedene Hauptgruppen erlaubt. Einige der Kategorien lauten: Neuroepitheliale Tumoren (z.B. Astrozytom (A), Oligodendrogliom (OD), Ependymom), embryonale Tumoren (z.B. Medulloblastom), Tumore der Hirn- und Rückenmarksnerven (z.B. Schwannom, Neurofibrom), Tumoren der Hirnhäute (z.B. Meningeom), aber auch im ZNS entstehende Lymphome, Keimzelltumoren und weitere. Die jeweiligen Hauptgruppen können noch in Untergruppen und Dignitätsgrade unterteilt werden, je nach Erscheinungsbild, molekularen Merkmalen und Verhalten (Bale und Rosenblum, 2022; Louis et al., 2021).

1.2 Neuroepitheliale Tumoren

Die neuroepithelialen Tumoren haben ihren Ursprung in den Neuroepithelzellen des ZNS. Normalerweise fungieren diese Zellen als Vorläuferzellen, die sich während der Entwicklung des Gehirns und Rückenmarks bilden und das Neuralrohr mit auskleiden.

In Abhängigkeit von spezifischen Differenzierungsmerkmalen, die auch die histologischen Eigenschaften eines Tumors maßgeblich mitbestimmen, gliedert die WHO-Klassifikation die Tumoren in Untergruppen. So lässt sich die große Untergruppe der glialen Tumoren weiter unterteilen in astrozytär, oligodendroglial und ependymal differenzierte Tumoren.

Die neuropathologische Diagnosestellung basiert auf dem histologischen Erscheinungsbild und etablierter molekularbiologischer Parameter und erfordert im Allgemeinen eine Kombination von Histologie, Immunhistochemie (IHC) und (epi-)genetischen Untersuchungen unter Berücksichtigung von klinischen Angaben zum Alter, dem Geschlecht eines Patienten, der Lokalisation des Tumors und seinen Eigenschaften in der neuroradiologischen Bildgebung (z.B. Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT)).

1.2.1 Astrozytäre Tumoren

Astrozytäre Tumore entstehen aus astrozytären Vorläuferzellen. Astrozyten gehören zu den Gliazellen des Gehirns, welche unter anderem eine Stützfunktion des Gewebes erfüllen und an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind.

Für die Diagnosestellung ist die neuropathologische Untersuchung von Gewebeproben entscheidend. Das histologische Erscheinungsbild eines Astrozytoms wird dabei hinsichtlich des Infiltrationsverhaltens, der Merkmale der nukleären Atypie, der Proliferationsrate, der Nekrotisierungstendenz und der Gefäßneubildung beurteilt. Die IHC dient zur Identifizierung von spezifischen Proteinen oder Markern in Tumorzellen (z.B. saures Gliafaserprotein (engl. *Glial fibrillary acidic protein*, GFAP)), um den astrozytären Ursprung zu ermitteln. Auch molekulare Marker, in Form von genetischen Veränderungen, helfen bei der Diagnosefindung. Anhand von Kriterien wie Kernatypien, Mitoserate und Infiltrationsverhalten wird der Dignitätsgrad eingeteilt, in niedriggradig (ZNS WHO Grad 1 und 2) oder hochgradig (ZNS WHO Grad 3 und 4). Mittlerweile können auch genomische, genetische und epigenetische Analysen eingesetzt werden, um Tumoren zu diagnostizieren, z.B. durch Identifizierung einer Isocitrat-Dehydrogenase (IDH)-Mutation (Mut) (Louis et al., 2016; Wesseling und Capper, 2018).

1.2.2 Oligodendrogliale Tumoren

Diffus infiltrierend wachsende Gliome mit einer oligodendroglialen Differenzierung bezeichnet man als Oligodendrogliome.

Histologisch kennzeichnen sich diese Tumoren durch runde Zellkerne mit perinukleären Halos und einem typischen Netzwerk kleiner Kapillaren (engl. „*Chicken wire capillaries*“) aus. Zudem sind kleinherdige Verkalkungen für Oligodendrogliome zwar typisch, wenn auch nicht pathognomonisch. In der IHC findet sich eine perinukleär betonte Markierung mit Antikörpern gegen das neurale Antigen MAP-2c (Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2c), eine nukleäre Olig-2-Expression (engl. *Oligodendrocyte transcription factor*, Oligodendrozyten Transkriptionsfaktor), eine erhaltene ATRX-Expression (engl. *Mental retardation syndrome x-linked*) in den Tumorzellkernen und typischerweise eine Immunnegativität für GFAP und das Intermediärfilament Vimentin. Eine nennenswerte nukleäre Akkumulation von p53-Protein ist bei Oligodendrogliomen nicht zu finden. Definitionsgemäß gehört zu den zu identifizierenden genetischen Veränderungen der Nachweis einer Mutation an den Mutationshotspots der Gene *IDH-1* und *IDH-2* (Codon R132 beziehungsweise (bzw.) R172) sowie ein kombinierter und vollständiger Verlust der Chromosomenarme 1p und 19q. Im Gegensatz zu den astrozytären Tumoren lassen sich oligodendrogliale Tumoren zwar ebenfalls in niedrig- und hochgradige Tumoren einteilen, jedoch existiert für Oligodendrogliome kein ZNS WHO Grad 4 (Louis et al., 2007 und 2016).

1.2.3 Mischgliome

Nach der WHO-Klassifikation vor 2016 stellten sogenannte (sog.) Mischgliome Hirntumore dar, die histologisch sowohl astrozytäre als auch oligodendrogliale Differenzierungszeichen aufwiesen. Die entsprechenden Komponenten wurden dabei entweder separat nebeneinander oder untermischt vorkommend beschrieben. Zu dieser Gruppe zählten auch die Oligoastrozytome (OA). Allerdings ist dieser Tumortyp seit der revidierten Auflage der WHO-Klassifikation von 2016 nicht mehr existent, da mithilfe der molekularen Aufarbeitung eine sichere Unterscheidungsmöglichkeit zwischen einer

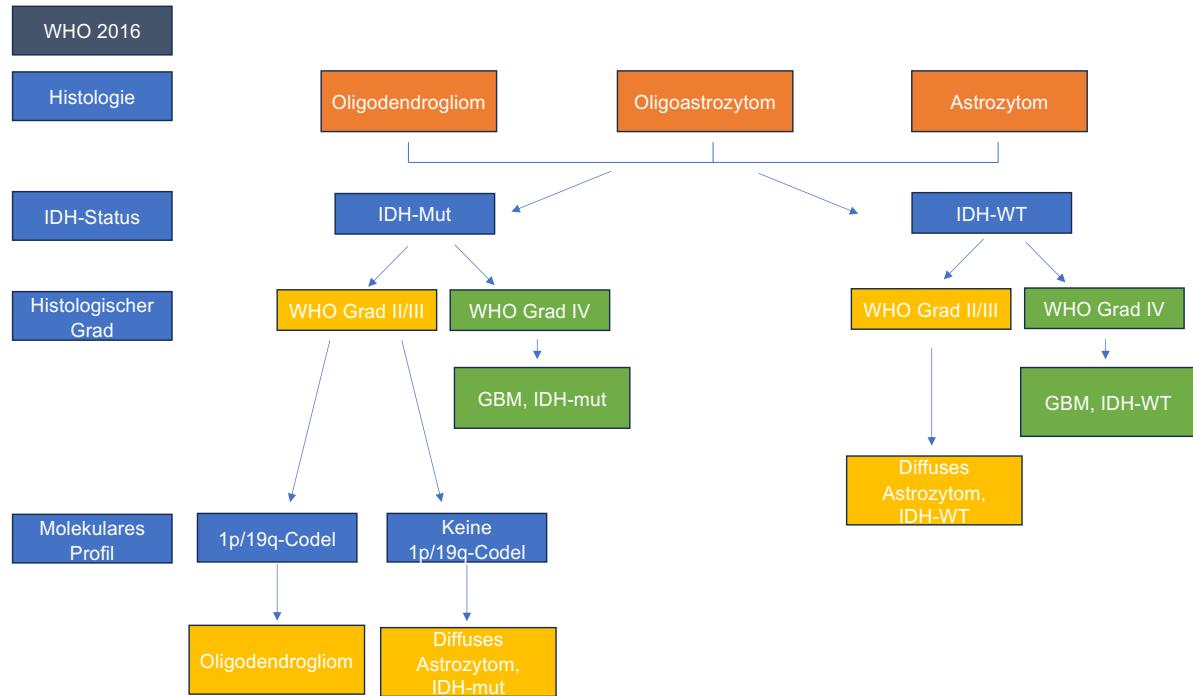
astrozytären und einer oligodendroglialen Differenzierung definiert wurde (Louis et al., 2021; Sahm et al., 2014). Dies hat die neuropathologische Routinediagnostik und die klinische Einschätzung der Prognose bei erwachsenen Patient*innen mit diffus infiltrierenden Gliomen präzisiert.

1.3 Neuropathologische Diagnostik diffuser Gliome bei Erwachsenen und Kindern

Gemäß der WHO-Klassifikation der Tumoren des ZNS wurden 2007 diffus infiltrierende Gliome anhand ihres histologischen Erscheinungsbildes definiert. Seit 2016 erfolgt die Diagnose dieser Tumoren nicht mehr nur anhand ihrer Histologie, sondern auch über etablierte molekulare Parameter, deren Bestimmung für eine WHO-konforme Diagnose nun obligat ist.

Die Diagnose eines niedriggradigen Oligodendroglioms oder eines anaplastischen Oligodendroglioms (AO) geht einher mit einer molekularpathologischen Analyse des Allelstatus der chromosomal Regionen 1p und 19q sowie des Mutationsstatus der Gene *IDH-1* und *-2*. Falls die entsprechenden molekularen Untersuchungen nicht durchgeführt werden können, kann die Diagnose (A)O, NOS (engl. *Not otherwise specified*, nicht anderweitig spezifiziert) gemäß der 2021 WHO-Klassifikation gestellt werden. Zudem wurden zur Gradierung weitere molekulare Parameter herangezogen, wodurch eine Präzisierung des Gradierungssystems erreicht wurde. Daraus ergibt sich in der Routinediagnostik ein Untersuchungsalgorithmus, der grafisch in Abbildung (Abb.) 1, im Vergleich der verschiedenen Auflagen der WHO-Klassifikationen von 2016 und 2021, dargestellt ist.

a)



b)

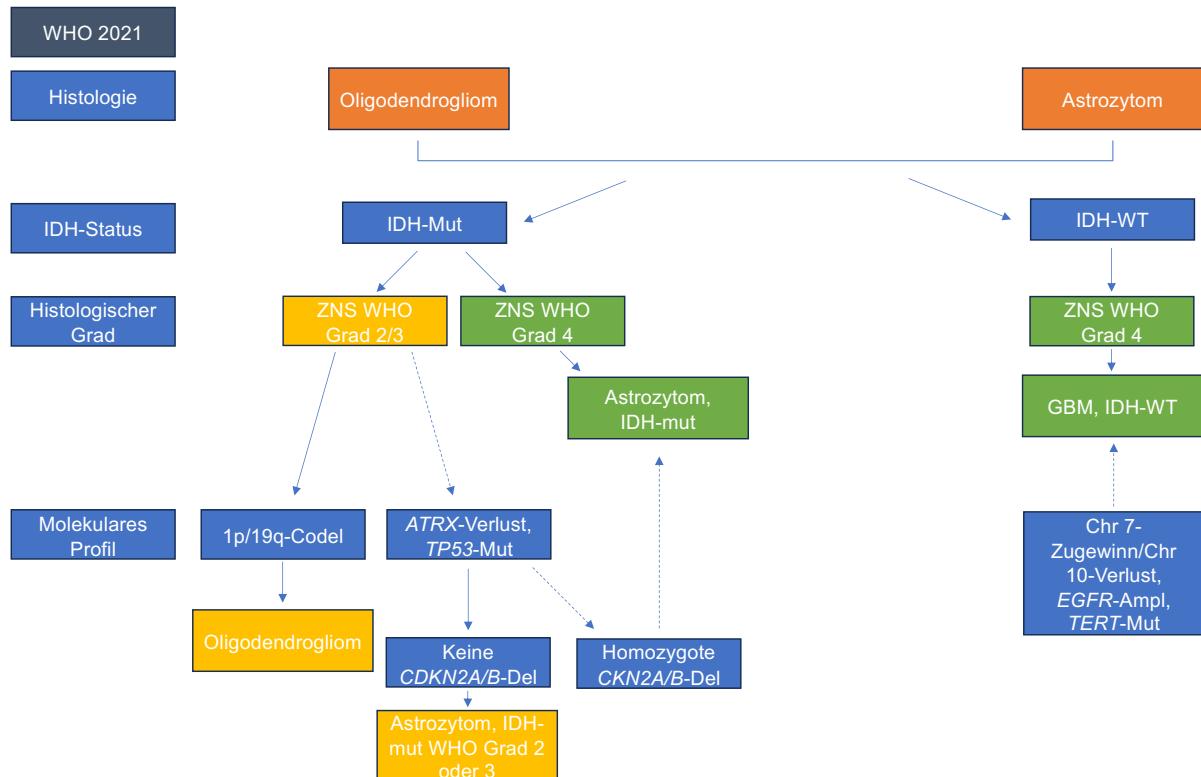


Abb. 1: Diagnostischer Algorithmus diffuser Gliome: vereinfachte Darstellung der Algorithmen zur Diagnosefindung diffuser Gliome nach der WHO-Klassifikation von

Tumoren des ZNS von 2016 (Abb. 1 a) und nach 2021 (Abb. 1 b) bei Erwachsenen. Die Änderungen des Algorithmus von 2016 gegenüber 2021 sind in der Abb. 1 b mit gestrichelten Pfeilen dargestellt (modifiziert nach Gritsch et al., 2022). Neben der Histologie spielt das molekulare Profil eine wichtige Rolle bei der Diagnosestellung. Beide diagnostischen Ebenen, Histologie und Molekularbiologie, müssen in Zusammenschau betrachtet werden, um eine sog. „integrierte Diagnose“ zu bilden.

Die Diagnose Oligodendrogiom, IDH-mutiert (mut), 1p/19q-codeletiert (codel) wird jedoch ganz überwiegend bei Erwachsenen oder älteren Jugendlichen gestellt, da IDH-Mutationen bei Kindern insgesamt sehr selten sind. Der oben gezeigte diagnostische Algorithmus ist daher in pädiatrischen (päd.) Patient*innen nur zum sicheren Ausschluss eines Oligodendrogioms vom Erwachsenentyp anwendbar.

Für oligodendroglial erscheinende Tumoren bei Kindern ohne Nachweis einer IDH-Mutation und ohne 1p/19q-Codeletion (Codel), ist die neuropathologische Diagnosestellung dieser Fälle aufgrund der zahlreichen Differentialdiagnosen schwierig bzw. nicht eindeutig.

Im Laufe der Zeit wurden zwar adulte und pädiatrische Oligodendrogiome unterschieden (Bax et al., 2010; Paugh et al., 2010; Rodriguez et al., 2014), aber zu oligodendroglial differenzierten Tumoren bei Kindern liegen weiterhin nur wenige Daten vor (Jones et al., 2017; Mackay et al., 2017), die sich zudem vor allem auf niedriggradige, d.h. ZNS WHO Grad 2 Tumoren beziehen (Buccoliero et al., 2022; Lee et al., 2018; Li et al., 2018). Die prognostische Bedeutung anaplastischer Veränderungen bei diesen Tumoren ist völlig unbekannt.

1.4 Mögliche Differentialdiagnosen

Bereits in den ersten Auflagen der WHO-Klassifikationen der ZNS-Tumoren wurde eine oligodendrogiomähnliche Histologie bei unterschiedlichen glialen und glioneuronalen Tumorentitäten beschrieben, wodurch verschiedene Differentialdiagnosen bei der Diagnosestellung berücksichtigt werden müssen. Eine sichere Unterscheidung

entsprechender Tumortypen ist auf histologischer Ebene alleine nicht möglich, in der Regel sind daher weiterführende molekularpathologische Untersuchungen erforderlich. Beispielhaft für Tumoren mit oligodendroglialem Erscheinungsbild seien das pilozytische Astrozytom (PA), der diffuse leptomeningeale glioneuronale Tumor (engl. *Diffuse leptomeningeal glioneuronal tumor*, DLGNT) oder der diffuse glioneuronale Tumor mit oligodendrogiomähnlichen Merkmalen und Kernclustern (engl. *Diffuse glioneuronal tumor with oligodendrogioma-like features and nuclear clusters*, DGONC) erwähnt.

Zudem wurden in der 2021 WHO-Klassifikation pädiatrische Typen diffuser Gliome definiert, zu deren Diagnosestellung auch methylierungsbasierte Untersuchungen erforderlich sind. Dazu zählt vorrangig das diffuse hochgradige Gliom vom pädiatrischen Typ, H3- und IDH-Wildtyp (WT).

1.5 Wissenschaftliche Fragestellung

In meinem Projekt habe ich 26 pädiatrische Patient*innen mit der Diagnose eines hochgradigen diffusen Glioms, in dem zuvor eine oligodendrogliale Differenzierung beschrieben wurde und die in die HIT-GBM- und HIT-HGG-Studien aufgenommen wurden, identifiziert, molekular analysiert und gemäß der aktuellen 5. Auflage der WHO-Klassifikation von Tumoren des ZNS 2021 neu klassifiziert. Hiermit soll der Frage nachgegangen werden, ob ein eigenständiger Tumortyp eines pädiatrischen Oligodendrogioms existiert und dieser über die Identifikation wiederkehrender Merkmale definiert werden kann.

2. Material und Methoden

2.1 Auswahl der Patient*innen und Tumorproben

In den deutschen HIT-GBM- und HIT-HGG-Studien ließen sich 34 Patient*innen mit der Diagnose hochgradiger oligodendroglialer und gemischter oligoastrozytärer Gliome (WHO Grad III) sowie eines Glioblastoms mit oligodendroglialer Komponente (WHO Grad IV) gemäß der 2007 und 2016 veröffentlichten WHO-Klassifikation der Tumoren des ZNS zu meiner Untersuchungskohorte zusammenstellen (Louis et al., 2007; 2016; Wesseling und Capper, 2018).

Die Tumorproben wurden aus dem Archiv des Instituts für Neuropathologie des Universitätsklinikums Bonn und dem Deutschen Hirntumor-Referenzzentrum der Deutschen Gesellschaft für Neuropathologie und Neuroanatomie (DGNN) entnommen. Außerdem erhielten wir auf unsere projektbezogene Anfrage Proben von 17 weiteren neuropathologischen Instituten in Deutschland.

Vier Fälle konnten aufgrund fehlender Materialzusendung nicht untersucht werden, weitere vier Fälle wurden wegen einer früheren Bestrahlung (strahlungsinduziertes Gliom, engl. *Radiation-induced gliomas*, RIG) ausgeschlossen. Für drei Fälle waren lediglich gefärbte Schnittpräparate verfügbar, die histologisch reevaluiert wurden. Die verbliebenen 23 Fälle wurden histologisch und molekularpathologisch reanalysiert.

Die Aufarbeitung der Tumorproben erfolgte mit Einverständnis im Rahmen des Studieneinschlusses in die genannten klinischen Studien und gemäß des Ethikvotums des Universitätsklinikums Bonn (Aktenzeichen: 158/21).

Die Untersuchungen fanden nach den rechtlichen Vorgaben der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztekongresses (1983) statt.

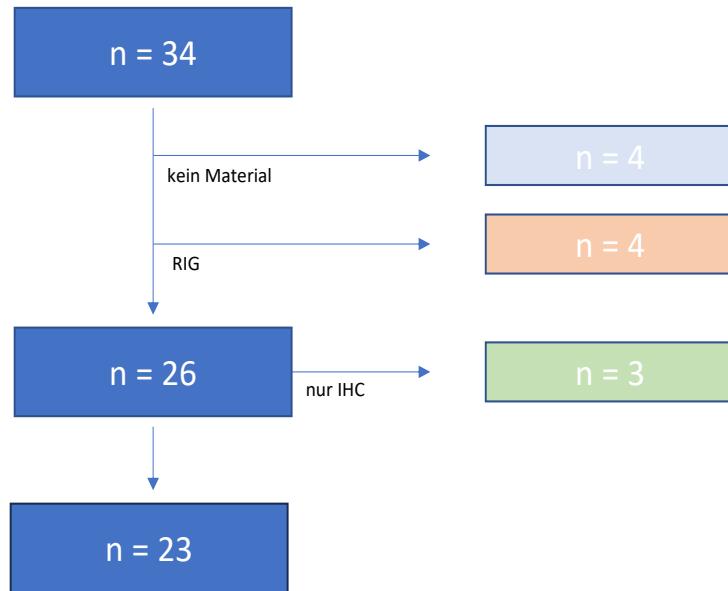


Abb. 2: Auswahl der Fälle und Tumorproben: Von den initial 34 möglichen Fällen mussten nach intensiver Begutachtung acht Fälle aus dem Projekt ausgeschlossen werden. Bei drei Fällen fehlte das Material zu weiterführenden, molekularpathologischen Untersuchungen, weswegen diese Fälle histologisch reanalysiert wurden. 23 Fälle konnten je nach Menge und Qualität des vorhandenen Tumormaterials erneut untersucht werden.

2.2 Immunhistochemische Analyse

Die IHC dient dazu, spezifische Antigene bzw. die Expression von Proteinen in Gewebeproben nachzuweisen. Durch die spezifische Bindungsreaktion von Antikörpern mit den entsprechenden Zielantigenen können gezielt Moleküle oder Strukturen, z.B. in Tumorzellen, markiert werden.

Mittels immunhistochemischer Untersuchungen können zelluläre Bestandteile nachgewiesen und so unterschiedliche Zelltypen differenziert werden. So können z.B. gliale Zellen in astrozytäre oder oligodendrogliale Zelltypen differenziert und ihre Verteilung innerhalb eines Gewebes dargestellt werden. Dies findet auch in der Hirntumordiagnostik Einsatz, da durch das Vorhandensein oder Fehlen von Markerproteinen bestimmte Tumortypen identifiziert und voneinander unterschieden werden können (Cogliati et al., 2016).

Die hier dargestellten immunhistochemischen Analysen wurden mit dem Ventana Benchmark XT Immunostainer (Roche Ventana, Darmstadt, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt (Gielen et al., 2015). Die dabei verwendeten Antikörper sind im Folgenden in Tabelle (Tab.) 1 zusammengefasst.

Tab. 1: Verwendete Antikörper für immunhistochemische Untersuchungen

Antikörper	Hersteller	Spezies	Klon	Verdünnung
ATRX	Sigma Life Science, St. Louis, MO, USA	Maus	monoklonal CL0537	1:50
BRAF (V600E)	Roche Ventana, Roche Diagnostics Deutschland, Penzberg, Deutschland	Maus	monoklonal VE1	ready-to-use vom Hersteller
EGFR	Agilent Dako, Santa Clara, CA, USA	Kaninchen	monoklonal E30	1:100
EMA	Agilent Dako, Santa Clara, CA, USA	Maus	monoklonal E29	1:25
EZH1P	Sigma Life Science, St. Louis, MO, USA	Kaninchen	polyklonal	1:75
Histon H3 (K27M)	Millipore Sigma /Merck Darmstadt, Deutschland	Kaninchen	monoklonal RM192	1:2.000
IDH-1 (R132H)	Dianova Hamburg, Deutschland	Maus	monoklonal H09	1:200
Map2c	Sigma Life Science, St. Louis, MO, USA	Maus	monoklonal HM-2	1:20.000
MIB-1 (Ki67)	Dianova Hamburg, Deutschland	Maus	monoklonal Ki-67P	1:1.000
MLH-1	Bio SB, Santa Barbara, CA, USA	Maus	monoklonal G168-728	1:20

MSH-2	Cell Marque / Merck Darmstadt, Deutschland	Maus	monoklonal G219-1129	1:200
MSH-6	Cell Marque / Merck Darmstadt, Deutschland	Maus	monoklonal 44	1:50
NeuN	Chemicon®, Sigma Aldrich / Merck Darmstadt, Deutschland	Maus	monoklonal A60	1:200
Olig-2	Cell Marque / Merck Darmstadt, Deutschland	Kaninchen	monoklonal EP112	ready-to-use vom Hersteller
p53	Agilent Dako, Santa Clara, CA, USA	Maus	monoklonal DO-7	1:150
PDGFR alpha	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA	Kaninchen	monoklonal SC-338	1:1.000
phospho- Histon 3	Biocare Medical, Pacheco, CA, USA	Kaninchen	polyklonal	1:100
PMS-2	Cell Marque / Merck Darmstadt, Deutschland	Maus	monoklonal MRQ-28	1:50
S-100	Agilent Dako, Santa Clara, CA, USA	Kaninchen	polyklonal	1:4.000
Synaptophysin	Agilent Dako, Santa Clara, CA, USA	Maus	monoklonal DAK-Synap	1:50
Trimethyl- Histon 3 K27	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	Kaninchen	monoklonal C36B11	1:100
Vimentin	Agilent Dako, Santa Clara, CA, USA	Maus	monoklonal V09	1:1.000

2.3 DNA- und RNA-Extraktion

Für die Extraktion von genomicscher Tumor-DNA aus FFPE-Material (Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettet) wurden handelsübliche Kits gemäß Herstellerinformation verwendet. Zur DNA-Isolierung wurde das QIAamp DNA Mini Tissue Kit (Qiagen GmbH, Düsseldorf, Deutschland) verwendet, zur RNA-Extraktion das RNeasy FFPE-Kit von Qiagen. Im Folgenden werden die einzelnen Aufreinigungsschritte kurz dargestellt.

Im ersten Schritt wird repräsentatives Tumorgewebe teils durch Mikrodissektion vorselektiert. Im zweiten Schritt wird eine Proteinase K verwendet, die Proteine denaturiert und inaktiviert.

Im Anschluss daran wird eine Pufferlösung zur Stabilisierung und zum Schutz der DNA- bzw. RNA-Moleküle zugefügt. Durch die Zugabe von Ethanol oder anderen Präzipitationsreagenzien wird die DNA von der RNA und anderen Bestandteilen getrennt und gewaschen und kann dann für verschiedene Analyseverfahren genutzt werden (Tan und Yiap, 2009). Zur Bestimmung der Qualität und Quantität der DNA wurde die fluorometrische Messung Qubit (Thermo Fisher) verwendet, für die RNA-Auswertung das NanoDrop 2000-Gerät (Thermo Fisher) (Falkenstein et al., 2020).

2.4 Pyrosequenzierungsanalyse der Mutationshotspots der Gene *IDH-1/-2* und der Promotorregion des *TERT*-Gens

Zur Ermittlung spezifischer struktureller DNA-Veränderungen, hier pathologische Sequenzvarianten in Mutationshotspots, wird die Pyrosequenzierung eingesetzt. Zunächst werden die Zielgene mit spezifischen Primern mittels Polymerasekettenreaktion (engl. *Polymerase chain reaction*, PCR) amplifiziert. Um einen Einzelstrang für die Sequenzierung zu erhalten, wird einer der Primer mit einem Biotin-Molekül markiert. Durch ein Aufreinigungssystem (z.B. Vacuumstation, Biotage) werden PCR-Komponenten und der nicht-biotinylierten Strang entfernt.

Für die Sequenzierung wird ein Primer verwendet, der nahe der Zielstelle im PCR-Produkt bindet. In der Sequenzierungsreaktion werden spezifische Nukleotide hinzugefügt, um Sequenzvarianten zu detektieren. Die Pyrosequenzierung basiert auf der DNA-Synthese

durch DNA-Polymerase, die Adenosintriphosphat (ATP) aus Pyrophosphat (PPi) produziert, welches durch Sulfurylase und Adenosinphosphosulfat (APS) in ATP umgewandelt wird. ATP wird dann durch Luciferase in Licht umgewandelt, wobei die Intensität des Signals der Anzahl der eingebauten Nukleotide entspricht. Vor der Zugabe des nächsten Nukleotids baut das Enzym Apyrase die freien Nukleotide ab. Auf diese Weise können die Anteile von Wildtyp- und Mutanten-Allel in der Probe quantitativ bestimmt und mit Kontrollwerten verglichen werden.

Mit Hilfe von PSQ Vacuum Prep Tool, Vacuum Prep Worktable (Biotage, Uppsala, Schweden), PyroGold Reagenzien (Biotage) auf dem Pyromark Q24 Instrument (Biotage) und mit Streptavidin-beschichteten Sepharose-Hochleistungsperlen (GE Healthcare, Uppsala, Schweden), wie in der Bedienungsanleitung des Herstellers beschrieben (Falkenstein et al., 2020), wurden die immobilisierten einzelsträngigen DNA-Vorlagen für 2 Minuten bei 80 °C inkubiert und an 0,4 mM Sequenzierprimer bei Raumtemperatur angehängt (Gielen et al., 2015).

2.5 Multiplex-Ligations-abhängige Sondenamplifikation

Die Multiplex-Ligations-abhängige Sondenamplifikation (engl. *Multiplex ligation-dependent probe amplification*, MLPA) ist dafür geeignet, gleichzeitig mehrere Zielgene oder -regionen im DNA- oder RNA-Molekül zu amplifizieren und zu detektieren sowie einen Überblick über das Kopienzahlprofil des Tumorgenoms zu erhalten. Im Rahmen meiner Untersuchungen wurden dabei insbesondere die Chromosomenarme 1p und 19q auf eine mögliche Codeletion untersucht.

Das Prinzip der Methode basiert auf der Hybridisierung von Sonden, die spezifisch an die Zielregion binden. Die Sonden bestehen aus zwei Teilen, ein Teil bindet an das zu amplifizierende Zielmolekül und ein Teil an einem allgemeinen Primer-Bindungsort. Wenn beide Sonden an ihr Ziel binden, kann ein Ligationselement zwischen den Sonden eingefügt werden und eine gezielte Amplifikation der Zielregion stattfinden.

Im Anschluss an die Amplifikation erfolgt die Zuordnung der Zielregionen durch Auf trennung mittels Gelelektrophorese hinsichtlich der Fragmentlänge. So können z.B. genetische Veränderungen oder Mutationen identifiziert werden (Stuppia et al., 2012).

Für die Durchführung wurde der SALSA MLPA P088 Probemix (MRC Holland, Amsterdam, Niederlande) gemäß den Vorgaben der Herstelleranleitung verwendet. Zusammenfassend dargestellt wurden 100 ng genomische Tumor-DNA für 5 Minuten erhitzt, dadurch denaturiert und anschließend abgekühlt. Die Hybridisierung der Sonden an die Tumor-DNA fand bei 60 °C für 16 Stunden statt. Anschließend wurde in einem Volumen von 50 µL, welches 10 µL des Ligationsmixes enthielt, in einem Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) eine PCR durchgeführt und ein LIZ®-markierter interner Größenstandard zu den Proben hinzugefügt. Auf einem ABI3730-Kapillarsequenzer wurden die Fragmente getrennt, quantifiziert und mit der GeneMapper-Software (Applied Bioscience) analysiert.

Der Assay wurde gegen normales Kleinhirngewebe (FFPE-Material) normalisiert.

2.6 Analyse der DNA-Methylierung

Der 850k-Methylierungsarray ist eine epigenetische Analysemethode der DNA-Methylierung. Er ermöglicht die Untersuchung der Methylierung an über 850.000 CpG-Standorten innerhalb eines (Tumor-)Genoms.

Die Methylierung eines neben einem Guanin gelegenen Cytosins (CpG) stellt eine Modifikation dar und kann für eine veränderte Genexpression verantwortlich sein, da z.B. Gene für Transkriptionsfaktoren und andere regulatorische Proteine nicht mehr zur Verfügung stehen.

Die Untersuchung ermöglicht es, genomweite Veränderungen hinsichtlich ihrer Methylierungsmuster zu identifizieren oder Unterschiede in diesen Methylierungsmustern zwischen Geweben oder Zelltypen zu ermitteln. Dies kann dazu beitragen die diagnostische Genauigkeit, z.B. bei der Diagnose pädiatrischer Hirntumoren zu erhöhen (Sturm et al., 2023).

Um Veränderungen in der DNA-Methylierung festzustellen, wurde eine Bisulfit-Behandlung zur Umwandlung von 250-500 ng DNA verwendet, die mit dem Infinium Human Methylation EPIC (850k) Array gemäß der Beschreibung des Herstellers analysiert wurde.

Die aus dem Array gewonnenen Daten wurden mit dem Heidelberg Methylation Brain Tumor Classifier, Version v11b4 (www.molecularneuropathology.org), analysiert. Dieser Klassifikator basiert auf überwachtem maschinellem Lernen (Capper et al., 2018). Mit den Versionen v12.3 und v12.5 wurden die Rohdatensätze erneut berechnet.

Gleichzeitig wurden die Array-Daten mit > 15.500 Methylom-Datensätzen aus dem Spektrum menschlicher Neoplasien und Kontrollgewebe durch eine nicht-stochastische Visualisierungsmethodik in Form von Dimensionsreduktion mit *Uniform manifold approximation and projection* (UMAP)-Plots (www.epidip.org, v. 4.2 GPU, 25.000 top differentiell methylierte CpGs) verglichen (Zschernack et al., 2021).

2.7 DNA-Sequenzierung mittels *Next-generation-sequencing*

Mithilfe der *Next-generation-sequencing* (NGS)-Methode wurde die isolierte genomische Tumor-DNA sequenziert. Die DNA-Bibliotheken wurden aus 200 ng FFPE-DNA mit der AmpliSeq® for Illumina Targeted Resequencing-Technologie mit 1074 kundenspezifischen Amplikons generiert. Diese Amplikons deckten 27 Gene oder Hotspots ab, die in Gliomen häufig mutiert sind. Gereinigte und normalisierte Bibliotheken wurden gepoolt und anschließend auf einem MiSeq-System (Illumina) mit dem Reagenzienkit v3 (AmpliSeq® for Illumina) sequenziert. Die Ausrichtung der *reads*, das Varianten-Calling und die Annotation erfolgten mit dem BWA-Software-Paket (engl. *Burrows-Wheeler-Aligner*) und dem somatischen Varianten-Caller unter Verwendung der BaseSpace DNA Amplicon v2.1.1-Anwendung und der Datenanalyse-Software Illumina MiSeq Reporter und Variant Studio v3.0 (Illumina). Die Filterung und Auswahl der Varianten erfolgte manuell mithilfe der Software Illumina Variant Studio v3.0 (Illumina) und Integrative Genomics Viewer v.2.3.68 (Broad Institute, USA).

2.8 Molekularer Inversionssonden-Test

Mithilfe des Molekularen Inversionssonden-Test (engl. *Molecular inversion probes*, MIP) können duale Genotypisierungen und Kopienzahlanalysen in Gewebeproben

durchgeführt werden, hierfür werden auf bestimmte genetische Sequenzen ausgerichtete Inversionssonden eingesetzt (Ji und Welch, 2009).

Der MIP-Assay wurde verwendet, um Kopienzahlgewinne und -verluste in hoher Auflösung zu ermitteln.

Die Methode wurde gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Der Assay umfasste etwa 330.000 Inversionssonden (Oncoscan; Thermo Fisher, Santa Clara, CA). Für die Analyse der MIP-Rohdaten wurde die Software Nexus Copy Number 8.0 Discovery Edition (BioDiscovery, El Segundo, CA) verwendet.

2.9 RNA-Fusionsanalyse mittels Nanostring

Mithilfe der Nanostring-Methode können genetische Veränderungen auf RNA-Ebene identifiziert werden. Es werden so z.B. Fusionstranskripte zwischen verschiedenen DNA-Sequenzen (Genabschnitten) nachgewiesen, die durch strukturelle Veränderungen im Genom entstehen. Die Untersuchung beruht auf mikroskopischer Analyse fluoreszenzcodierter Sonden. Hiermit ist es möglich, eine große Anzahl von Genen in einer Probe gleichzeitig zu messen. Durch Sonden, die spezifisch an Fusionsstellen der RNA binden, können Fusionen in der RNA erkannt und quantifiziert werden (Class et al., 2023).

Die Fusionsanalyse wurde ebenfalls wie in der Beschreibung des Herstellers angegeben durchgeführt.

100 ng aus FFPE-Material isolierter RNA wurde in Hybridisierungspuffer zum nCounter Elements TagSet gegeben und inkubiert (20 Stunden bei 67 °C). Anschließend erfolgte die Aufarbeitung und das Scannen der Proben bzw. Kartuschen auf der nCounter Präparationsstation und dem nCounter Digital Analyzer.

Die rohen Nanostring-Zählungen wurden anhand der Zählungen für Haushaltsgene normalisiert. Die normalisierten Daten wurden dann vom Hintergrundrauschen subtrahiert (Falkenstein et al., 2020).

Das Panel umfasst 135 analysierbare Fusionen, die tabellarisch in Tab. 2 aufgelistet sind.

Tab. 2: Analysierbare Gene und Fusionstranskripte im verwendeten Nanostring-Assay

<i>AXIN2</i>	<i>USP39</i>	<i>KIAA1549-BRAF</i> (ex15/11)
<i>BCOR</i> _duplication	<i>WIF1</i>	<i>KIAA1549-BRAF</i> (ex15/9)
<i>BCOR</i> _ex13-14	<i>AFAP1-NTRK2</i> (14/10)	<i>KIAA1549-BRAF</i> (ex16/11)
<i>BEND2</i>	<i>AGBL4-NTRK2</i> (6/16)	<i>KIAA1549-BRAF</i> (ex16/9)
<i>DKK4</i>	<i>BCAN/NTRK1</i> (13/16)	<i>KIAA1549-BRAF</i> (ex17/10)
<i>EGFL11</i>	<i>BCAN-NTRK1</i> (13/10)	<i>KIAA1549-BRAF</i> (ex18/10)
<i>EMX2</i>	<i>BCAS1-BRAF</i> (11/10)	<i>KIAA1549-BRAF</i> (ex19/9)
<i>EOMES</i>	<i>BTBD1-NTRK3</i> (4/14)	<i>KTN1-ALK</i> (43/20)
<i>FOXR2</i>	<i>C11ORF95-RelA</i> (2/2)	<i>MACF1-BRAF</i> (14/8)
<i>GABRA5</i>	<i>C11ORF95-RelA</i> (2/3)	<i>MACF1-BRAF</i> (15/8)
<i>GLI1</i>	<i>C11ORF95-RelA</i> (3/2)	<i>MKRN1-BRAF</i> (4/9)
<i>HHIP</i>	<i>C11ORF95-RelA</i> (3/3)	<i>MKRN1-BRAF</i> (4/11)
<i>IMPG2</i>	<i>CCDC88A-ALK</i> (12/20)	<i>MYB-QKI</i> (11/5)
<i>KCNA1</i>	<i>CEP85L-ROS1</i> (8/36)	<i>MYB-QKI</i> (15/5)
<i>KIF26A</i>	<i>C1C/DUX4</i> (18/1)	<i>MYB-QKI</i> (9/5)
<i>LIN28</i>	<i>C1C/DUX4</i> (19/2)	<i>NAB2-STAT6</i> (3/2) variant III
<i>MUC1</i>	<i>C1C/DUX4</i> (20/1)	<i>NAB2-STAT6</i> (4/2)
<i>MYC</i>	<i>C1C/DUX4</i> (20/1)_1	<i>NAB2-STAT6</i> (7/2) variant IIa
<i>MYCN</i>	<i>C1C/DUX4</i> (20/1)_2	<i>NAB2-STAT6</i> (7/2) variant IIb
<i>NGFR</i>	<i>C1C/DUX4</i> (20/2)	<i>NAB2-STAT6</i> (7/2) variant IV
<i>NKX2-1</i>	<i>CLCN6-BRAF</i> (2/11)	<i>NACC2-NTRK2</i> (4/13)
<i>NPR3</i>	<i>CLIP2-MET</i> (12/15)	<i>NACC2-NTRK2</i> (4/5)
<i>NRL</i>	<i>EGFRVIII</i> deletion exon 2-7	<i>NACC2-NTRK2</i> (5/11)
<i>NUTM1</i>	<i>EGFR-SEPT14</i> (24/10)	<i>NFASC-NTRK1</i> (21/9)

<i>OLIG2</i>	<i>ETV6-NTRK3</i> (5/14)	<i>PPP1CB-ALK</i> (5/20)
<i>OTX2</i>	<i>EWSR1-Fli</i> (10/5)	<i>PTPRZ1-MET</i> (1/2)
<i>P2RX3</i>	<i>EWSR1-Fli</i> (10/6)	<i>PTPRZ1-MET</i> (2/2)
<i>PDLIM3</i>	<i>EWSR1-Fli</i> (7/5)	<i>PTPRZ1-MET</i> (8/2)
<i>PPP2R2C</i>	<i>EWSR1-Fli</i> (7/6)	<i>PVT1-MYC</i> (3/2)
<i>RELA</i>	<i>EWSR1-Fli</i> (7/7)	<i>PVT1-NDRG1</i> (1/10)
<i>RET</i>	<i>EWSR1-PATZ1</i> (9/1)	<i>QKI-NTRK2</i> (6/16)
<i>RPH3A</i>	<i>FAM131B-BRAF</i> (ex1/10)	<i>QKI-RAF1</i> (2/9)
<i>SFRP1</i>	<i>FAM131B-BRAF</i> (ex2/9)	<i>RNF130-BRAF</i> (3/9)
<i>SHROOM2</i>	<i>FAM131B-BRAF</i> (ex3/9)	<i>SLC44A1-PRKCA</i> (15/9)
<i>SMARCB1</i>	<i>FGFR1-TACC1</i> (17/7)	<i>SQSTM1-NTRK2</i> (5/17)
<i>SPHK1</i>	<i>FGFR3-ELAVL3</i> (17/2)	<i>SRGAP3-RAF1</i> (12/13)
<i>TNC</i>	<i>FGFR3-TACC3</i> (17/10)	<i>STRN3-NTRK2</i> (7/16)
<i>TTYH1_3p-1</i>	<i>FGFR3-TACC3</i> (17/11)	<i>TFG-MET</i> (5/15)
<i>TTYH1_3p-2</i>	<i>FGFR3-TACC3</i> (17/4)	<i>TMEM106B-BRAF</i> (6/8)
<i>TTYH1_3p-3</i>	<i>FGFR3-TACC3</i> (17/6)	<i>TPM3-NTRK1</i> (7/9)
<i>TTYH1_5p-1</i>	<i>FGFR3-TACC3</i> (17/8)	<i>VCL-NTRK2</i> (16/10)
<i>TTYH1_5p-2</i>	<i>FXR1-BRAF</i> (12/11)	<i>WNK2-NTRK2</i> (24/16)
<i>TTYH1_5p-3</i>	<i>FXR1-BRAF</i> (13/11)	<i>YAP1-FAM118B</i> (7/3)
<i>UBE2D2</i>	<i>GGA2-PRKCB</i> (5/3)	<i>YAP1-MAMLD1</i> (5/3)
<i>UNC5D</i>	<i>GNAL1-BRAF</i> (1/10)	<i>YAP1-MAMLD1</i> (6/2)

2.10 RNA-Panel-Sequenzierung

Die RNA-Panel-Sequenzierung dient zur Analyse des Transkriptoms einer Zelle oder eines Gewebes auf Ebene der RNA-Moleküle, die zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer bestimmten Zelle vorhanden sind (Hong et al., 2020).

Die gezielte RNA-Sequenzierung wurde mit dem TruSight RNA Fusion Panel (Illumina, San Diego, CA, USA) durchgeführt.

100 ng isolierte RNA wurden für die Herstellung der Bibliotheken verwendet, die mit biotinmarkierten Sonden hybridisiert wurden. Diese Sonden sind spezifisch für die Ziel-RNA. Zum Einfangen und zur magnetischen Anreicherung der Zielsequenzen wurden Streptavidin-Beads hinzugefügt. Die Clustergenerierung und Sequenzierung wurde dann mit dem MiSeq-System (Illumina) durchgeführt. Nach Konversion des Dateiformates wurde die Analyse auf der Illumina-Plattform BaseSpace unter Verwendung des RNA-Seq Alignment v2.0.1 durchgeführt (Zschernack et al., 2021).

2.11 UMAP

UMAP ist eine Dimensionalitätsreduktionstechnik, die in der Datenanalyse verwendet und für die Datenvisualisierung, Clusteranalyse und explorative Datenanalyse eingesetzt wird. Das Ziel ist es, hochdimensionale Daten in einen niedrigdimensionalen Raum (meistens 2D oder 3D) einzubetten, während die Beziehungen und lokale Struktur der Datenpunkte erhalten bleiben. Es ähnelt dem Zweck von *T-distributed stochastic neighbor embedding* (t-SNE), hat aber einige Vorteile in Bezug auf Geschwindigkeit und Skalierbarkeit.

Der Algorithmus konstruiert eine topologische Darstellung dieser hochdimensionalen Daten, optimiert eine niedrigdimensionale Anordnung und approximiert die Darstellung. Das Konzept „*fuzzy simplicial sets*“ wird genutzt, um die Konnektivität und die Entfernung zwischen den Datenpunkten zu messen und anschließend nach einer niedrigdimensionalen Anordnung zu suchen, die die Minimierung der Diskrepanz zwischen der hoch- und niedrigdimensionalen Darstellung möglichst gering hält (Becht et al., 2018).

3. Ergebnisse

3.1 Klinische und histopathologische Merkmale

Im Rahmen der deutschen HIT-GBM-B- bis HIT-GBM-D- sowie der HIT-HGG-2007-Studien konnten von ca. 1600 Patient*innen mit der Diagnose eines diffusen hochgradigen Glioms (engl. *High-grade glioma*, HGG), 34 Patient*innen, im Alter von 21 Monaten bis 18,3 Jahren, identifiziert werden, in deren HGG, basierend auf den jeweiligen WHO-Klassifikationen von 2007 und 2016, eine oligodendrogliale Differenzierung zumindest einer Tumorkomponente detektiert wurde (AO WHO Grad III, AOA WHO Grad III oder Glioblastoma multiforme (GBM) WHO Grad IV mit oligodendroglialer Komponente).

Vier Patient*innen (Fall Nr. 6, 11, 28 und 31) wurden aufgrund einer vorherigen Bestrahlung eines nicht-glialen Primärtumors ausgeschlossen, da davon auszugehen ist, dass eine Vergleichbarkeit genomicscher und genetischer Informationen dieser Fälle mit der übrigen Kohorte nicht gegeben ist.

Weitere vier Patient*innen (Fall Nr. 14, 16, 20 und 32) konnten wegen fehlender Informations- und Materialübermittlung nicht untersucht werden. Diese Fälle wurden entsprechend aus der Kohorte ausgeschlossen.

In vier Fällen (Fall Nr. 10, 21, 23 und 27) wurde das Gewebematerial des Rezidivtumors analysiert, da die Tumorqualität und/oder -quantität des Primärtumors keine Analysen zuließ, drei Fälle wurden anhand morphologischer und immunhistochemischer Merkmale neu bewertet (Fall Nr. 7, 12 und 33). Die übrigen 23 Tumorproben standen für weiterführende molekulare Untersuchungen zur Verfügung (s. Abb. 2: Auswahl der Fälle und Tumorproben).

Die Kohorte von 26 pädiatrischen hochgradigen Gliomen, die für eine neuropathologische Neubewertung in Frage kamen, umfasste 17 männliche und 9 weibliche Patient*innen mit einem mittleren Alter bei der Diagnosestellung von 10,86 Jahren (Spanne: 21 Monate bis 18,3 Jahre). Es gab 2 Patient*innen im Alter von 0-3 Jahren, 8 Patient*innen im Alter von 4-9 Jahren und 16 Patient*innen älter als 10 Jahre, wie in Tab. 3 dargestellt.

Tab. 3: Überblick über klinische Merkmale und Tumorlokalisierungen sowie WHO-Gradierung der initialen Kohorte

	Insgesamt n = 26 (%)
Klinische Merkmale	
<u>Geschlecht</u>	
Weiblich	9 (35 %)
Männlich	17 (65 %)
<u>Alter</u>	
0-3 Jahre	2 (8 %)
4-9 Jahre	8 (31 %)
> 10 Jahre	16 (62 %)
Tumoreigenschaften	
<u>Lokalisation</u>	
Supratentoriell	22 (85 %)
Infratentoriell	1 (4 %)
Spinal	2 (8 %)
Mittellinienbeteiligung	8 (31 %)
<u>Tumograd</u>	
WHO Grad III	25 (96 %)
WHO Grad IV	1 (4 %)

Es wurden n = 22 supratentorielle hemisphärische Tumoren, n = 1 infratentorieller Tumor (Fall Nr. 26) und n = 2 Tumoren mit spinaler Lokalisation (Fälle Nr. 13 und Nr. 23) gefunden. Bei n = 1 blieb die Tumorlokalisierung, trotz intensiver Recherchebemühungen in klinischen und neuroradiologischen Datenbanken, unbekannt (Fall Nr. 34).

N = 8 Tumoren hatten ihren Ursprung in Strukturen der Mittellinie (Thalamus, 3. und 4. Ventrikel oder Rückenmark).

Im nachfolgenden zeigt Abb. 3 eine grafische Übersicht über die Lokalisationen der untersuchten Tumoren.

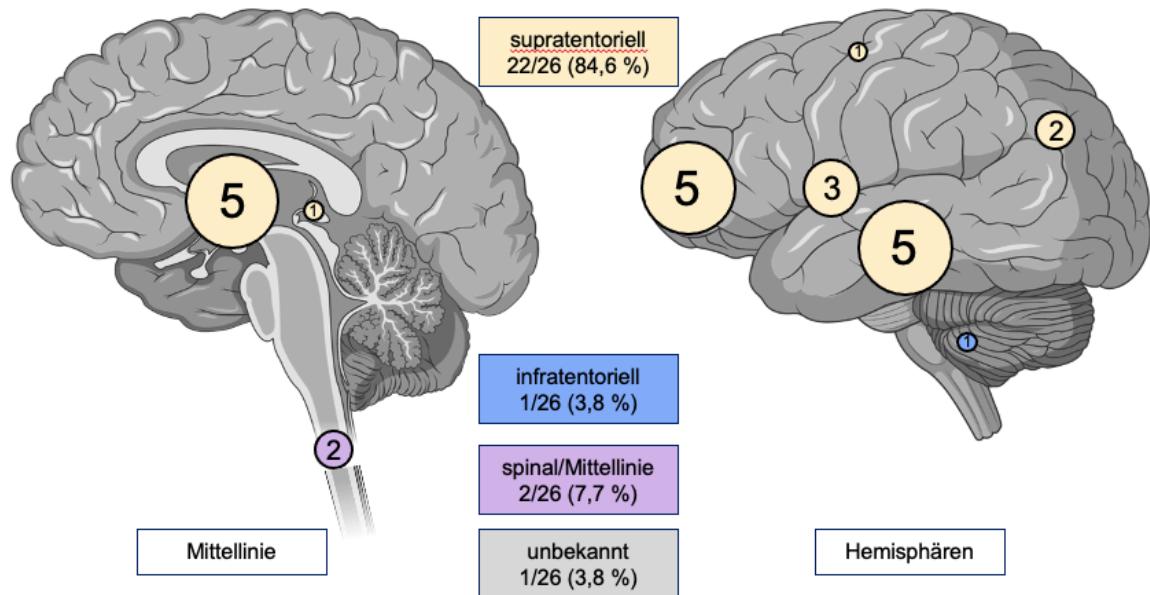


Abb. 3: Lokalisationen der untersuchten Tumoren: Die rechte Grafik stellt die Lokalisation von supra- und infratentoriellen Tumoren dar. N = 5 Tumoren befanden sich frontal, n = 5 temporal, n = 3 frontotemporal, n = 2 parieto-occipital. Bei n = 1 beschränkte sich die Information auf „supratentoriell“, wie auch bei n = 1 auf „hintere Schädelgrube“. In der linken Grafik sind die Fälle dargestellt, die spinal (n = 2) lagen und bei denen zusätzlich eine Mittellinienbeteiligung beschrieben wurde. Die spinalen Tumoren lagen intramedullär auf Höhe der mittleren bzw. unteren Brust- und Lendenwirbelsäule. Die supratentoriellen Tumoren mit Mittellinienbeteiligung wurden überwiegend (n = 5) im Thalamus, aber auch n = 1 im 3. Ventrikel gefunden.

Die mikroskopische Reevaluation der histologischen Merkmale anhand von Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Schnittpräparaten ergab in allen untersuchten Proben ein typisches oligodendrogliales Erscheinungsbild in zumindest einer Teilmenge der Tumorzellpopulationen.

In Abb. 4 sind repräsentative Bilder verschiedener Fälle aus meiner Kohorte dargestellt, die die morphologischen Ähnlichkeiten der untersuchten Proben im HE-Schnitt hervorheben und dadurch die Herausforderung, eine rein morphologische Unterteilung vorzunehmen, veranschaulichen.

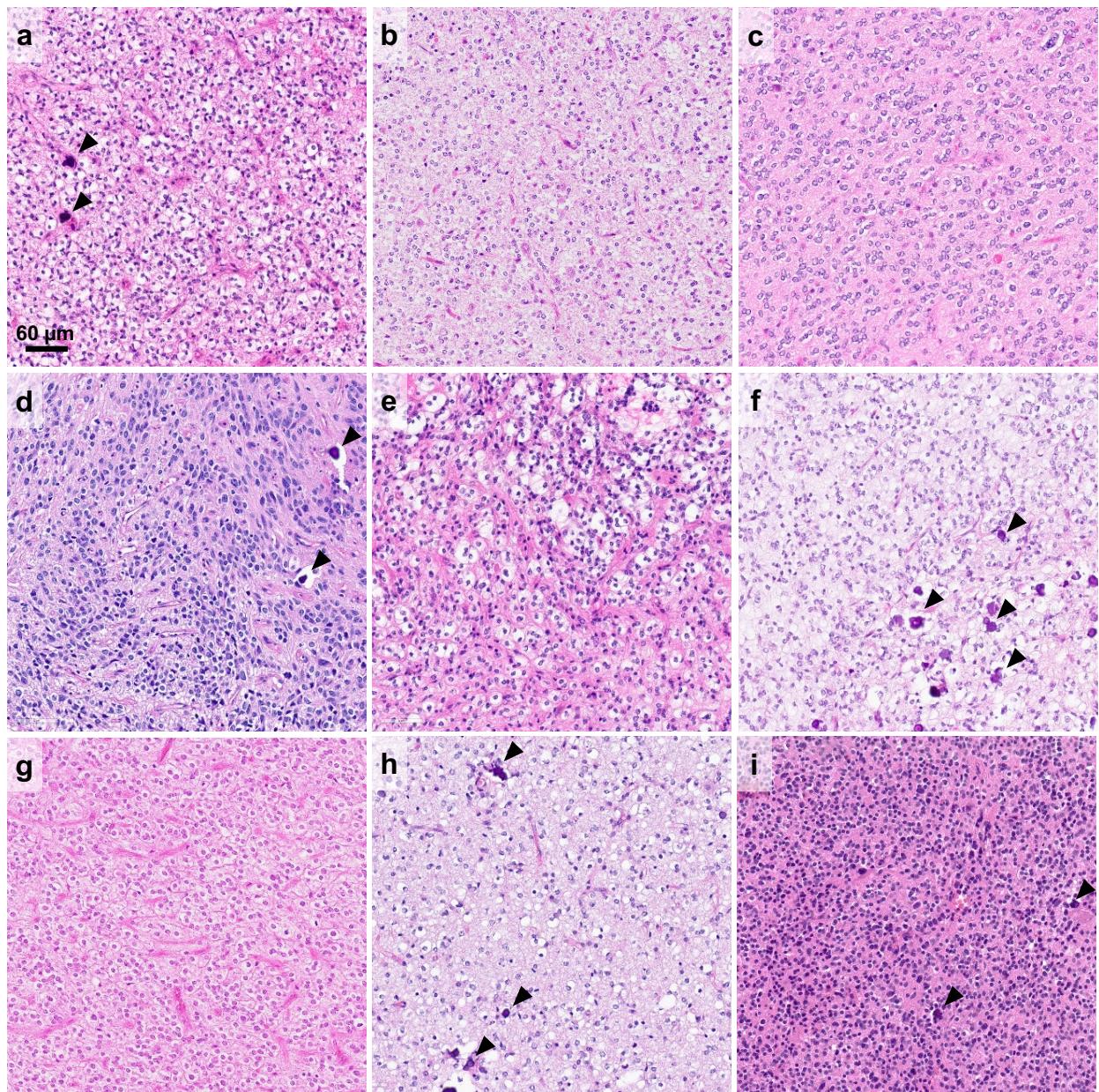


Abb. 4: Auswahl histologischer Bilder in HE: Eine oligoide Histomorphologie mit Kapillargefäßen, Verkalkungen (Pfeile) und Wabenstruktur bei verschiedenen Differentialdiagnosen: OD, IDH-mut, 1p/19q-codel ZNS WHO Grad 3 (a, Fall Nr. 2); DNT, komplexe Variante ZNS WHO Grad 1 (b, Fall Nr. 10); malignes diffuses Gliom H3- und IDH-WT, NOS (c, Fall Nr. 8); supratentorielles Ependymom, ZFTA-Fusion positiv ZNS WHO Grad 3 (d, Fall Nr. 29); DLGNT analog ZNS WHO Grad 3 (e, Fall Nr. 13); PA ZNS WHO Grad 1 (f, Fall Nr. 5); malignes diffuses Gliom, NOS (g, Fall Nr. 9; h, Fall Nr. 1); und malignes diffuses Gliom, IDH-WT, NOS (Fall Nr. 4).

Eine erhöhte mitotische Aktivität, mikrovaskuläre Proliferate (n = 9) und nekrotisierte Tumoreale (n = 3) wurden als Merkmale der Anaplasie bzw. der Malignität auf der Grundlage der diagnostischen Kriterien der verschiedenen Auflagen der WHO-Klassifikation betrachtet.

3.2 Reevaluation der Diagnosen nach der aktuellen WHO-Klassifikation 2021

3.2.1 Bestätigung der Diagnose bei Nachweis einer oligodendroglialen Differenzierung

3.2.1.1 Oligodendrogiom, IDH-mutiert, 1p/19q-codeletiert ZNS WHO Grad 3 (Fall Nr. 2)

Mikroskopisch zeigten die Tumorzellen eine oligoide Zytomorphologie mit runden Zellkernen, die sich durch einen perinukleären Halo auswiesen. Zudem ließen sich vermehrte Mitosen nachweisen. Immunhistochemisch konnte eine nukleäre Immunpositivität für den glialen Transkriptionsfaktor Olig-2 nachgewiesen werden. Mit Antikörpern gegen GFAP zeigte sich eine überwiegend diffuse Anfärbung der Gewebematrix. Eine eindeutige Fortsatzausprägung der Tumorzellzytoplasmata ließ sich insbesondere in einer Vimentin-Immunhistologie nicht erkennen (s. Abb. 5).

Die DNA-Methylierungsanalyse ergab eine signifikante Übereinstimmung mit der hinterlegten Methylierungsklasse „Oligodendrogiom, IDH-mutiert, 1p/19q-codeletiert“ (kalibrierter Score 0,98). Das abgeleitete Kopienzahlprofil zeigte einen kombinierten und vollständigen Verlust der chromosomal Regionen 1p und 19q. Die 1p/19q-Codeletion bestätigte sich zudem in einer überlappend durchgeföhrten MLPA-Untersuchung sowie mittels MIP-Analyse. Der aus den DNA-Methylierungsdaten abgeleitete *MGMT* (O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase)-Promotor Methylierungsstatus zeigte einen hypermethylierten *MGMT*-Promotor. Die DNA-basierte Panel-Untersuchung wies Mutationen der Gene *IDH-1* (p.R132H) und *KRAS* (p.G12C) sowie in der Promotorregion des *TERT*-Gens (C228T) (engl. *Telomerase-reverse-transcriptase*, Telomerase Reverse Transcriptase) nach.

Somit konnte bei diesem 16 Jahre alten Patienten sowohl mikroskopisch als auch auf molekularer Ebene das Vorliegen eines Oligodendroglioms eindeutig nachgewiesen werden.



Abb. 5: Histologie von Fall Nr. 2 (Diagnose: OD, IDH-mut, 1p/19q-codel ZNS WHO Grad 3). Das HE-gefärbte Schnittpräparat (a) zeigt einen zelldichten, glialen Tumor mit kleinen Verkalkungen. Die Tumorzellen besitzen einen typischen oligoiden Aspekt mit perinukleären Höfen, wodurch ein sog. Honigwabenmuster entsteht. Mit Antikörpern gegen Map2c findet sich eine perinukleäre Immunpositivität (b). Vimentin-positive Fortsätze werden im Tumorgewebe nicht detektiert; es markieren sich Gefäßendothelzellen, das Tumorgewebe selbst ist vollständig negativ (c). Der Größenmaßstab entspricht 20 µm.

3.2.1.2 Malignes diffuses Gliom, IDH-mutiert, dualer Phänotyp (Fall Nr. 24)

Das Tumorgewebe dieses 17 Jahre alten Patienten zeigte ein diffus infiltrierend wachsendes, malignes Gliom mit einer immunhistochemisch nachgewiesenem *IDH-1*- (R132H)-Mutation. Interessanterweise konnten zwei unterschiedlich differenzierte, nebeneinander vorliegende Tumorkomponenten identifiziert werden. Zum einen fand sich eine GFAP-positive, astrozytär differenzierte Tumorkomponente mit einem Verlust der nukleären Expression von ATRX sowie einer auffälligen p53-Akkumulation in den Tumorzellkernen. Zum anderen ließ sich eine GFAP- und Vimentin-negative, oligodendroglial differenzierte Tumorkomponente nachweisen, in der sich keine p53-Akkumulation, jedoch eine erhaltene ATRX-Expression darstellte. Nach Mikrodissektion und getrennter molekularer Analyse der beiden separierten Tumorkomponenten bestätigte sich eine erhaltene Kopienzahl der Chromosomenarme 1p und 19q in der astrozytären Komponente, wohingegen die oligodendrogliale Komponente einen vollständigen und kombinierten Verlust dieser chromosomalen Abschnitte aufwies. Auch

die Zuordnung zu der jeweiligen Methylierungsklasse bestätigte das Vorliegen eines echten Mischglioms vom sog. „dualen Phänotyp“.

Die DNA-Methylierungsanalyse ergab einen hypermethylierten *MGMT*-Promotor.

3.2.2 Änderung der Diagnose bei Nachweis einer vorrangig astrozytären Differenzierung

Insbesondere in der Gruppe der oligoastrozytären Mischgliome (n = 1 GBM mit oligodendroglialer Komponente, n = 20 AOA) zeigte sich bei der morpho-molekularen Diagnostik eine Diagnoseänderung zugunsten vorrangig astrozytär differenzierter Tumoren. Dies legt den Schluss nahe, dass die Diagnose in der WHO-Klassifikation vor 2021 einer oligodendroglialen Differenzierung in zumindest einer Subpopulation der Tumorzellen aufgrund histo- und zytomorphologischer Merkmale begründet war. Im Einzelnen können folgende Neueinordnungen nach der WHO-Klassifikation von 2021 vorgenommen werden.

3.2.2.1 Hochgradige Astrozytome

3.2.2.1.1 Astrozytom, IDH-mutiert ZNS WHO Grad 4 (Fall Nr. 34)

In den Schnittpräparaten zum Fall Nr. 34 zeigte sich immunhistochemisch eine Positivität für GFAP und mutantes IDH-1-(R132H)-Protein. Der Verlust der nukleären ATRX-Expression und eine pathologische Akkumulation von p53-Protein in über 80 % der Zellkerne sind typische Merkmale IDH-mutierter Astrozytome, die bei oligodendroglialer Differenzierung nicht vorkommen. Der Nachweis von Gefäßproliferaten in den konventionell-histologischen Schnittpräparaten führte zur Gradierung des Tumors als ZNS WHO Grad 4 Tumor.

3.2.2.1.2 GBM, päd. RTK-1-Typ (Subtyp B und C) ZNS WHO Grad 4 (Fälle Nr. 3 und Nr. 18)

Histologisch zeigten die Präparate der beiden, in DNA-Methylierungsanalysen als Glioblastom vom pädiatrischen Typ reklassifizierten Fälle, ein malignes, gliales Tumorgewebe mit Nekrosen mit einer Pseudopalisadenstellung vitaler Tumorzellen sowie in Fall Nr. 18 auch mit pathologischen Gefäßproliferaten. In der IHC zeigte sich zwar eine Positivität für GFAP, hingegen eine Negativität der Tumorzellen für Vimentin, mutantes IDH-1-(R132H)-Protein und p53-Protein. In der Pyrosequenzierung wurden bei Fall Nr. 18 Wildtypsequenzen für die Mutationshotspotregionen (R132 bzw. R172) der Gene *IDH-1* und *IDH-2* und für Fall Nr. 3 eine Wildtypsequenz für die Promotorregion des *TERT*-Gens ermittelt. Diese Befunde sprechen gegen eine oligodendrogliale Differenzierung. In Einklang mit diesen Ergebnissen ließ sich auch keine 1p/19q-Codeletion in diesen Fällen nachweisen. In der MLPA-Untersuchung zeigte Fall Nr. 18 Hinweise auf eine Deletion des Chromosoms 1p, aber einen intakten Chromosomenarm 19q, wenngleich im MIP-Assay keine eindeutige Kopienzahlaberration. Hingegen konnte für Fall Nr. 3 im MIP-Assay ein Verlust von Chromosom 1p festgestellt werden.

3.2.2.2 Niedriggradige Astrozytome

PA ZNS WHO Grad 1 (Fälle Nr. 5 und Nr. 17) und

PA mit erhöhter proliferativer und mitotischer Aktivität ZNS WHO Grad 1 (Fall Nr. 23)

Histologisch konnten bei allen drei Fällen Rosenthal-Fasern und eosinophile Granulkörperchen identifiziert werden, zudem fanden sich vaskuläre Proliferate. Immunhistochemisch ließ sich eine teils fortsatzbezogene Map2c-Positivität nachweisen. Die MIB-1-Proliferationsindices (engl. *Made in Borstel*) erwiesen sich mit 5-10 % proliferationsaktiver Zellen als allenfalls leichtgradig erhöht. Eine nukleäre Akkumulation von p53-Protein lag in allen drei Fällen nicht vor. Eine DNA-Panel-NGS-Analyse ergab für die genomische DNA aus Fall Nr. 5 einen IDH-Wildtypstatus, jedoch ließen sich zwei verschiedene *FGFR1*-Mutationen (engl. *Fibroblast growth factor receptor*, Fibroblasten-

Wachstumsfaktor-Rezeptor) (p.K687E und p.D683G) nachweisen. Mittels Pyrosequenzierungen fanden sich bei Fall Nr. 17 ein Wildtypstatus für die *TERT*-Promotorregion und bei Fall Nr. 23 ein Wildtypstatus für *IDH-1/-2* und den *TERT*-Promotor, jedoch gelang der Nachweis einer MAPK-Signalweg-Alteration (engl. *Mitogen-activated protein kinase*, Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinasen) durch eine *FGFR3* (Exon 16)::*FASN* (Exon9)-*in frame*-Fusion im NGS-RNA-Fusions-Panel (Lesetiefe ca. 2,7 Mio. reads; 15 split reads).

Eine weiterführende molekulare Untersuchung mittels MIP-Assay, der für Fall Nr. 5 möglich war, zeigte zusätzlich ein stabiles Kopienzahlprofil ohne nennenswerte chromosomale Zugewinne oder Verluste.

Drei der untersuchten Tumoren erwiesen sich im Rahmen der Reklassifikation als pilozytische Astrozytome. Die erhobenen histologischen, immunhistochemischen und molekularen Befunde erwiesen sich in dieser Hinsicht als konklusiv.

3.2.3 Änderung der Diagnose bei Nachweis einer glioneuronalen Differenzierung

In insgesamt vier Fällen ließen sich neben einer glialen auch eine neuronale Differenzierung innerhalb des Tumorgewebes nachweisen. Dabei ergab sich dreimal die Diagnose eines DLGNT, von denen zwei Fälle (Fall Nr. 13 und Nr. 26) aufgrund ihrer gesteigerten mitotischen Aktivität als eher höhergradig einzuschätzen sind. Es ist dabei anzumerken, dass DLGNT in der aktuellen WHO-Klassifikation kein definitiver ZNS WHO Grad zugeteilt wird. Vielmehr können durch Korrelation mit klinischen Verlaufsdaten und die Zuordnung zu einer DLGNT-DNA-Methylierungssubklasse ein klinischer Verlauf angenommen werden, der eher einem ZNS WHO Grad 2 oder einem ZNS WHO Grad 3 Tumor entspricht. Ein weiterer DLGNT sowie ein DNT (ZNS WHO Grad 1) zeigten dagegen rückblickend keine zweifelsfrei gesteigerte mitotische Aktivität. Aufgrund einer für beide Tumortypen beschriebenen teils oligoiden Zytomorphologie innerhalb des Tumorgewebes ist mikroskopisch nachvollziehbar, dass die entsprechenden Präparate ohne umfangreiche immunhistologische und molekulare Aufarbeitung als Gliom mit oligodendroglialer Differenzierung interpretiert wurden. Im Einzelnen stellten sich die Untersuchungsergebnisse im Rahmen der Reklassifizierung folgendermaßen dar.

3.2.3.1 Höhergradige glioneuronale Tumoren

DLGNT, analog ZNS WHO Grad 3 (Fälle Nr. 26 und Nr. 13)

Im Rahmen der DNA-Methylierungsanalyse fand sich für Fall Nr. 26 der höchste, wenngleich nicht signifikante Score von 0,33 für die Methylierungsklasse eines DLGNT, Subtyp 2. Das daraus abgeleitete Kopienzahlprofil ließ Verluste von Chromosom 1p, 5 und 19 sowie Zugewinne im Bereich von Chromosom 1q und 8 erkennen. Allerdings konnte mittels Pyrosequenzierung ein Wildtypstatus für die Gene *IDH-1* und *IDH-2* sowie für die Promotorregion des *TERT*-Gens nachgewiesen werden. Möglicherweise gelang hier materialbedingt kein sicherer Nachweis von *KIAA1449::BRAF*-Fusionstranskripten (engl. *V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog*) (1 split read).

Im Fall Nr. 13 gelingt mittels DNA-Methylierungsanalyse eine eindeutige Zuordnung zur Methylierungsklasse der DLGNT (kalibrierter Score 0,99 (v11b4) sowie 0,998 für DLGNT, Subtyp 1 (v12.3)). Es zeigten sich Verluste im Bereich von Chromosom 1p (partiell) und 19 sowie Zugewinne von 1q und 7. Weiterhin konnten im Rahmen der molekularen Aufarbeitung eine *BRAF* (V600E)-Mutation (bei *IDH-1/-2*- und *TERT*-Promotor-WildtypdAllelen), jedoch keine *inframe*-Fusionstranskripte nachgewiesen werden.

Bei der anschließenden mikroskopischen Nachuntersuchung ließen sich die Tumorproben als DLGNT, analog zu ZNS WHO Grad 3 reklassifizieren, wenngleich die Zuordnung von Fall Nr. 13 zur Methylierungsklasse DLGNT, Subtyp 1 einen eher niedriggradigen Tumor nahelegt. Beide Tumoren wiesen jedoch einen Zugewinn von Chromosomenarm 1q auf, der mit einer schlechteren Prognose einherging.

3.2.3.2 Niedriggradige glioneuronale Tumoren

3.2.3.2.1 DLGNT, analog ZNS WHO Grad 2 (Fall Nr. 21)

Auch Fall Nr. 21 konnte als DLGNT reklassifiziert werden. Mittels Pyrosequenzierung zeigte das Tumorgewebe einen Wildtypstatus für die Gene *IDH-1* und *IDH-2*, wies jedoch bei Nachweis einer *FGFR1*-(p.K687E)-Mutation eine MAPK-Signalweg-Alteration auf.

Differentialdiagnostisch wurde zunächst das Vorliegen eines pilozytischen Astrozytoms erwogen, jedoch konnte im Rahmen der MIP-Untersuchung eine 1p/19q-Codeletion beobachtet werden. Die DNA-Methylierungsuntersuchung erbrachte nächstliegend materialbedingt keine verwertbaren Ergebnisse. Fusionstranskripte konnten nicht nachgewiesen werden. Bei fehlendem Nachweis einer signifikant gesteigerten proliferativen oder mitotischen Aktivität wurde diese Tumorprobe analog dem ZNS WHO Grad 2 zugeordnet.

3.2.3.2.2 DNT, komplexe Variante ZNS WHO Grad 1 (Fall Nr. 10)

Die Heidelberger Methylierungsklassifikation in der Version v12.3 erbrachte einen Hinweis auf eine Zuordnung dieses Tumors zu einem DNT mit einem hohen, wenn auch nicht signifikanten kalibrierten Score von 0,72. Das abgeleitete Kopienzahlprofil stellte sich ohne nennenswerte Aberrationen gänzlich flach dar. Fusionstranskripte konnten nicht nachgewiesen werden. Mikroskopisch zeigte sich insbesondere im Rezidivtumorgewebe das typische histologische Bild eines DNTs mit kräftig alzianophiler Matrix und sog. flottierenden Neuronen in der nachträglich durchgeföhrten NeuN Immunhistologie (engl. *Neuronal nuclei*, neuronale Zellkerne). Bei dem bei Erstdiagnose 2-jährigen Jungen wurde ein fokal über 5 % gesteigerter Ki67-Proliferationsindex bei der ursprünglichen Diagnosestellung mutmaßlich als anaplastische Veränderung fehlinterpretiert. Das Tumorgewebe lässt sich in Abschnitten nicht scharf von miterfasstem ZNS-Gewebe abgrenzen, so dass hier nächstliegend vom Vorliegen einer sog. „komplexen Variante“ eines DNT auszugehen ist.

3.2.4 Änderung der Diagnose durch Zuordnung zu neu definierten Tumortypen

3.2.4.1 DGONC (Fall Nr. 25 und Nr. 27)

Beim Tumortyp eines DGONC handelt es sich in der 2021 WHO-Klassifikation um einen provisorischen Tumortyp, für den eine eindeutige Zuordnung im DNA-Methylierungsprofil

diagnostisch zwingend notwendig ist. Im Rahmen der MNP2.0-Studie sowie der Reklassifizierung von Fällen aus der HIT-HGG-2007-Studienkohorte wiesen beide Fälle (Fall Nr. 25 und Nr. 27) eine entsprechende Zuordnung auf.

Der deskriptive Name dieses Tumortyps legt nahe, warum bei der ursprünglichen Diagnosestellung eines Oligodendroglioms alle Differenzierungen des jeweiligen Tumorgewebes angenommen wurden.

3.2.4.2 Supratentorielles Ependymom, ZFTA-Fusion positiv ZNS WHO Grad 3 (Fall Nr. 29)

In der histologischen Nachuntersuchung konnten für diesen Tumortyp charakteristische perivaskuläre Pseudorosetten der Tumorzellen um die intratumorale Blutgefäße herum gesehen werden. Die DNA-Methylierungsanalyse zeigte den höchsten, wenn auch nicht signifikanten Score von 0,51 (v11b4) für die Methylierungsklasse „Ependymom mit RELA-Fusion“. Zwar ließ sich wiederholt keine verwertbare *library* für die RNA-basierte Fusionsanalytik erzeugen, jedoch konnten immunhistochemisch p65-RelA-positive Tumorzellkerne nachgewiesen werden. Darüber hinaus wies das Tumorgewebe in Abschnitten eine GFAP-Positivität auf. Die ursprüngliche Einschätzung, dass hier eine oligodendrogliale Differenzierung vorliegt, beruht nach erneuter Betrachtung der Histologie möglicherweise auf einer teils hellzelligen Tumorzellmorphologie sowie ausgedehnten Mikroverkalkungen.

3.2.5 Nicht reklassifizierbare Tumoren

Bei insgesamt zwölf Fällen konnte trotz intensiver Bemühungen eine eindeutige Zuordnung zu einem der in der 2021 WHO-Klassifikation definierten Tumortypen materialbedingt nicht erzielt werden. Unter Berücksichtigung aller verfügbaren histologischen und molekularen (Teil-)Ergebnisse wurde die deskriptive Diagnose eines malignen, diffusen Glioms gestellt und um die Bezeichnung „*not otherwise specified*

3.2.5.1 Malignes diffuses Gliom, IDH-WT, NOS (Fälle Nr. 4 und Nr. 30) und malignes diffuses Gliom, H3- und IDH-WT (Fall Nr. 8)

Diese drei Fälle wiesen in der IHC eine erhaltene ATRX-Expression in den Tumorzellkernen, jedoch keine spezifische Immunreaktivität mit Antikörpern gegen mutantes IDH-1 (R132H) auf. Der IDH-Wildtypstatus wurde in den Fällen Nr. 4 und Nr. 30 mittels Pyrosequenzierung verifiziert, während Fall Nr. 8 einen Wildtypstatus für die Promotorregion des *TERT*-Gens sowie für die Histongene *H3F3A* und *Hist1H3B/C* aufwies. Eine eindeutige Zuordnung zu einer der im Heidelberger Methylierungsklassifikator hinterlegten Methylierungsklassen gelang nicht. Die Fälle Nr. 4 und 8 wurden zusätzlich mittels MIP-Assay untersucht und zeigten keine nennenswerten Kopienzahlaberrationen.

3.2.5.2 Malignes diffuses Gliom, NOS (Fälle Nr. 1, 7, 9, 12, 15, 19, 22, 27 und 33)

Das maligne diffuse Gliom, NOS, ist die am häufigsten gestellte Diagnose in neun Fällen. Die Tumorproben Nr. 7, 12 und 33 wurden anhand histologischer Merkmale dieser Gruppe zugeordnet. Die Histologie ergab für diese Fälle diffus in das umgebende Gewebe infiltrierende Tumorzellen, zytologische Atypien und erhöhte Ki67-Proliferationsindizes von 5-25 %.

Es zeigte sich bei der Reevaluation der vorhandenen oder nachträglich durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen eine nukleäre p53-Akkumulation in bis zu 50 % der Tumorzellen (Fall Nr. 9, 15, 33), was eine oligodendrogliale Differenzierung des Tumorgewebes unwahrscheinlich macht. Zudem fanden sich weitere Befundkonstellationen, wie der nukleäre Verlust von ATRX oder eine fortsatzbezogene Vimentinpositivität, die gegen eine vorrangig oligodendrogliale Differenzierung des jeweils untersuchten Tumors sprechen.

Bei der Pyrosequenzierung zeigten vier Fälle (Fall Nr. 9, 15, 22, 27) einen IDH-Wildtypstatus, Fall Nr. 9 zudem einen *TERT*-Promotor-Wildtyp. Dieser Fall wies ebenfalls vaskuläre Proliferationen und Nekrosen auf, eine Deletion von *CDKN2A/B* (Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 2A/B) und zeigte erhöhte Scores mit der Methylierungsklasse

„neuroepithelialer Tumor EP300_BCOR“, wenngleich eine immunhistochemische Darstellung einer BCOR-Positivität (engl. *B-cell lymphoma 6-protein*-Corepressor) nicht gelang. In der UMAP-Darstellung (Abb. 8) clustert dieser Tumor mit der Gruppe der ZNS-Tumoren mit interner BCOR-Tandem-Duplikation.

Zusätzlich wurden bei den Fällen Nr. 1, 15, 19, 22 im MIP-Assay keine nennenswerten Kopienzahlaberrationen festgestellt.

Nach den Untersuchungen und der Reklassifizierung, unter Berücksichtigung der WHO-Klassifikation von Tumoren des ZNS 2021, wurden die folgenden Diagnosen gestellt:

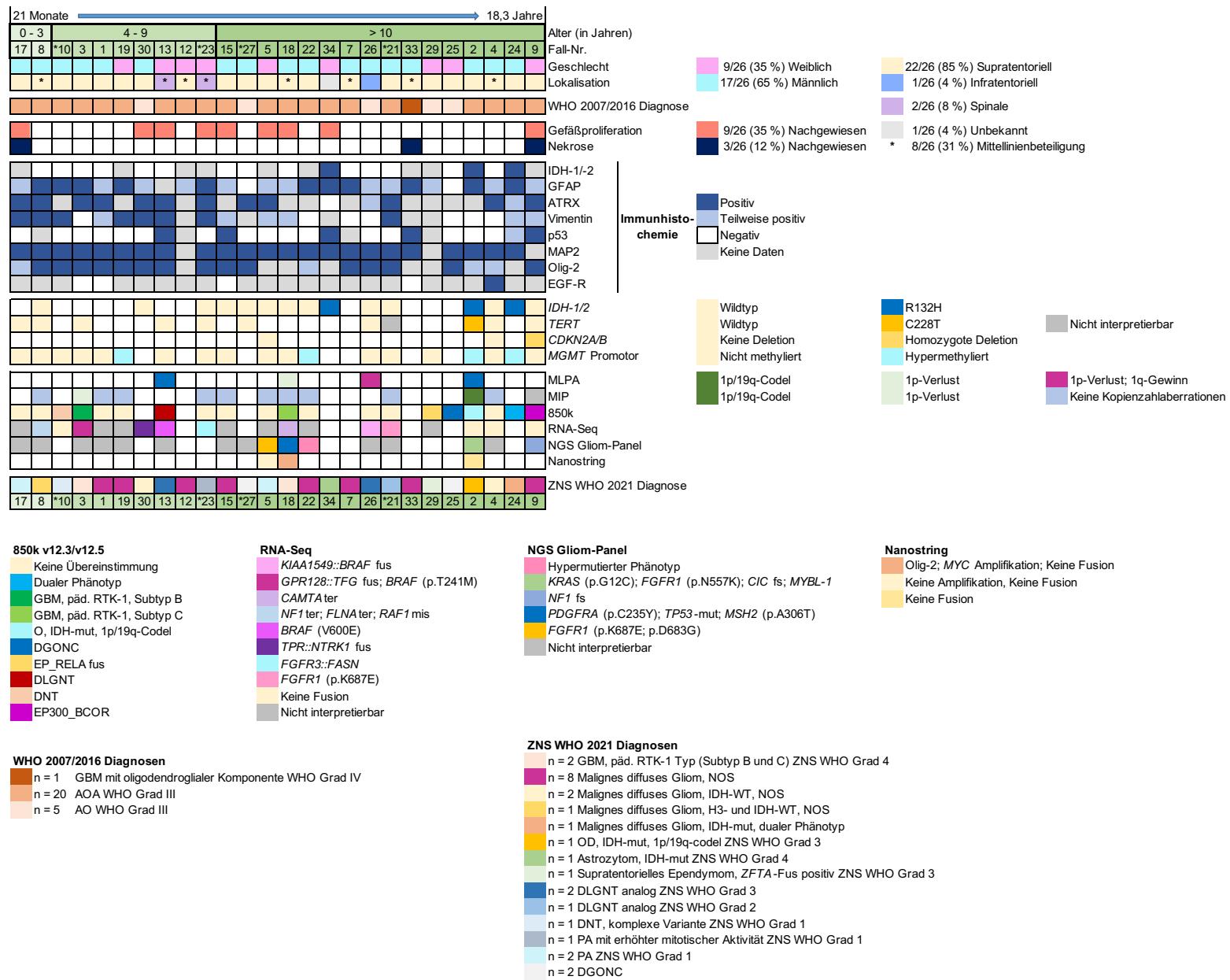
Tab. 4: Diagnosen nach der Reevaluation

Diagnosen	ZNS WHO Grad	Anzahl
DGONC		2
DNT komplexe Variante	1	1
PA	1	2
PA mit erhöhter proliferativer und mitotischer Aktivität	1	1
DLGNT	analog Grad 2	1
DLGNT	analog Grad 3	2
Supratentorielles Ependymom, ZFTA-Fus positiv	3	1
OD, IDH-mut, 1p/19q-codel	3	1
A, IDH-mut	4	1
Malignes diffuses Gliom, IDH-WT, NOS		2
Malignes diffuses Gliom, IDH-mut, dualer Phänotyp	4	1
Malignes diffuses Gliom, H3- und IDH-WT, NOS		1
Malignes diffuses Gliom, NOS		8
GBM, päd. RTK-1-Typ (Subtyp B)	4	1
GBM, päd. RTK-1-Typ (Subtyp C)	4	1

Zusammenfassend ergaben sich folgende Ergebnisse: DGONC bislang ohne abschließende Gradierung durch WHO-Klassifikation von 2021, n = 5 LGG (engl. *Low-grade glioma*, niedriggradiges Gliom; ZNS WHO Grad 1 und 2), n = 3 hochgradige, nicht HGG (ZNS WHO Grad 3, ohne OD) und n = 16 diffuse HGG (OD und ZNS WHO Grad 4).

Die ursprünglich aus drei Tumorentitäten bestehende Kohorte zerfiel nach der Reklassifikation in 14 verschiedene Tumortypen bzw. Subgruppen (s. Abb. 7).

Abb. 6: Oncoplot: Tabellarisch, farbliche Zusammenfassung der beschriebenen Kohorte mit klinischen Daten, Tumorklassifikation, histologischen und molekularen Merkmalen vor und nach der WHO-Klassifikation 2021



Der Oncoplot (s. Abb. 6) gibt einen Überblick über die klinischen, histopathologischen und molekularen Merkmale der in meiner Studie einbezogenen 26 Fälle.

Die Fallnummern sind nach aufsteigendem Patient*innenalter geordnet und in 3 Gruppen (0-3, 4-9, über 10 Jahre) eingeteilt. Die Fallnummern bilden zudem den Rahmen der Grafik und finden sich für einen besseren Überblick sowohl oben als auch unten dargestellt. Außerdem sind das Geschlecht der Patient*innen und die Lokalisation der Tumoren aufgeführt. Die Tumoren mit Mittellinienbeteiligung sind durch einen Stern gekennzeichnet. Zu dem erwähnten Rahmen gehören auch die Diagnosen nach WHO-Klassifikation 2007/2016 und 2021, dementsprechend vor und nach der Reevaluation. Dazwischen dargestellt finden sich die Ergebnisse der IHC und Molekularpathologie. Die Legende rechts neben der Abbildung ist für das Geschlecht, die Lokalisation, die histologischen Erkenntnisse in Bezug auf Gefäßproliferation und Nekrosen, die immunhistochemischen Ergebnisse, wie auch die Ergebnisse der Untersuchungen zu *IDH-1/2*, *TERT*, *CDKN2A/B*, *MGMT*-Promotor, MLPA und MIP. Die Ergebnisse der anderen molekularpathologischen Untersuchungen (850k DNA-Methylierungsanalyse, NGS-Gliom-Panel-Sequenzierung, Nanostring und RNA-Sequenzierung), wie auch die Diagnosen nach WHO 2007/2016 und 2021, sind unter der Abbildung aufgeführt.

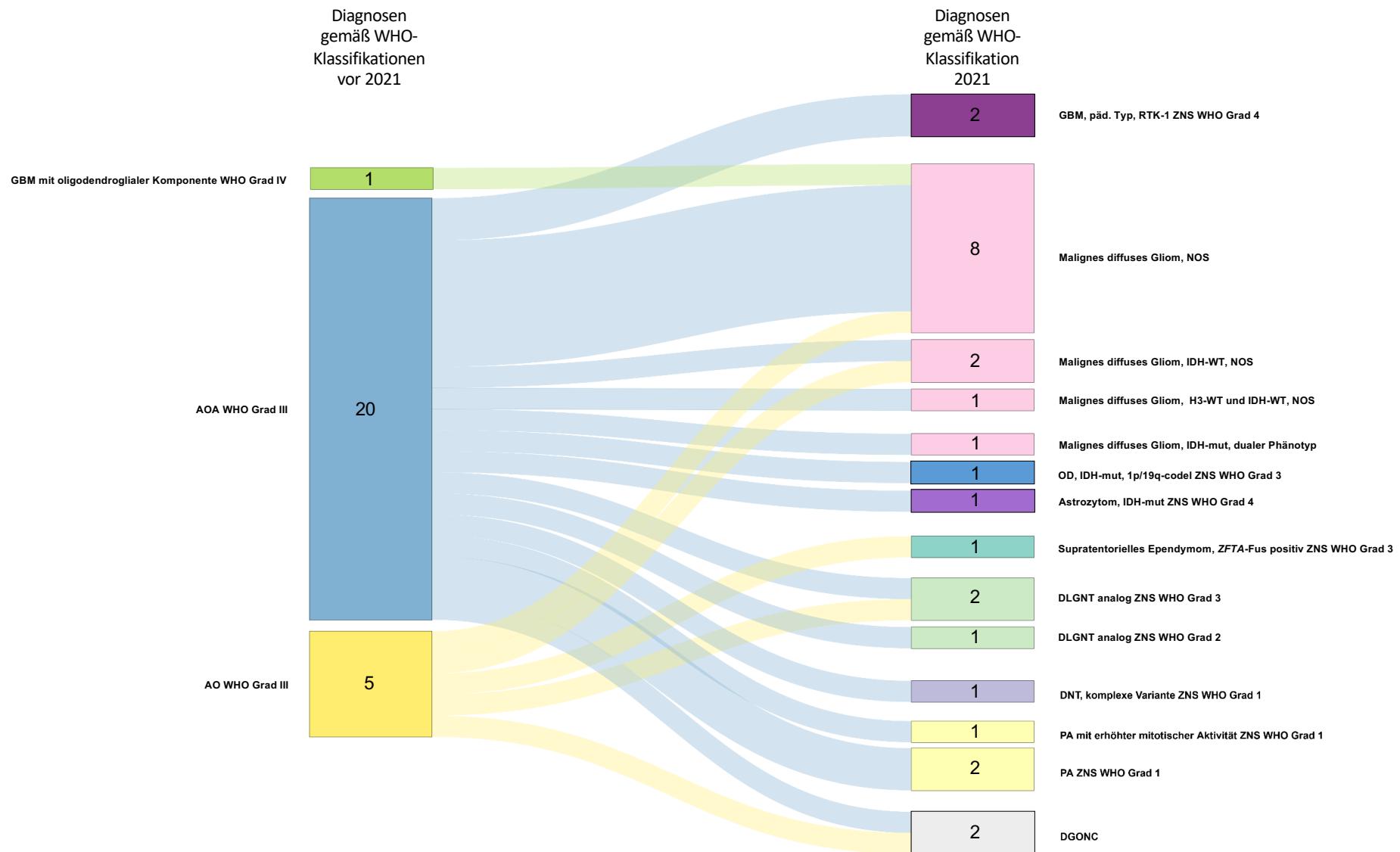


Abb. 7: Sankey-Diagramm der Diagnosen: In der linken Spalte sind die Diagnosen der Fälle gemäß der WHO-Klassifikationen von 2007 bzw. 2016 dargestellt, in der rechten Spalte die Diagnosen nach Reklassifikation aufgrund meiner Untersuchungsergebnisse gemäß der WHO-Klassifikation von 2021. Die Darstellung verdeutlicht einen Zerfall der ursprünglich aus drei Tumorentitäten bestehenden Kohorte in 14 verschiedene Tumortypen bzw. Subgruppen.

3.3 UMAP

Das Diagramm (s. Abb. 8) ist durch die Dimensionsreduktionstechniken UMAP entstanden und dient zur Visualisierung von Clustern hochdimensionaler Daten. Die Daten bestehen aus den Methylierungsanalysen meiner Fälle im Vergleich mit großen Vergleichsdatensätzen aus Neoplasien und Kontrollgeweben.

Die Daten werden als Punkte in zweidimensionaler Ebene dargestellt. Die x- und y-Achse des Diagramms repräsentieren keine messbaren Einheiten. Sie sind zur Visualisierung der Ähnlichkeit der Datenpunkte wichtig. In der Grafik sind die Daten als sechs Cluster aufgetragen, die sich über und unter der t-SNE 1 Achse verteilen. Die Cluster entsprechen Gruppen mit epigenetischer Ähnlichkeit, in diesem konkreten Fall DNA_DEGR (degradierte DNA), GBM_RTK3 (GBM_Rezeptor-Tyrosin-Kinase 3), GBM_MES (GBM_mesenchymaler Subtyp), BCOR, AO_IDH, LGG_PA_MID (engl. *Low-grade glioma pilocytic astrocytoma midline*). Diese sind in verschiedenen Farben dargestellt. Die höchste Dichte liegt im Bereich von GBM_MES, wohingegen die anderen Cluster weniger dicht, also weniger häufig vorkommen. Im Vergleich meiner Daten mit einer hinterlegten Referenzkohorte sieht man eine Übereinstimmung in vier (DNA_DEGR, GBM_MES, BCOR, LGG_PA_MID) Clustern von sieben Fällen (Fall Nr. 1, 4, 8, 9, 15, 19, 22). Sieben meiner Fälle sind in die UMAP-Analyse eingegangen. Sie sind entsprechend als orangene Punkte eingetragen. Die häufigsten Übereinstimmungen gab es im Bereich der degradierten DNA. Die pinken Punkte außerhalb der Punktwolken sind Ausreißer bzw. Einzelfälle oder weitere Fälle degraderter DNA.

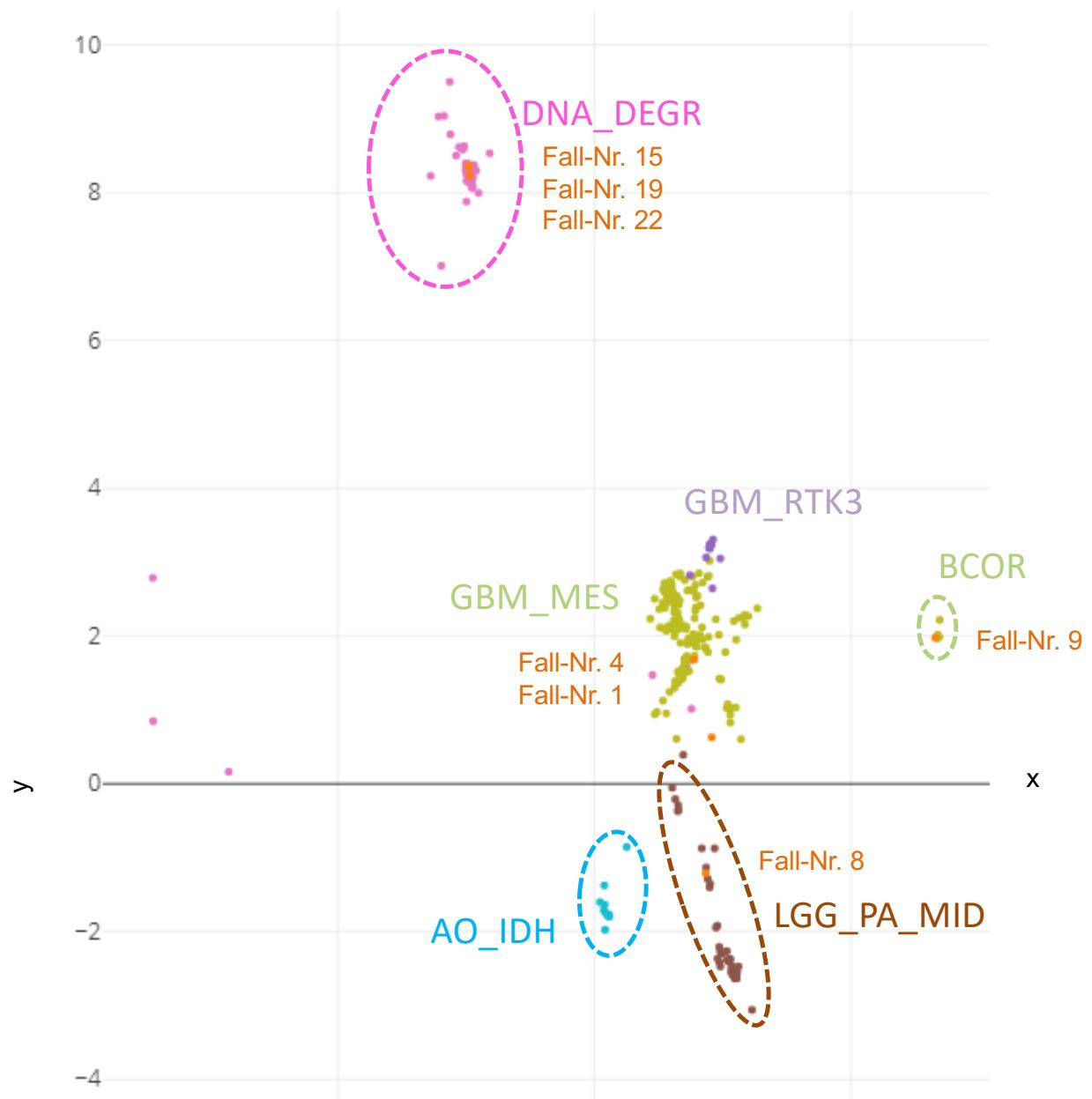


Abb. 8: UMAP-Clustervisualisierung: Bei den Fällen Nr. 15, 19 und 22 ist die DNA_DEGR. Fälle Nr. 1 und 4 können nicht sicher zugeordnet werden, befinden sich aber in der Nähe von GBM-MES. Fall Nr. 9 clustert mit BCOR-Tumoren und Fall Nr. 8 mit der LGG-PAMID.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde an einem pädiatrischen Patientenkollektiv, bestehend aus 26 Fällen diffuser hochgradiger Gliome, die die Diagnosen AOA, AO und GBM umfassten, eine Reklassifizierung nach der aktuellen WHO-Klassifikation nach 2021 durchgeführt. Die morpho-molekularen Nachuntersuchungen dieser Tumoren mit oligodendroglialer Komponente haben ergeben, dass in 24 von 26 Fällen nach heutigem Kenntnisstand die molekular definierten Diagnosekriterien eines hochgradigen Oligodendroglioms, IDH-mutiert, 1p/19q-codeletiert, nicht erfüllt werden. Lediglich bei einem adoleszenten Patienten lag ein solches Oligodendrogiom vor. Ein weiterer Patient zeigte ein „echtes“ Mischgliom mit einer jeweils IDH-mutierten, astrozytären und oligodendroglialen Komponente, im Sinne eines sog. dualen Phänotyps.

Ein eigenständiger Tumortyp einer oligodendroglial differenzierten Neoplasie, die sich einerseits histo- und zytomorphologisch eindeutig abgrenzen und andererseits über den IDH-Mutationsstatus und den Allelstatus der Chromosomenarme 1p und 19q molekular definieren lässt, besteht demnach im Säuglings- und Kindesalter nicht.

Anhand meiner Ergebnisse kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass es nach heutigem Kenntnisstand keine wiederkehrenden molekularen Veränderungen gibt, die ein pädiatrisches Oligodendrogiom als eigenständigen Tumortyp definieren könnten. 15 Fälle konnten nach molekularer Aufarbeitung eindeutig einem anderen, in der 2021 WHO-Klassifikation definierten Tumortyp zugeordnet werden, darunter gliale und glioneuronale sowie zum Teil niedriggradige Tumoren.

Die histologische Reevaluierung hat ergeben, dass die damalige Diagnosestellung durchaus nachvollziehbar ist. Alle untersuchten Gewebeproben zeigten zumindest in Abschnitten eine oligodendrozytenartige Histo- und Zytomorphologie (Abb. 4: Auswahl histologischer Bilder in HE). Die Ergebnisse meiner immunhistochemischen und molekularpathologischen Untersuchungen führen einerseits zu einem Zerfall der untersuchten Kohorte in zahlreiche Subtypen neuroepithelialer Tumoren, lassen andererseits aber keine einheitliche Subgruppe mit gemeinsamer epigenetischer Signatur als Grundlage für die Definition eines pädiatrischen Oligodendroglioms erkennen.

Seit dem Erscheinen der 5. Auflage der WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems im Jahr 2021, die pädiatrische ZNS-Tumoren erstmals als eigenständige Tumortypen berücksichtigt und mithilfe molekularer Veränderungen definiert, werden zunehmend Forschungsergebnisse publiziert, in denen pädiatrische Fallserien retrospektiv molekular aufgearbeitet und reklassifiziert werden.

Auffällig ist dabei, dass es nur wenige wissenschaftliche Publikationen gibt, in denen oligodendroglial differenzierte Tumoren bei Kindern charakterisiert werden, diese vor 2021 erschienen sind und nahezu ausschließlich niedriggradige Tumoren beschreiben. Entsprechende histologisch hochgradige Tumoren finden sich in den beschriebenen Fallserien nur vereinzelt (Bax et al., 2010; Buccoliero et al., 2022; Jones et al., 2017; Li et al., 2018).

Bereits 2010 haben Paugh et al. signifikante genetische und genomische Unterschiede von hochgradigen Gliomen im Kindesalter im Vergleich zu histologisch meist sehr ähnlichen Hirntumoren bei erwachsenen Patient*innen beschrieben.

Auch in der 50 Patient*innen umfassenden Serie von Rodriguez et al. in 2014, die sich mit klinisch-pathologischen Merkmalen in pädiatrischen Oligodendroglomen beschäftigten, wird darüber diskutiert, dass pädiatrische Oligodendroglome keine eigene wiederkehrende molekulare Signatur haben und es womöglich mehr als nur einen molekularen Pfad gibt. Sie kommen zu dem Schluss, dass sich diese Tumorentität in kindliche und erwachsene Oligodendroglome aufteilen lässt. Diese auf histologischen Untersuchungen basierende Aussage beschreibt, wie auch in meinen Ergebnissen nachvollziehbar, eine 1p/19q-Codeletion hauptsächlich bei Patient*innen über 15 Jahren und eine IDH-Mutation in lediglich vier Fällen, von denen drei aus der Gruppe der 1p/19q-Codeletion stammten und die somit dem Erwachsenentyp zuzurechnen sind.

Ebenfalls 2014 veröffentlichten Sahm et al. Untersuchungsergebnisse, die dazu führten, dass das Oligoastrozytom als eigenständige Tumorentität in den nachfolgenden WHO-Klassifikationen nicht mehr berücksichtigt und die Beschreibung eines Mischglioms so aufgehoben wurde. Nach eingehender morpho-molekularer Untersuchung von 43 Fällen und unter Einbeziehung der diagnosebestimmenden, molekularen Marker (IDH-Mutation,

1p/19q-Codeletion und ATRX-Verlust) konnte eine Zuordnung zu entweder Oligodendroglomen oder Astrozytomen erfolgen. Die 20 Oligoastrozytome meiner Kohorte zerfielen nach der Reklassifizierung in neun verschiedene Subtypen der 5. WHO-Klassifikation für ZNS-Tumoren. Eine Ausnahme dazu bildet der sog. duale Phänotyp eines Mischglioms im Sinne einer nebeneinander existierenden astrozytären und oligodendroglialen Tumorkomponente, die sich histologisch und molekular voneinander trennen lassen. Auch ich habe ein solches, insgesamt sehr selten vorkommendes „echtes“ Mischgliom in meiner Kohorte identifizieren können (Fall Nr. 24).

2010 haben Bax et al. bei 63 Fällen hochgradiger Gliome bei Kindern und Jugendlichen ein Kopienzahlprofil mittels Array-CGH erstellt. Sie fanden heraus, dass eine klare Trennung zwischen den Fällen mit Chromosom 1q-Zugewinn, welche häufiger bei Kindern vorkommt, und den Fällen mit Chromosom 7-Zugewinn/10q-Verlust, welcher ein Merkmal bei Erwachsenen ist, vorgenommen werden kann. Die Auswertung der Amplifikationen und Deletionen ergab, dass es zahlreiche Amplifikationen mit geringer Häufigkeit (z.B. *IGF1R*, *PDGFRB*, *CDK6*), aber auch homozygote Deletionen zuvor unbekannter Genloci (z.B. 10q25, 22q13) gibt. Die Aberrationen, die bei erwachsenen Glioblastomen auf zentrale Signalwege abzielen, sind bei Kindern wesentlich seltener.

Die Autoren beschreiben, dass es Überschneidungen in der Gliomgenese aller Altersgruppen gibt, aber bei Kindern ein anderes Spektrum von Kopienzahlaberrationen auftritt. Ein auffälliger Unterschied war die hohe Häufigkeit von den Chromosom 1q-Zugewinnen und 16q-Verlusten und die geringe Häufigkeit von Chromosom 7 Gewinnen und 10q-Verlusten. Die geringe Häufigkeit von zahlreichen Amplifikationen und Deletionen, wie z.B. *KRAS*, *CDKN2C*, deutete zunächst darauf hin, dass das Genom pädiatrischer hochgradiger Gliome dem von Glioblastomen im Erwachsenenalter ähnlich ist. Das Fehlen von IDH-Mutationen bei Kindern bestätigte jedoch die Aussage, dass die biologischen Grundlagen der Gliome unterschiedlich sind.

Als häufigste Amplifikation in pädiatrischen HGG beschreiben Bax et al. diejenige in *PDGFRA* (engl. *Platelet-derived growth factor receptor*, Thrombozyten-Wachstums-Rezeptor-Faktor-alpha). Auch in vielen Fällen ohne Amplifikation in diesem Bereich wurde eine *PDGFR*-assoziierte Gensignatur festgestellt, was wiederum einen Unterschied zu den erwachsenen Fällen darstellt. Der *PDGFR*-gesteuerte Signalweg scheint insgesamt

bei den pädiatrischen Tumoren bevorzugt aktiviert zu sein, wohingegen bei Erwachsenen der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor-gesteuerte Weg (engl. *Epidermal growth factor receptor, EGFR*) aktiviert ist. Die häufigste Deletion lag bei *CDKN2A/B*.

In 10 von 12 Fällen, in denen mithilfe von MIP ein hochauflösendes Kopienzahlprofil erstellt werden konnte, zeigten die Projektergebnisse keine signifikanten oder wiederkehrenden Kopienzahlaberrationen. Dies stimmt mit der Aussage von Bax et al. überein, dass die wichtigsten Signalwege des Glioblastoms bei pädiatrischen Patient*innen i.d.R. nicht durch Veränderung der Kopienzahl aktiviert werden.

Ebenfalls konnte ich in meinem Projekt feststellen, dass es eine Vielzahl an genetischen Veränderungen in Form von Amplifikationen und Deletionen gibt (s. Abb. 6: Oncoplot), allerdings nur mit geringer Häufigkeit und nur in einzelnen Fällen. In meinem Projekt gab es nur einen einzigen Fall mit einer Veränderung im *PDGFR*-Signalweg (Fall Nr. 8), so dass ich die Aussage hinsichtlich der häufigsten Veränderung nicht stützen kann, es aber zutreffend ist, dass diese Veränderung bei einem hochgradigen Gliom prinzipiell vorkommen kann. Auch die Aussage bezüglich der Häufigkeit einer homozygoten Deletion von *CDKN2A/B* ist nicht deckungsgleich mit meinen Ergebnissen, da auch diese Veränderung nur in einem Fall (Fall Nr. 9) gefunden wurde. Dafür könnte es folgende Erklärungen geben: Einerseits umfasst meine Kohorte viele niedriggradige Tumoren, andererseits sind diese Veränderungen nicht für alle ermittelten Diagnosen beschrieben (z.B. glioneuronale Tumoren) und bedauerlicherweise konnten nicht alle Tumorproben dahingehend untersucht werden.

Auch größere Fallserien bzw. Metaanalysen, die zum Teil mehr als 1000 Tumorproben umfassten (z.B. Jones et al., 2017, Mackay et al., 2017), zeigten keine Hinweise auf eine distinkte oligodendrogliale Signatur mit wiederkehrenden molekularen Veränderungen oder exkludierten Fällen mit Oligodendrogliomen.

In der Arbeit von Lee et al. im Jahr 2018 wird der Aspekt der *TERT*-Promotor-Mutation untersucht, da entsprechende Mutationen bei Oligodendrogliomen typischerweise zu finden sind. Die Autoren zeigen unter Einbeziehung zuvor publizierter Daten, dass Mutationen in dieser Region nicht gehäuft bei Kindern und Jugendlichen gefunden werden

können. Meine Ergebnisse unterstützen diese Aussage. In acht Fällen konnte eine *TERT*-Wildtypsequenz bestimmt werden. In nur einem Fall (Fall Nr. 2), dem Oligodendroglom des Patientenkollektivs, konnte eine *TERT*-Promotor-Mutation nachgewiesen werden.

Li et al. konstatieren 2018 aufgrund ihrer Korrelationsanalyse zwischen klinischen, pathologischen und molekularen Parametern, dass Kinder und Teenager mit Oligodendroglomien ein exzellentes Gesamtüberleben aufweisen. Die von den Autoren beschriebene Kohorte umfasste 55 Patient*innen, darunter aber nur fünf Patient*innen mit hochgradigen, WHO Grad III Tumoren (AO und AOA). Die Aussage bezüglich des prognostisch günstigen, gar exzellenten Überlebens gründet sich daher maßgeblich auf untersuchten Tumoren, bei denen einerseits histo- und zytomorphologisch keine eindeutigen anaplastischen Veränderungen beschrieben und deren oligodendrogliale Differenzierung andererseits nicht abschließend belegt wurde. So findet sich in dem dort untersuchten Probenkollektiv kein Fall mit einer IDH-Mutation und/oder 1p/19q-Codeletion. Die Ergebnisse der molekular basierten Reklassifikation meiner Patientenkollektive legen den Schluss nahe, dass in der 2018 von Li et al. beschriebenen Fallserie ebenfalls eine Reihe von Tumoren enthalten sein könnten, die nach Anwendung heutiger diagnostischer Kriterien anderen, vorrangig niedriggradigen Tumortypen zugeordnet werden müssten.

Ebenfalls kommen Li et al. zu dem Schluss, dass es keinen Beweis dafür gibt, dass pädiatrische Oligodendroglome die gleichen wie bei Erwachsenen sind, sondern signifikant unterschiedliche molekulare Signaturen aufweisen. Molekulare Marker, die bei Oligodendroglomien im Erwachsenenalter und pädiatrischen niedriggradigen Gliomen vorkommen, konnten lediglich vereinzelt gefunden werden. Dies greift die Beschreibung von Bax et al. auf und spiegelt auch meine Ergebnisse wider. In Bezug auf das Vorliegen einer IDH-Mutation sowie eines kombinierten Verlustes von 1p und 19q, zeigen meine Ergebnisse dieselbe Seltenheit (*IDH*-Mutation bei den Fällen Nr. 2, 24, 34, *TERT*-Mutation und 1p/19q-Codeletion bei Fall Nr. 2).

Meine Ergebnisse ergaben zu einem großen Teil (35 %) niedriggradige Diagnosen.

In genau diesen niedriggradigen pädiatrischen Tumoren mit oligodendroglialem Phänotyp beschreibt Li et al. die häufigsten genetischen Veränderungen (Mutationen und Fusionen) in *FGFR1*. Im direkten Vergleich zu meiner Kohorte fällt auf, dass ich diese Aussage weitestgehend bestätigen kann. Die *FGFR1*-Veränderungen in meiner Kohorte (Fall Nr. 5 und 21), und eine in *FGFR3* (Fall Nr. 23), wurden in ZNS WHO Grad 1 und Grad 2 Fällen entdeckt. Eine Ausnahme stellt das einzige „echte“ Oligodendroliom, IDH-mutiert, 1p/19q-codeletiert (Fall Nr. 2) mit einem ZNS WHO Grad 3 dar, in dem nebenbefundlich ebenfalls eine *FGFR1*-Mutation aufgetreten ist.

In der Arbeit von Buccoliero et al. im Jahr 2022 wird nach der Untersuchung aus diagnostischen Routineverfahren und einem Genpanel von elf pädiatrisch hochgradigen Gliomen nach wie vor beschrieben, dass, trotz vergleichbarer Morphologie, die genetisch-molekularen Marker bei Erwachsenen und Kindern der hochgradigen Gliome unterschiedlich sind. Die Autoren sprechen darüber, dass eine *IDH*-Mutation häufiger bei niedriggradigen Tumoren festgestellt werden, auch bei hochgradigen Tumoren vorkommen kann, aber bei pädiatrischen Fällen selten sind. Die untersuchten *IDH*-Mutationen in meinem Projekt waren ausschließlich in hochgradigen Tumoren zu finden (Fälle Nr. 2, 24, 34).

In einer Arbeit von 2012 von Buccoliero et al. gehen die Autoren sogar so weit zu sagen, dass es bei Kindern nicht sinnvoll ist, den *IDH*-Status für diagnostische Zwecke zu bestimmen, allerdings ohne dafür eine Altersgrenze zu diskutieren. In 42 untersuchten Gliomproben konnte keine einzige *IDH*-Mutation festgestellt werden. Laut der Autoren ist eine *IDH*-Mutation bei älteren Kindern mit niedriggradigen Tumoren wahrscheinlicher. Bei meiner Kohorte konnte bei drei Fällen (Fall Nr. 2, 24, 34) eine *IDH*-Mutation detektiert werden, wobei das Alter der betroffenen Patient*innen bei Erstdiagnose 12,7, 16 und 17,8 Jahre betrug.

Zu den Stärken dieser Studien gehört, dass trotz der kleinen Kohorte interessante Ergebnisse generiert und die aktuellen Wissensstände der Literatur nachvollzogen bzw. bestätigt werden konnten. Trotz der wenigen Fälle stellen die Ergebnisse dieses Patientenkollektivs eine populationsbasierte Untersuchung für Deutschland in den Jahren 1997-2015 dar, da die entsprechenden HIT-HGG-Studien nahezu alle Patient*innen in

Deutschland erfassten. Des Weiteren konnte ich viele verschiedene Untersuchungstechniken einsetzen und so ein weites Spektrum der molekularpathologischen Methoden ausschöpfen.

Als Limitierungen des Projekts kann zum einen die Seltenheit dieser Art von Hirntumoren bei Kindern gezählt werden, wie auch das Alter der Materialien.

Bedingt durch die Seltenheit umfasst die Kohorte lediglich 26 Fälle. Auf fünf Fälle musste ich komplett verzichten, weil es nicht möglich war das Material zu beschaffen. Außerdem mussten vier Fälle nach intensiver Recherche aus dem Projekt ausgeschlossen werden, weil die zu untersuchende Diagnose in Folge einer Bestrahlung eines Ersttumors entstand.

Aufgrund des Alters der Materialien war die Analyse mit modernen Untersuchungstechniken zum Teil eingeschränkt, so dass nicht alle zur Verfügung stehenden Methoden an allen Fällen durchgeführt werden konnten. In manchen Fällen war es nicht möglich, DNA oder RNA in qualitativ oder quantitativ ausreichender Menge aus den FFPE-Tumorproben zu extrahieren, um weitere Diagnostik durchführen zu können.

Diese Aspekte waren sicherlich auch ein Grund dafür, weswegen die Einordnung als malignes Gliom, NOS in elf Fällen erfolgen musste.

Trotz der genannten Limitierungen stellt meine Kohorte das bislang größte Patientenkollektiv mit hochgradigen Gliomen des Kindesalters dar, in denen eine oligodendrogliale Komponente histologisch beschrieben wurde. Zudem gab es keine untersuchte Tumorprobe, bei der sich die Analyseergebnisse widersprochen haben oder inkonklusiv waren.

Unter Berücksichtigung meiner Ergebnisse, des Vergleichs mit der Literatur und Hinblick der eingangs formulierten Fragestellung lässt sich festhalten:

Ein Oligodendrogiom vom pädiatrischen Typ kann bislang nicht als eigenständiger Tumortyp definiert werden. Die Diagnosekriterien für Erwachsene mit gefordertem Nachweis einer IDH-Mutation sowie eines kombinierten und vollständigen Verlustes der Chromosomenarme 1p und 19q lassen sich auf kindliche Gliome mit oligodendroglial

imponierender Zyt- und Histomorphologie nicht anwenden, da diese Alterationen allenfalls bei Adoleszenten, nicht jedoch bei Kindern vorkommen.

Daraus ergeben sich Konsequenzen für die neuropathologische Routinediagnostik. Im Falle einer oligodendroglial erscheinenden Morphologie eines pädiatrischen Tumors ist eine Vielzahl von Differentialdiagnosen zu berücksichtigen. Zwar ist ein Oligodendroglom „vom Erwachsenentyp“, also IDH-mutiert und 1p/19q-codeletiert, vor allem bei älteren Kindern eine sicher zu beweisende bzw. auszuschließende Differentialdiagnose, jedoch erscheint aufgrund der von uns erhobenen Daten das Vorliegen eines anderen glialen oder glioneuronalen Tumortyps wahrscheinlicher.

Ob es eine wiederkehrende molekulare Signatur gibt, die die Definition eines Oligodendroglioms vom pädiatrischen Typ erlaubt, muss weiter erforscht werden.

Die Weiterentwicklung von noch sensibleren Analysemethoden auf verschiedenen molekularen Ebenen im Sinne eines *multi-omics*-Ansatzes könnte ebenso einen Beitrag dazu leisten wie internationale Kooperationen, um eine höhere Anzahl von analysierbaren Tumorproben zu akquirieren. Auch klinische Parameter wie Bildgebungsdaten, Lokalisation der Tumoren, Altersverteilung, Überlebenszeiten und Prognosen ergeben bislang kein einheitliches Bild.

Die Einteilung neuroepithelialer Tumoren in immer genauere Tumortypen stellt eine wichtige Grundlage für eine individualisierte risikoadaptierte Therapie dar.

Diese Punkte verdeutlichen die dringende Relevanz intensiver Forschung zur Präzisierung der Diagnostik, um optimierte Therapiekonzepte zu entwickeln. So kann eine wirksame, ggf. individualisierte, zielgerichtete Behandlung zukünftig ermöglicht und den Unterschieden zwischen ZNS-Tumoren bei kindlichen und erwachsenen Patient*innen Rechnung getragen werden.

5. Zusammenfassung

Grundlage der vorliegenden Arbeit war die wissenschaftliche Fragestellung, ob ein eigenständiger Tumortyp eines „pädiatrischen Oligodendroglioms“ existiert und über die Identifikation wiederkehrender Merkmale definiert werden kann. Dazu wurden hochgradige diffuse Gliome mit oligodendroglialen Merkmalen bei pädiatrischen Patient*innen gemäß der aktuellen 5. Auflage der WHO-Klassifikation für Tumoren des zentralen Nervensystems (2021) mittels verschiedener molekularpathologischer Verfahren reklassifiziert.

Aus einer Gesamtkohorte von etwa 1600 Kindern mit hochgradigen Gliomen der HIT-GBM-B- bis HIT-GBM-D- sowie der HIT-HGG-2007-Studien wurden 34 Tumoren mit oligodendroglialer oder oligoastrozytärer (Misch-)Differenzierung identifiziert.

Nach Ausschluss ungeeigneter Proben verblieben 26 Fälle, die neuropathologisch gemäß WHO-2021-Kriterien unter Anwendung molekularer Analysemethoden reevaluiert wurden. Nur zwei dieser Tumoren erfüllten die Kriterien eines klassischen Oligodendroglioms mit IDH-Mutation und 1p/19q-Codeletion, wie sie typischerweise bei Erwachsenen zu finden sind. Die übrigen 24 Fälle konnten anderen, teils neu definierten Tumortypen, darunter astrozytär differenzierten und glioneuronalen Tumoren, zugeordnet werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass ein histologisch oligodendroglialer Phänotyp bei Kindern in unterschiedlichen Tumorentitäten ausgeprägt werden kann und nicht spezifisch für das „klassische“ Oligodendrogiom ist. Ein „Oligodendrogiom vom pädiatrischen Typ“ lässt sich daher derzeit nicht als eigenständiger Tumortyp mit wiederkehrenden molekularen Veränderungen oder einer eigenständigen epigenetischen Signatur definieren.

Die Anwendung moderner molekulargenetischer Analysemethoden erlaubt eine präzise neuropathologische Diagnostik als Grundlage einer Prognoseabschätzung und risikoadaptierten Therapie der betroffenen Kinder.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Diagnostischer Algorithmus diffuser Gliome	15
Abb. 2:	Auswahl der Fälle und Tumorproben	19
Abb. 3:	Lokalisationen der untersuchten Tumoren	32
Abb. 4:	Auswahl histologischer Bilder in HE	33
Abb. 5:	Histologie von Fall Nr. 2	35
Abb. 6:	Oncoplot	45
Abb. 7:	Sankey-Diagramm der Diagnosen	47
Abb. 8:	UMAP-Clustervisualisierung	49

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Verwendete Antikörper für immunhistochemische Untersuchungen	20
Tab. 2:	Analysierbare Gene und Fusionstranskripte im verwendeten Nanostring-Assay	27
Tab. 3:	Überblick über klinische Merkmale und Tumorlokalisationen sowie WHO-Gradierung der initialen Kohorte	31
Tab. 4:	Diagnosen nach der Reevaluation	43

8. Literaturverzeichnis

Bale TA, Rosenblum MK. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: An update on pediatric low-grade gliomas and glioneuronal tumors. *Brain Pathol* 2022; 2022: 35218102

Bax DA, Mackay A, Little SE, Carvalho D, Viana-Pereira M, Tamber N, Grigoriadis AE, Ashworth A, Reis RM, Ellison DW, Al-Sarraj S, Hargrave D, Jones C. A distinct spectrum of copy number aberrations in pediatric high-grade gliomas. *Clin Cancer Res* 2010; 2010: 20570930

Becht E, McInnes L, Healy J, Dutertre CA, Kwok IWH, Guan Ng L, Ginhoux F, Newell EW. Dimensionality reduction for visualizing single-cell data using UMAP. *Nat Biotechnol* 2018; 2018: 30531897

Buccoliero AM, Castiglione F, Degl'Innocenti DR, Gheri CF, Genitori L, Taddei GL. IDH1 mutation in pediatric gliomas: has it a diagnostic and prognostic value?. *Fetal Pediatr Pathol* 2012; 2012: 22432788

Buccoliero AM, Giunti L, Moscardi S, Castiglione F, Provenzano A, Sardi I, Scagnet M, Genitori L, Caporalini C. Pediatric High Grade Glioma Classification Criteria and Molecular Features of a Case Series. *Genes (Basel)* 2022; 2022: 35456430

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 A, Plate KH, Dohmen H, Garvalov BK, Coras R, Hölsken A, Hewer E, Bewerunge-Hudler M, Schick M, Fischer R, Beschorner R, Schittenhelm J, Staszewski O, Wani K, Varlet P, Pages M, Temming P, Lohmann D, Selt F, Witt H, Milde T, Witt O, Aronica E, Giangaspero F, Rushing E, Scheurlen W, Geisenberger C, Rodriguez FJ, Becker A, Preusser M, Haberler C, Bjerkvig R, Cryan J, Farrell M, Deckert M, Hench J, Frank S, Serrano J, Kannan K, Tsirigos A, Brück W, Hofer S, Brehmer S, Seiz-Rosenhagen M, Hänggi D, Hans V, Rozsnoki S,

Hansford JR, Kohlhof P, Kristensen BW, Lechner M, Lopes B, Mawrin C, Ketter R, Kulozik A, Khatib Z, Heppner F, Koch A, Jouvet A, Keohane C, Mühleisen H, Mueller W, Pohl U, Prinz M, Benner A, Zapatka M, Gottardo NG, Hernáiz Driever P, Kramm CM, Müller HL, Rutkowski S, von Hoff K, Frühwald MC, Gnekow A, Fleischhack G, Tippelt S, Calaminus G, Monoranu CM, Perry A, Jones C, Jacques TS, Radlwimmer B, Gessi M, Pietsch T, Schramm J, Schackert G, Westphal M, Reifenberger G, Wesseling P, Weller M, Collins VP, Blümcke I, Bendszus M, Debus J, Huang A, Jabado N, Northcott PA, Paulus W, Gajjar A, Robinson G, Taylor MD, Jaunmuktane Z, Ryzhova M, Platten M, Unterberg A, Wick W, Karajannis MA, Mittelbronn M, Acker T, Hartmann C, Aldape K, Schüller U, Buslei R, Lichter P, Kool M, Herold-Mende C, Ellison DW, Hasselblatt M, Snuderl M, Brandner S, Korshunov A, von Deimling A, Pfister SM. DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature* 2018; 2018: 29539639

Class CA, Lukan CJ, Bristow CA, Do KA. Easy NanoString nCounter data analysis with the NanoTube. *Bioinformatics* 2023; 2023: 36440915

Cogliati B, Maes M, Pereira IV, Willebrords J, Da Silva TC, Crespo Yanguas S, Vinken M. Immunohisto- and Cytochemistry Analysis of Connexins. *Methods Mol Biol* 2016; 2016: 27207286

Falkenstein F, Gessi M, Kandels D, Ng HK, Schmidt R, Warmuth-Metz M, Bison B, Krauss J, Kortmann RD, Timmermann B, Thomale UW, Albert MH, Pekrun A, Maaß E, Gnekow AK, Pietsch T. Prognostic impact of distinct genetic entities in pediatric diffuse glioma WHO-grade II-Report from the German/Swiss SIOP-LGG 2004 cohort. *Int J Cancer* 2020; 2020: 32239677

Gielen GH, Gessi M, Buttarelli FR, Baldi C, Hammes J, zur Muehlen A, Doerner E, Denkhaus D, Warmuth-Metz M, Giangaspero F, Lauriola L, von Bueren AO, Kramm CM, Waha A, Pietsch T. Genetic Analysis of Diffuse High-Grade Astrocytomas in Infancy Defines a Novel Molecular Entity. *Brain Pathol* 2015; 2014: 25231549

Gritsch S, Batchelor TT, Gonzalez Castro LN. Diagnostic, therapeutic, and prognostic implications of the 2021 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system. *Cancer* 2022; 2021: 34633681

Hong M, Tao S, Zhang L, Diao LT, Huang X, Huang S, Xie SJ, Xiao ZD, Zhang H. RNA sequencing: new technologies and applications in cancer research. *J Hematol Oncol* 2020; 2020: 33276803

Ji H, Welch K. Molecular inversion probe assay for allelic quantitation. *Methods Mol Biol* 2009; 2009: 19488872

Jones C, Karajannis MA, Jones DTW, Kieran MW, Monje M, Baker SJ, Becher OJ, Cho YJ, Gupta N, Hawkins C, Hargrave D, Haas-Kogan DA, Jabado N, Li XN, Mueller S, Nicolaides T, Packer RJ, Persson AI, Phillips JJ, Simonds EF, Stafford JM, Tang Y, Pfister SM, Weiss WA. Pediatric high-grade glioma: biologically and clinically in need of new thinking. *Neuro Oncol* 2017; 2017: 27282398

Lee J, Putnam AR, Chesier SH, Banerjee A, Raffel C, Van Ziffle J, Onodera C, Grenert JP, Bastian BC, Perry A, Solomon DA. Oligodendrogiomas, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted, arising during teenage years often lack TERT promoter mutation that is typical of their adult counterparts. *Acta Neuropathol Commun* 2018; 2018: 30231927

Li YX, Aibaidula A, Shi Z, Chen H, Li KK, Chung NY, Yang RR, Chan DT, Poon WS, Lee KLR, Mao Y, Wu J, Chan AK, Zhou L, Ng HK. Oligodendrogiomas in pediatric and teenage patients only rarely exhibit molecular markers and patients have excellent survivals. *J Neurooncol* 2018; 2018: 29761369

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007; 2007: 17618441

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 2016; 2016: 27157931

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* 2021; 2021: 34185076

Mackay A, Burford A, Carvalho D, Izquierdo E, Fazal-Salom J, Taylor KR, Bjerke L, Clarke M, Vinci M, Nandhabalan M, Temelso S, Popov S, Molinari V, Raman P, Waanders AJ, Han HJ, Gupta S, Marshall L, Zacharoulis S, Vaidya S, Mandeville HC, Bridges LR, Martin AJ, Al-Sarraj S, Chandler C, Ng HK, Li X, Mu K, Trabelsi S, Brahim DH, Kisljakov AN, Konovalov DM, Moore AS, Carcaboso AM, Sunol M, de Torres C, Cruz O, Mora J, Shats LI, Stavale JN, Bidinotto LT, Reis RM, Entz-Werle N, Farrell M, Cryan J, Crimmins D, Caird J, Pears J, Monje M, Debily MA, Castel D, Grill J, Hawkins C, Nikbakht H, Jabado N, Baker SJ, Pfister SM, Jones DTW, Fouladi M, von Bueren AO, Baudis M, Resnick A, Jones C. Integrated Molecular Meta-Analysis of 1,000 Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell* 2017; 2017: 28966033

Paugh BS, Qu C, Jones C, Liu Z, Adamowicz-Brice M, Zhang J, Bax DA, Coyle B, Barrow J, Hargrave D, Lowe J, Gajjar A, Zhao W, Broniscer A, Ellison DW, Grundy RG, Baker SJ. Integrated molecular genetic profiling of pediatric high-grade gliomas reveals key differences with the adult disease. *J Clin Oncol* 2010; 2010: 20479398

Rodriguez FJ, Tihan T, Lin D, McDonald W, Nigro J, Feuerstein B, Jackson S, Cohen K, Burger PC. Clinicopathologic features of pediatric oligodendroglomas: a series of 50 patients. *Am J Surg Pathol* 2014; 2014: 24805856

Sahm F, Reuss D, Koelsche C, Capper D, Schittenhelm J, Heim S, Jones DT, Pfister SM, Herold-Mende C, Wick W, Mueller W, Hartmann C, Paulus W, von Deimling A. Farewell

to oligoastrocytoma: in situ molecular genetics favor classification as either oligodendrogloma or astrocytoma. *Acta Neuropathol* 2014; 2014: 25143301

Sturm D, Capper D, Andreiuolo F, Gessi M, Kölsche C, Reinhardt A, Sievers P, Wefers AK, Ebrahimi A, Suwala AK, Gielen GH, Sill M, Schrimpf D, Stichel D, Hovestadt V, Daenekas B, Rode A, Hamelmann S, Previti C, Jäger N, Buchhalter I, Blattner-Johnson M, Jones BC, Warmuth-Metz M, Bison B, Grund K, Sutter C, Hirsch S, Dikow N, Hasselblatt M, Schüller U, Koch A, Gerber NU, White CL, Buntine MK, Kinross K, Algar EM, Hansford JR, Gottardo NG, Schuhmann MU, Thomale UW, Hernáiz Driever P, Gnekow A, Witt O, Müller HL, Calaminus G, Fleischhacker G, Kordes U, Mynarek M, Rutkowski S, Frühwald MC, Kramm CM, von Deimling A, Pietsch T, 6, Sahm F, Pfister SM, Jones DTW. Multiomic neuropathology improves diagnostic accuracy in pediatric neuro-oncology. *Nat Med* 2023; 2023: 36928815

Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *Int J Mol Sci* 2012; 2012: 22489151

Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *J Biomed Biotechnol* 2009; 2009: 20011662

Wesseling P, Capper D. WHO 2016 Classification of gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2018; 2018: 28815663

Zschernack V, Jünger ST, Mynarek M, Rutkowski S, Garre ML, Ebinger M, Neu M, Faber J, Erdlenbruch B, Claviez A, Bielack S, Brozou T, Frühwald MC, Dörner E, Dreschmann V, Stock A, Solymosi L, Hench J, Frank S, Vokuhl C, Waha A, Andreiuolo F, Pietsch T. Supratentorial ependymoma in childhood: more than just RELA or YAP. *Acta Neuropathol* 2021; 2021: 33481105

9. Erklärung zum Eigenanteil

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Pädiatrische Oligodendroglome: Ein eigenständiger Tumor-Typ?“ selbstständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Die Planung der wissenschaftlichen Arbeit sowie die Datenerhebung und -auswertung bzw. deren synoptische Interpretation erfolgten in enger Zusammenarbeit und stetigem Austausch mit meinem Betreuer, Herrn Dr. med. G. H. Gielen, sowie mit meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. T. Pietsch.

Nach erfolgtem Datenbankabgleich mit der Studienzentrale für hochgradige Gliome des Kindesalters in Göttingen (Studienleiter: Herr Prof. Dr. med. C. Kramm) habe ich eigenständig die entsprechenden Tumorproben einerseits aus dem Archiv des Instituts für Neuropathologie Bonn, andererseits durch Kontaktaufnahme mit den Neuropathologien der Städte Aachen, Basel, Berlin, Dresden, Düsseldorf, Freiburg, Göttingen, Hamburg, Hannover, Heidelberg, Jena, München, Münster, Nürnberg, Ravensburg, Regensburg und Trier zusammengestellt.

Die strukturierte Koordination der darauffolgenden Laboruntersuchungen und die konsequente Dokumentation der einzelnen (Teil-)Ergebnisse anhand einer von mir angelegten und akribisch gepflegten Mastertabelle lagen dabei in meiner Verantwortung. Eine Einführung und Einarbeitung in die verschiedenen histologischen und molekularen Verfahren erfolgte bereits zu Beginn des Projekts. Die histologischen und molekularpathologischen Analysen wurden mit der Unterstützung von Frau A. Brüggemann, Frau E. Dörner, Frau V. Dreschmann, Herrn Dr. rer. nat. T. Goschzik und Herrn Prof. Dr. rer. nat. A. Waha durchgeführt, um eine hohe Qualität und Reproduzierbarkeit der Untersuchungsergebnisse sicherzustellen.

Das Zusammentragen der Ergebnisse, die Erstellung der Abbildungen und Tabellen sowie das Verfassen der Dissertationsschrift erfolgten vollständig in Eigenleistung.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

10. Danksagung

Die hier vorliegende Dissertation wäre ohne die Unterstützung und Begleitung vieler Menschen nicht realisierbar gewesen.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Dr. med. G. H. Gielen, für die ausschlaggebende Idee und damit den Grundstein dieses Projektes, seine Unterstützung und sein unermüdliches Vertrauen in die Arbeit. Ebenso danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. T. Pietsch, für die Möglichkeit, das Projekt an seinem Institut in die Tat umsetzen zu können.

Ihre wissenschaftliche Expertise hat maßgeblich zur Entstehung meiner Dissertation beigetragen.

Außerdem danke ich von Herzen den Mitarbeiter*innen der Labore der Histologie und der molekularpathologischen Diagnostik des Instituts für Neuropathologie an der Uniklinik Bonn. Insbesondere möchte ich Frau E. Dörner, Frau V. Dreschmann, Frau A. Brüggemann, Herrn Dr. rer. nat. T. Goschzik und Herrn Prof. Dr. rer. nat. A. Waha danken, ohne deren Arbeit und Einsatz dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre.

Meinen tiefsten Dank spreche ich meinem Ehemann David aus, der mir zu jeder Tages- und Nachtzeit mit Rat und Tat zur Seite stand, mich stets zur Ruhe gebracht hat, auf den ich mich immer verlassen konnte - und er immer für mich da war und ist.

Dankeschön.