

Neuropathologie WiSe 24/25

Einführung in molekulare Marker in der Neuropathologie

Dr. med. Max Braune

Arzt in Weiterbildung

Lehrbeauftragter

Paul-Flechsig-Institut für Neuropathologie



Vorlesungsplan WiSe 2024/2025

Zeit: 08:00 – 09:30 Uhr

Ort: Hörsaal Operatives Zentrum

Termin	Thema
10.12.	Allgemeine mikroskopische Neuropathologie, Hirndruck/ Ödem
11.12.	Entzündungen
12.12.	Blutungen und Ischämie
16.12.	Tumoren in der Neuropathologie
17.12.	Einführung molekulare Marker
18.12.	Degenerative Erkrankungen
19.12.	Klausur

☛ Diagnostische Grundprinzipien: vom Gewebe zur Diagnose mit Fokus auf molekulare Marker

Molekulare Untersuchung:

Wozu? Wann? Warum?

Stellenwert molekularer Marker und Begriffsklärung

Diagnostischer Wert

Prognostischer Wert

Prädiktiver Wert

Vorstellung etablierter Marker an ausgewählten Fallbeispielen

-IDH-1/IDH2- Mutationen

-1p-/19q Status

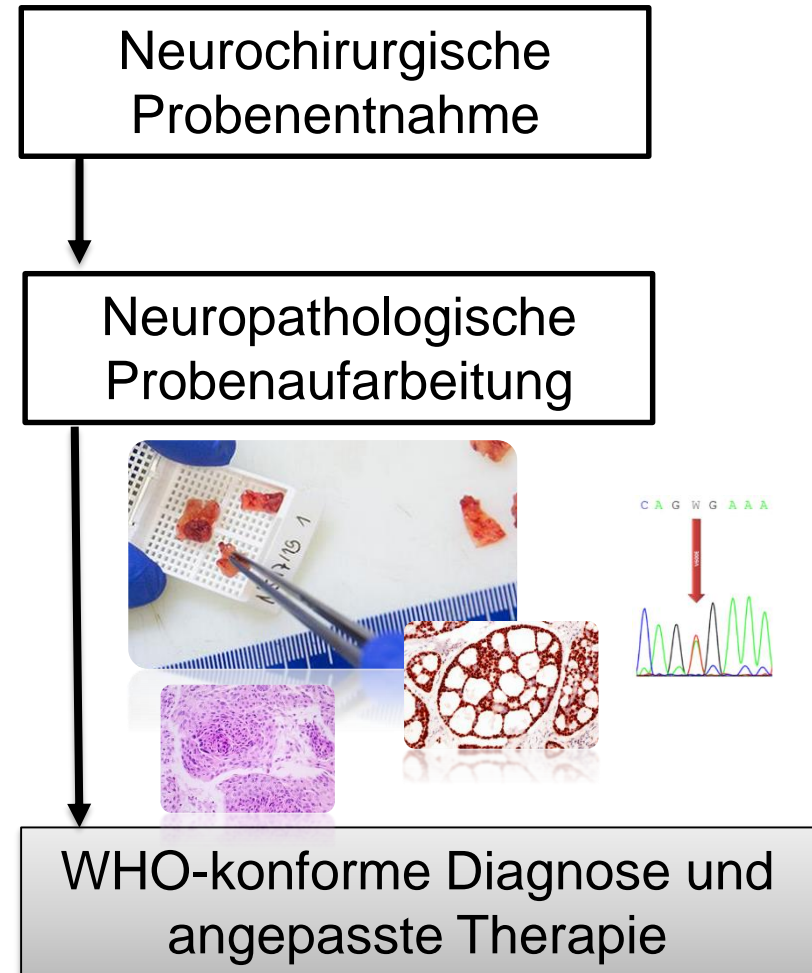
-MGMT-Promotor-Methylierung

-Molekulare Signatur von Glioblastomen

Ausblick

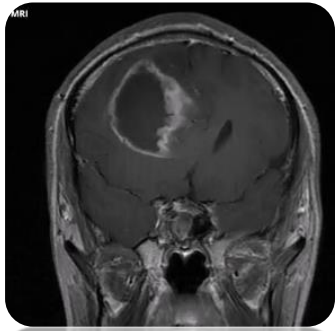
Blue-BooksOnline (WHO.int)

25 Jähriger Patient mit Kopfschmerzen und epileptischem Anfall



https://radiopaedia.org/cases/8945/studies/9726?lang=us&referrer=%2Farticles%2Fglioblastoma-nos%3Flang%3Dus%23image_list_item_367801
<https://www.uniklinikum-leipzig.de/einrichtungen/neuropathologie/forschung/arbeitsgruppen>

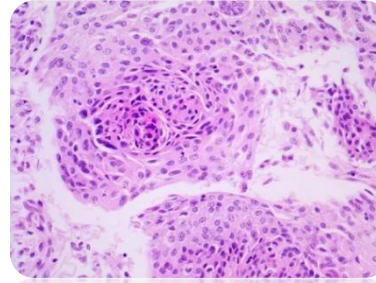
Neuropathologische Probenaufarbeitung und Tumorcharakterisierung 2022



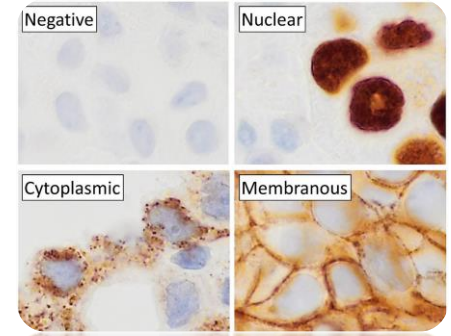
Klinisch-/Bildgebend



Makroskopisch



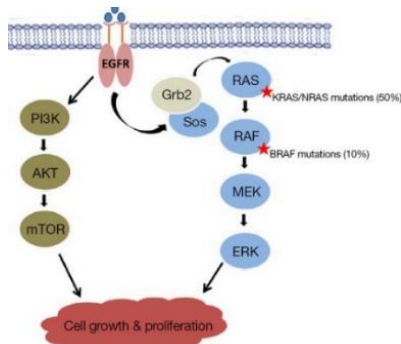
Histomorphologisch



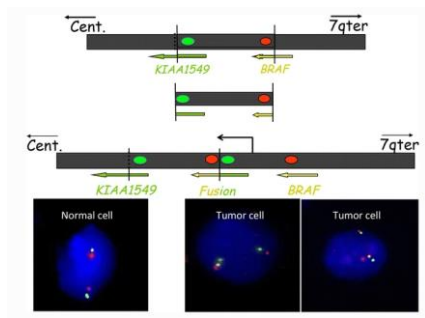
Immunhistochemisch

Tumorcharakterisierung

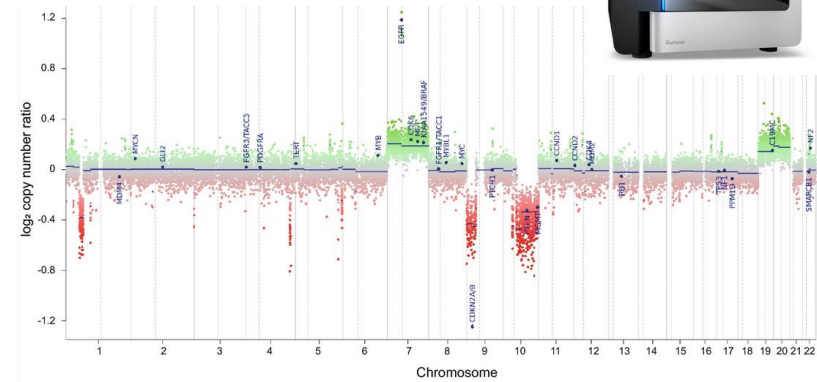
Molekular



Mutationsanalysen auf DNA-Ebene
z.B. Pyrosequenzierung, Next generation sequencing (NGS)



Fusionsanalysen, z.B. mittels CISH, FISH, PCR, NGS



Methylierungsanalyse und Chromosmale Alterationen
z.B. mittels EPIC 935k-Analyse



https://radiopaedia.org/cases/8945/studies/9726?lang=us&referrer=%2Farticles%2Fglioblastoma-nos%3Fimg%3Dus%23image_list_item_367801
<https://webpath.med.utah.edu/CNSHTML/CNS333.html>
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00401-018-1879-y/figures/1>

Molekulare Analyse- Wozu? Wann? Warum?



Seit der WHO-Klassifikation 2016 sind neben morphologischen und immunhistochemischen Kriterien molekulare Marker integraler Bestandteil für die Diagnosestellung zahlreicher Hirntumoren



weitreichende Aussagekraft

- Diagnostisch
- Prognostisch
- Prädiktiv

Blue-BooksOnline (WHO.int)

Molekulare Analyse- Wozu? Wann? Warum?



Begriffsklärung und Bedeutung molekularer Marker



Diagnostischer Wert:

trennt verschiedene Tumorentitäten/Läsionen voneinander



Prognostischer Wert:

Aussage zum wahrscheinlichen Krankheitsverlauf (unabhängig von Therapie)



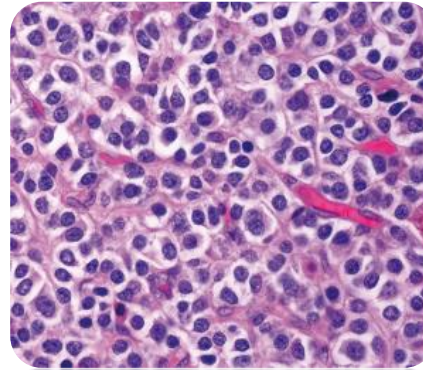
Prädiktiver Wert:

Aussage zum wahrscheinlichen Therapieansprechen auf bestimmte Therapiekonzepte



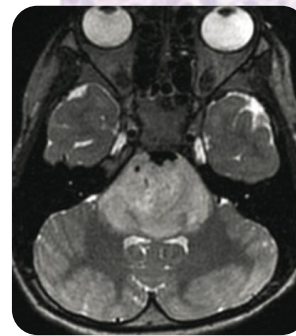
Blue-BooksOnline (WHO.int)

Molekulare Analyse- Wozu? Wann? Warum?



-bei bestimmten **morphologischen/ immunhistochemischen Merkmalen**
z.B. oligoide Morphologie und ATRX-Erhalt:

IDH-Mutation? 1p/19q-Verlust?



-bei bestimmten klinisch/bildgebenden Befunden wie **Lokalisation oder jungem Patientenalter**
z.B. Frage nach Alterationen in H3K27 bei Verdacht auf Mittellinienglioms, Frage nach Subtyp eines kindlichen high-grade Glioms, Frage seltene IDH-Mutation oder Mutation in G34R/V



-**Therapieoptionen/ Therapiewirksamkeit**
z.B. MGMT-Status bei Glioblastomen und Frage nach Temozolomidgabe



In aktueller WHO-Klassifikation 2021 werden zahlreiche Kriterien und Empfehlungen genannt, z.B.:

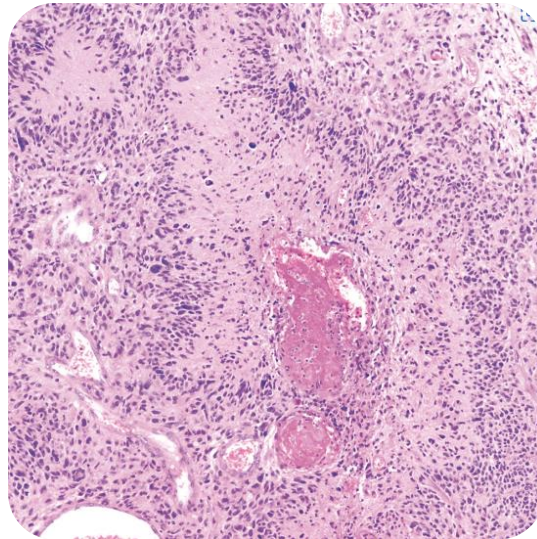
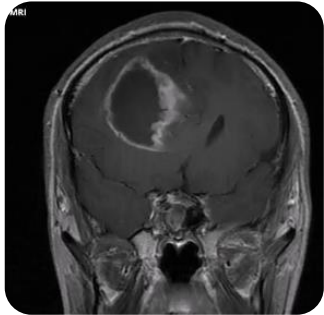
Blue-BooksOnline (WHO.int)
TEMOZOLOMID Accord 20 mg Hartkapseln Sachets - Beipackzettel | Apotheken Umschau (apotheken-umschau.de)



Molekulare Marker anhand von Beispielen:
IDH-Status bei malignen Gliomen

Patient 1

85 Jahre alt,
Karnofsky 80%

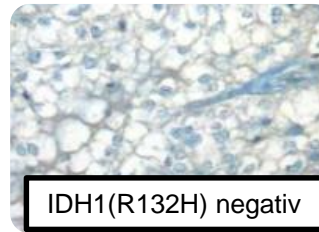


Maligner glialer Tumor mit **Nekrosen** und **Gefäßproliferaten**

Therapie: Subtotale Resektion, kombinierte
Radiochemotherapie (Temozolomid)

Rezidiv nach 6 Monaten

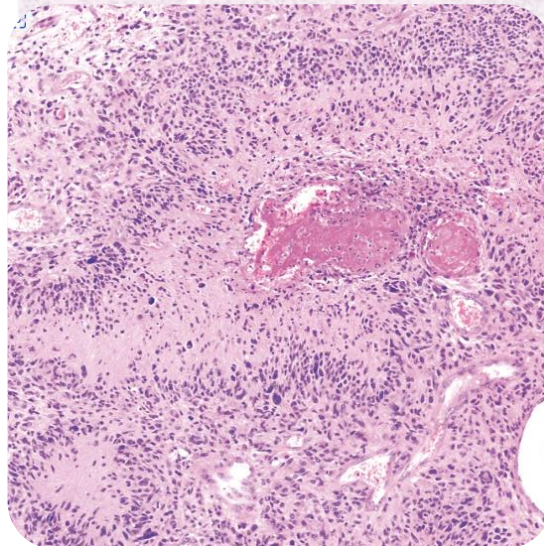
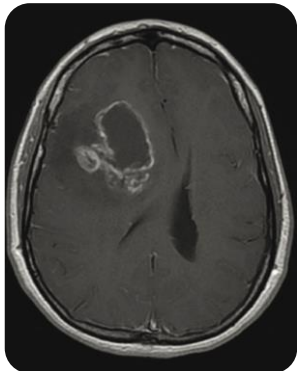
Patient stirbt nach 10 Monaten +



IDH1(R132H) negativ

Patient 2

45 Jahre alt,
Karnofsky 80%



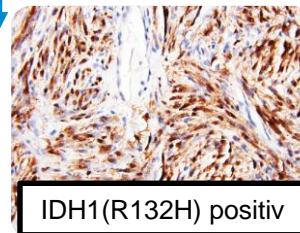
Maligner glialer Tumor mit Nekrosen und Gefäßproliferaten

Therapie: Subtotale Resektion, kombinierte
Radiochemotherapie (Temozolomid)

1. Rezidiv nach 24 Monaten

2. Rezidiv nach 36 Monaten

Patient stirbt nach 42 Monaten +



IDH1(R132H) positiv

Morphologisch identischer maligner glialer
Tumor, biologisches Verhalten aber völlig
unterschiedlich: Zufall?

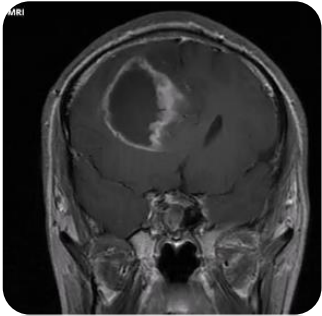
https://radiopaedia.org/cases/8945/studies/9726?lang=us&referrer=%2Farticles%2Fglioblastoma-nos%3Flang%3Dus%23image_list_item_367801 Blue-BooksOnline (WHO.int)

Molekulare Marker anhand von Beispielen:
IDH-Status bei malignen Gliomen

Prognostischer Stellenwert IDH-Status

Patient 1

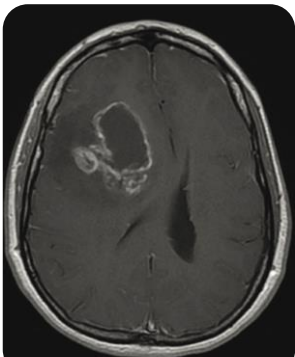
85 Jahre alt,
Karnofsky 80%



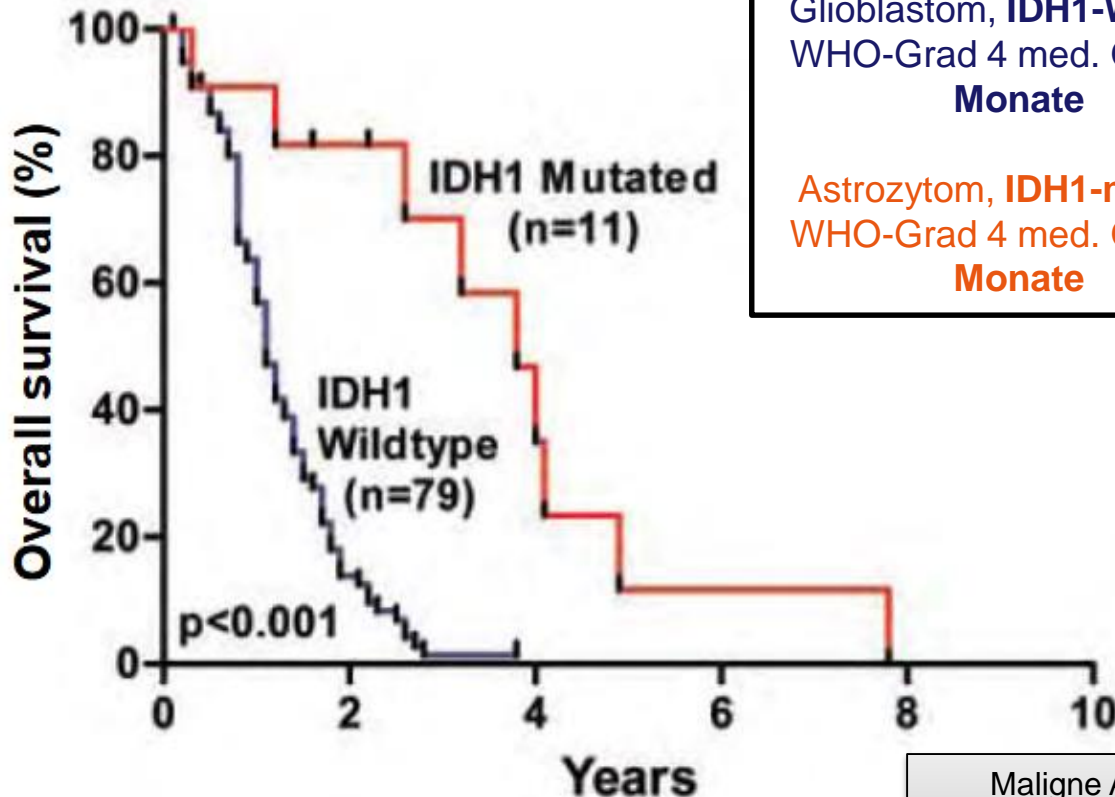
Tod nach 10 Monaten +

Patient 2

45 Jahre alt,
Karnofsky 80%



Tod nach 42 Monaten +



Glioblastom, **IDH1-Wildtyp**,
WHO-Grad 4 med. **OS 13,2**
Monate

Astrozytom, **IDH1-mutiert**,
WHO-Grad 4 med. **OS 45,6**
Monate

Maligne Astrozytome mit **IDH-Mutation** haben eine **bessere Prognose** als Glioblastome ohne IDH-Mutation (Wildtyp)

https://radiopaedia.org/cases/8945/studies/9726?lang=us&referrer=%2Farticles%2Fglioblastoma-nos%3Flang%3Dus%23image_list_item_367801 Blue-BooksOnline (WHO.int)

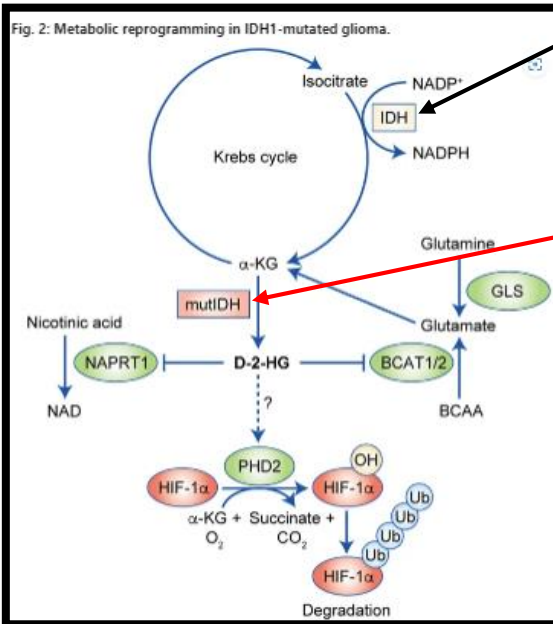
Molekulare Marker anhand von Beispielen:
IDH-Status bei malignen Gliomen

Funktion IDH1/2

Physiologisch setzt IDH Isocitrat und NADP+ zu
alpha Ketoglutarat und NADPH um

Gain-of-Function-Mutation meist

IDH1: R132H (Codon 132, Austausch Arginin gegen Histidin) ~ 93%
IDH2: R172G/M/K (Codon 172, ArgininGlycin/Methionin/Lysin) ~ 3%

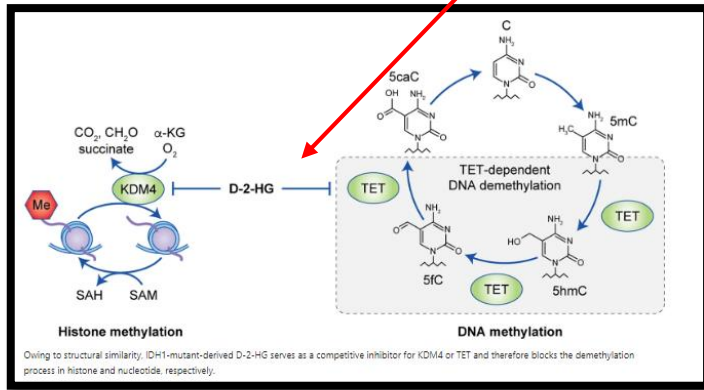


IDH-Mutation führt zur vermehrten Produktion von 2-Hydroxy-Glutat (Onkometabolit) und NADP+

D-2-HG inhibiert verschiedene demethylierende Enzyme (u.a. TET1/2) → zunehmende Methylierung der DNA

Glioma-associated-CpG-Island-Methylator-Phenotyp (G-CIMP)
Methylierung bewirkt **Differenzierungsblockade** und **zunehmende Entartung**

IDH-Mutationen führen zur Bildung von **Onkometaboliten (D-2-HG)**, die zu metabolischen/epigenetischen Veränderungen und zur **Tumorgnese** beitragen
Häufigste Mutation: IDH1(R132H)



IDH mutation in glioma: molecular mechanisms and potential therapeutic targets | British Journal of Cancer (nature.com)

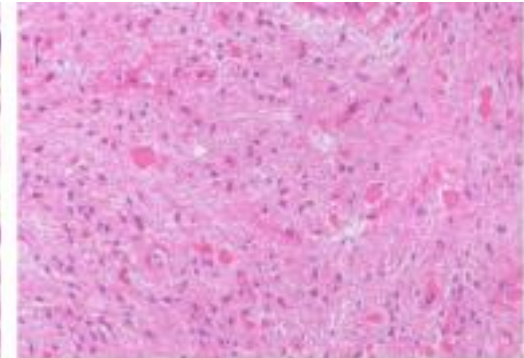
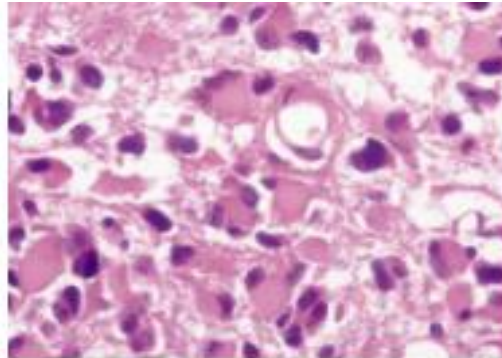
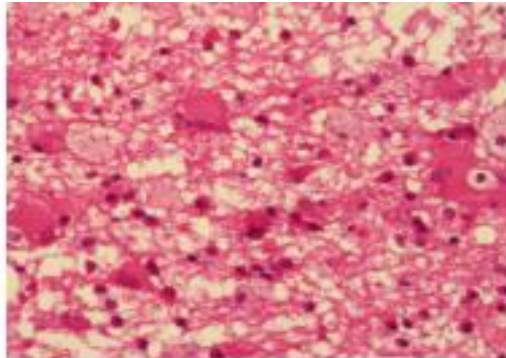
Diagnostischer Stellenwert IDH-Mutation

Reaktive Gliose

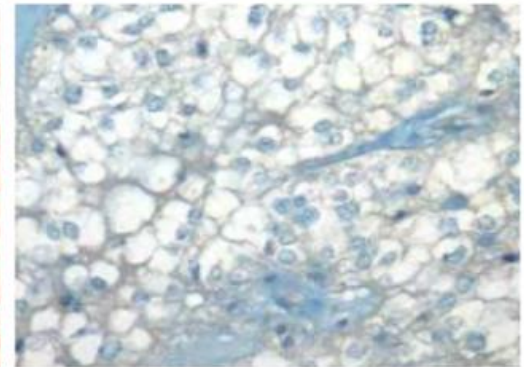
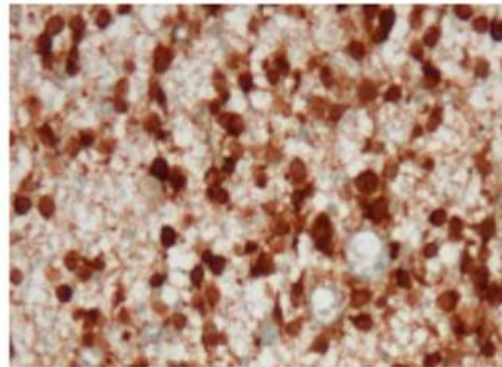
Astrozytom

pilozytisches Astrozytom

HE



IDH1-
R132H



Nachweismethoden:

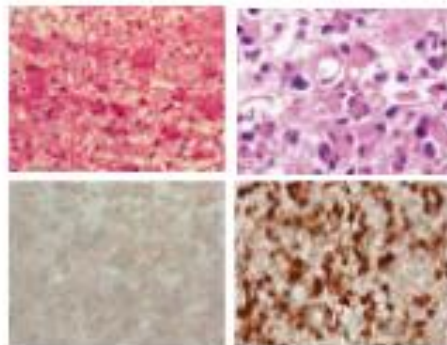
- immunohistochemisch: mutationsspezifischer Antikörper IDH1(R132H) (Screeningtool)
- molekular für seltenere IDH-Mutationen: next generation sequencing (NGS), Pyrosequenzierung
- indirekt: 935k-Analyse

- IDH-Mutationen typisch für diffuse gliale Tumoren junger Erwachsener (**Astrozytome, Oligodendrogliome**)
- KEIN Mutationsnachweis in reaktiven Prozessen oder morphologischen Mimics (z.B. Pilozyt. Astrozytom, Ependymom)

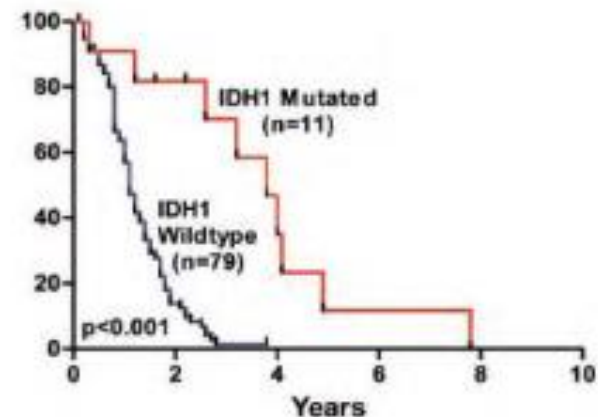
Zusammenfassung IDH-Mutation

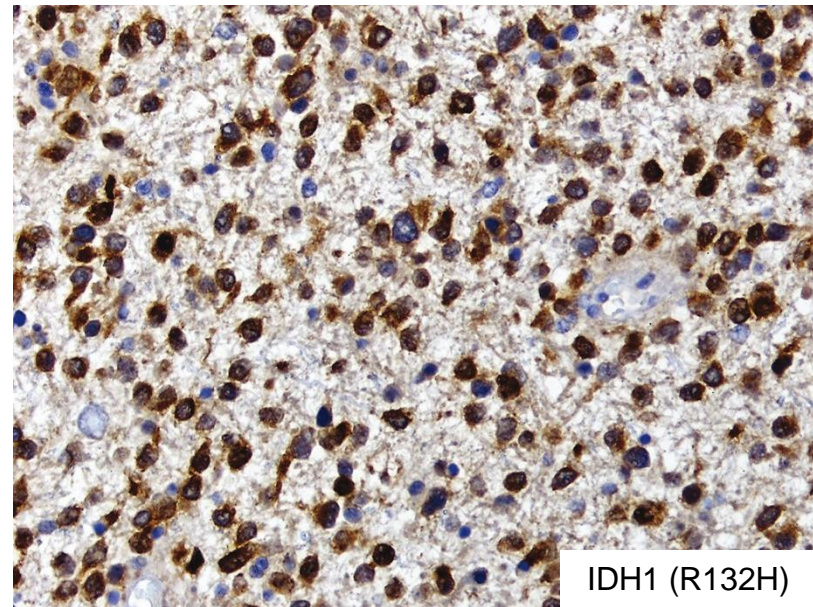
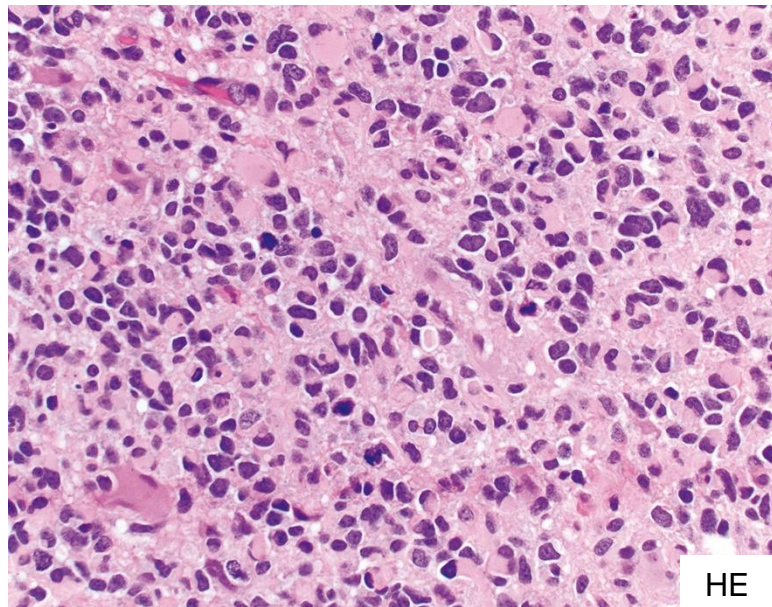
- ☞ Isocitrat-Dehydrogenase (IDH1/2)
- ☞ IDH-Mutation v.a. bei diffusen glialen Tumoren **junger Erwachsener (30-50J.)**
- ☞ IDH-Mutationsnachweis typisch und **diagnostisches Kriterium für Astrozytome und Oligodendrogliome**
- ☞ **Glioblastome sind IDH-Wildtyp-Gliome**
- ☞ IDH-Mutationsnachweis **prognostisch günstig**, längeres OS als bei morphologischen Mimics (Glioblastom, IDH-Wildtyp)
- ☞ Nachweis: Immunhistochemisch IDH1(R132H), für seltener Mutationen Pyrosequenzierung und next generation sequencing (NGS)

diagnostisch

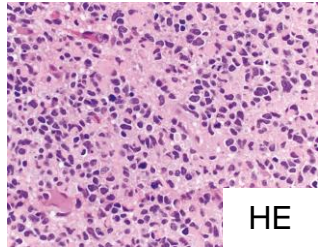


prognostisch

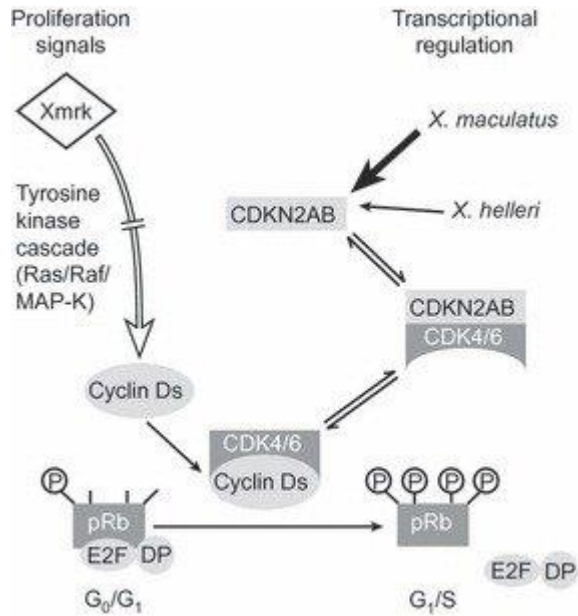
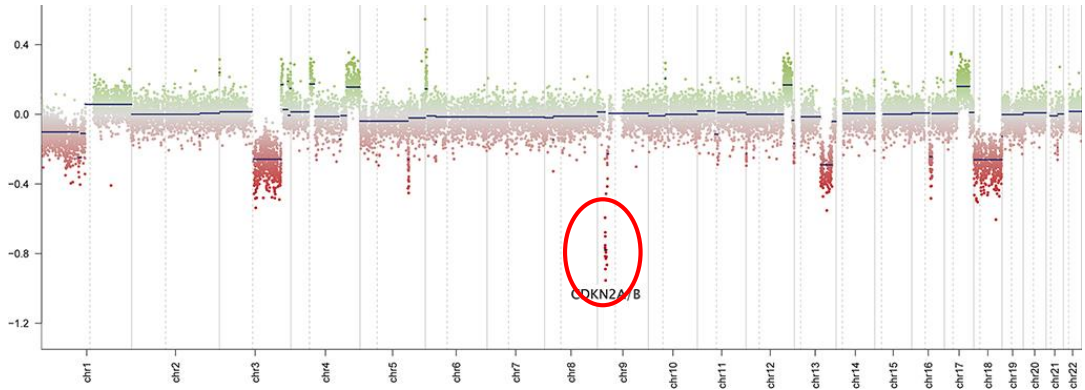




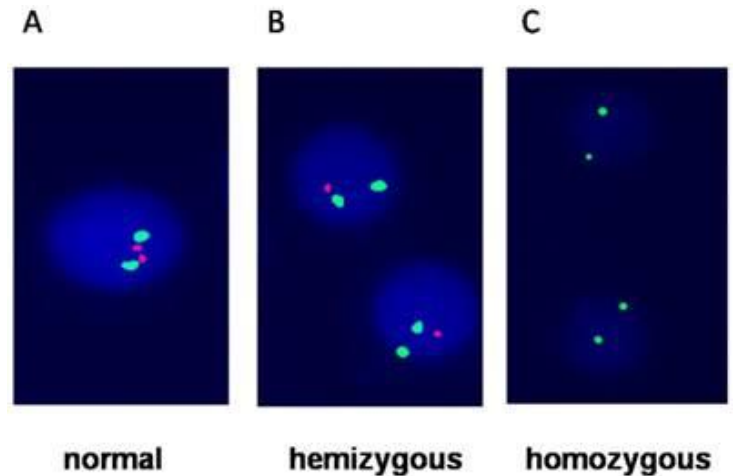
Histologisch keine
Malignitätskriterien (keine
Nekrosen, keine
mikrovaskulären
Proliferate).
Nur ZNS WHO-Grad 3?



CDKN2A/B-Deletion: via Methylohm oder CISH



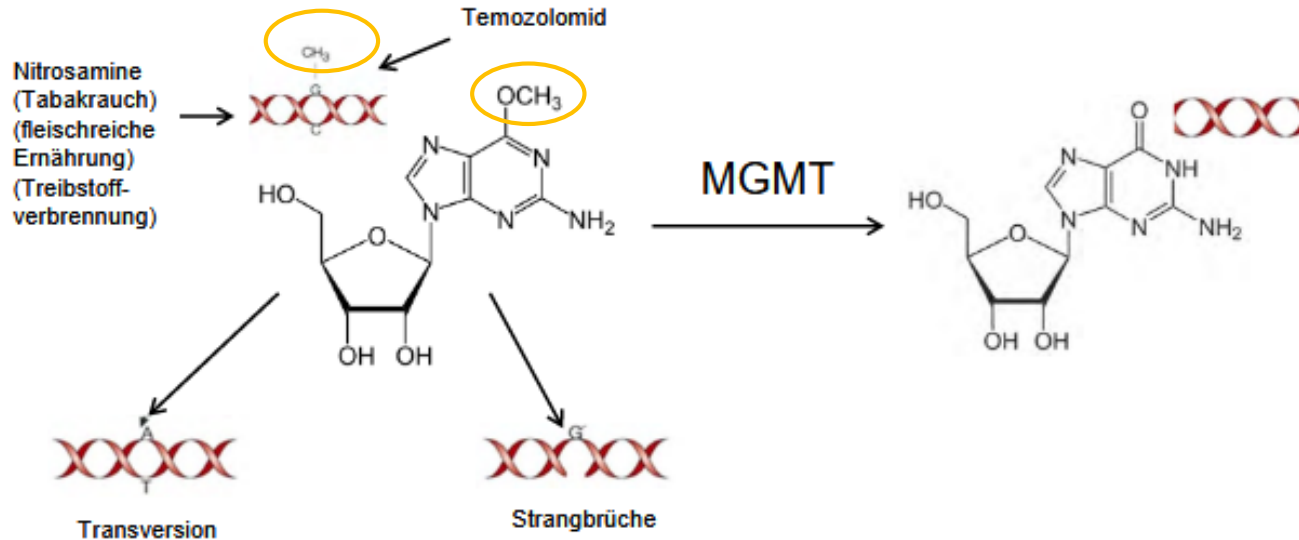
Diagnose:
Astrozytom, IDH-mutiert,
ZNS WHO-Grad 4



Molekulare Marker Anhand von Beispielen:
MGMT-Promotormethylierung bei Glioblastomen

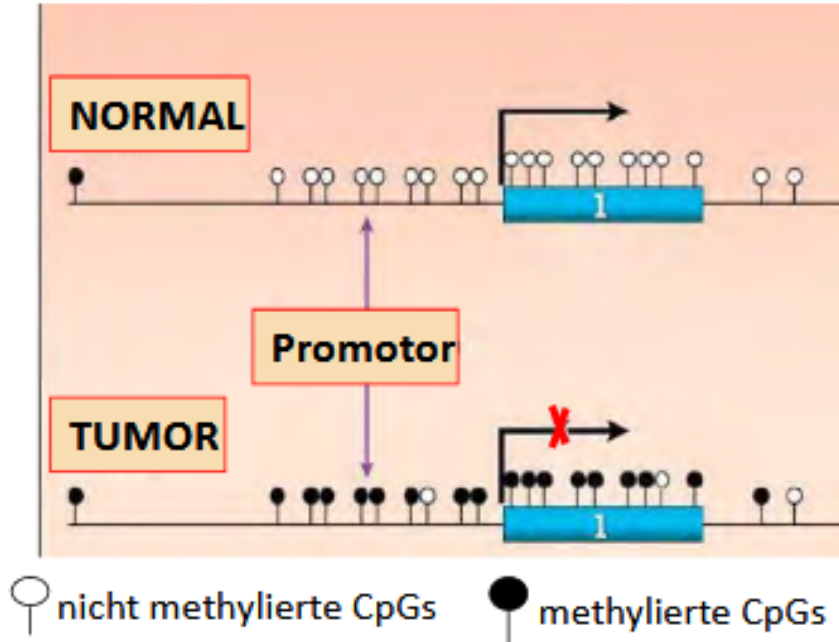
Übersicht MGMT

O-6-Methylguanin-DNA-methyltransferase



- „DNA-Reparaturenzym“ – entfernt Alkylgruppen von Guanin verhindert Transversionen, Strangbrüche
 - Alkylierung durch „Umweltgifte“, Chemotherapeutika (u.a. Temozolomid)
 - Alkylanzien (u.a. Temozolomid) mit ähnlichem Mechanismus
- MGMT reduziert den antineoplastischen Effekt von Temozolomid!

MGMT-Regulation



- Hypermethylierung des Promotors führt zu geringerer Expression des dahinterliegenden Gens
- Methylgruppen an Cytosin in Cytosin-Guanosin-Dinukleotiden (CpG's)
- in Promotoren CG-Dichte höher
- dynamisch reguliert durch De-novo-Methyltransferasen (DNMT) DNA-Demethylase

genomisch

▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼

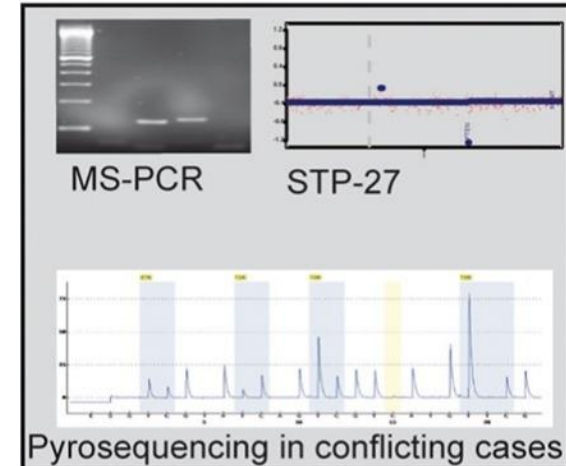
C CTGCG CG GGT CGCG CGGCG CGCGG CGG CCGGAGGTGCCG

Methode:

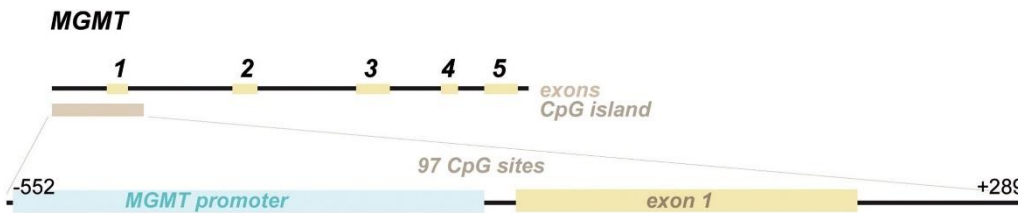
- ☛ Methylation specific MS-PCR uses a methylation specific primer set
- ☛ Pyrosequenzierung
- ☛ EPIC array

Problem:

- Qualitative Beurteilung
- Cut off?
- Kosten

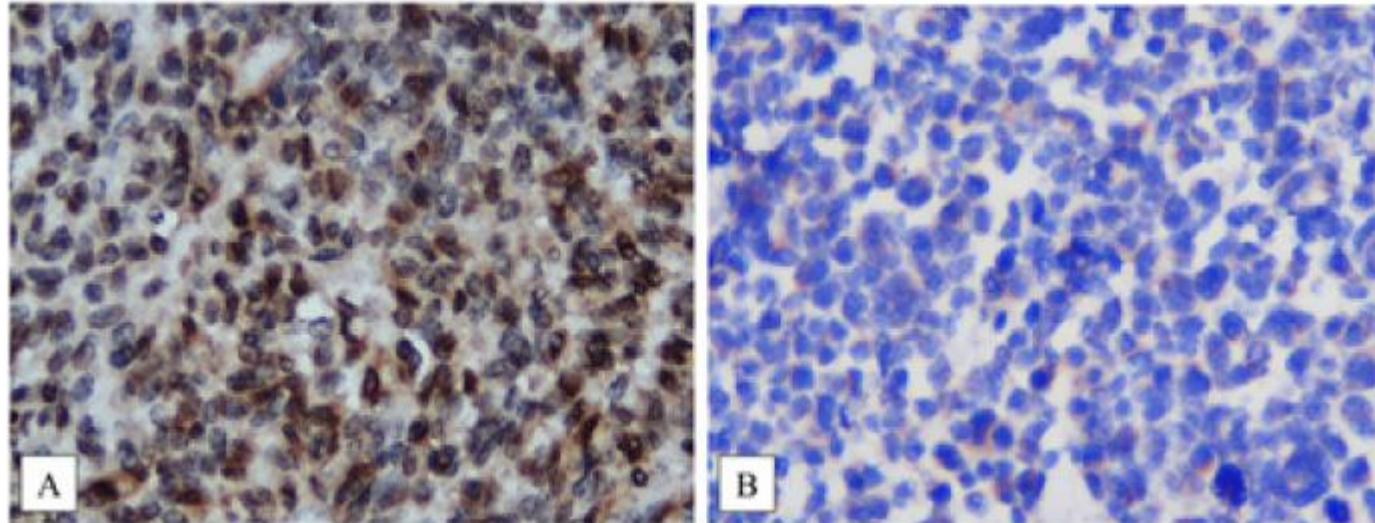


		STP-27			
		methylated	unsure	non-methylated	sum
MS-PCR	methylated	10	2	0	12
	non-methylated	2	0	1	3
sum		14	4	21	24
		kappa = 0.58			SE = 0.10
					98% CI = 0.374 - 0.787



Braczynski et al. High density DNA methylation array is a reliable alternative for PCR-based analysis of the MGMT promoter methylation status in glioblastoma. Pathol Res Pract. 2020 Jan;216(1):152728. doi: 10.1016/j.prp.2019.152728.

Warum eigentlich so kompliziert?



Nicht methyliert

methyliert

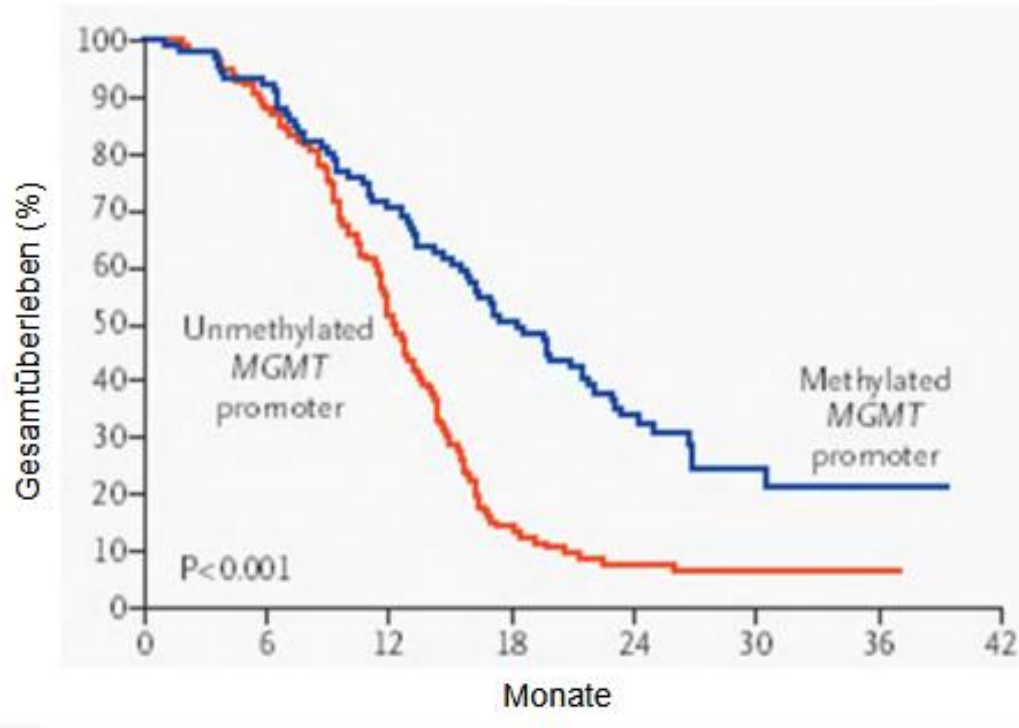
Limitationen der Immunhistochemie

- Kontamination nicht neoplastischer MGMT-exprimierender Zellen
- interobserver Abhängigkeiten
- intratumorale Variation der Proteinexpression
- Standardisierung der MGMT Expression

Sahara et al. Diagnostic Accuracy of Immunohistochemistry in Detecting MGMT Methylation Status in Patients with Glio. Asian Pac J Cancer Prev. 2021 Dec 1;22(12):3803-3808. doi: 10.31557/APJCP.2021.22.12.3803.

Prognostischer Wert: MGMT-Promotormethylierung

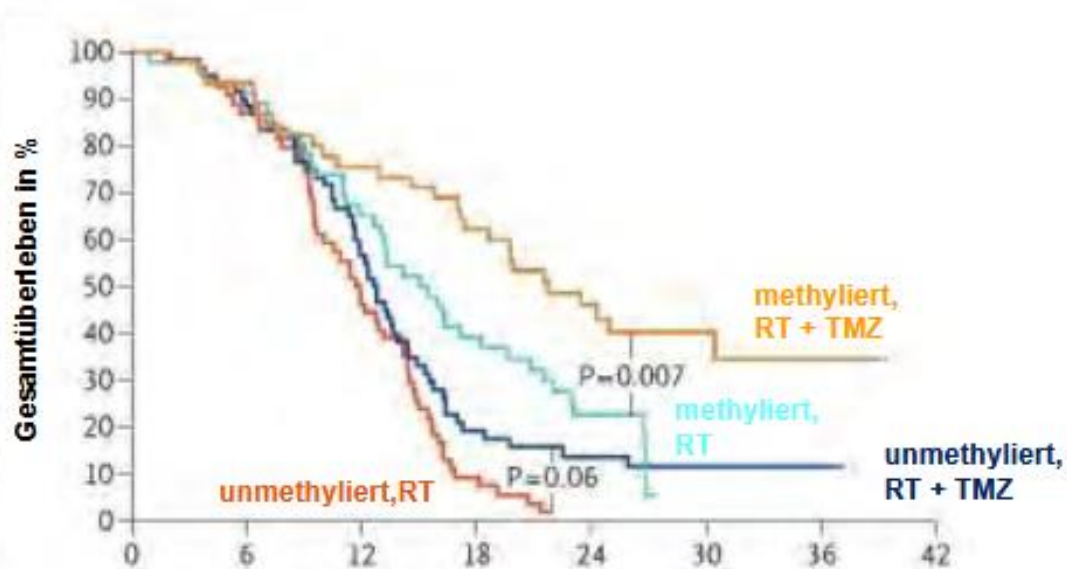
Gesamtüberleben für Patienten mit Glioblastomen in Abhängigkeit vom MGMT-Status



Patienten mit MGMT-methylierten Tumoren weisen ein längeres Gesamtüberleben auf.

Prädiktiver Wert: MGMT-Promotormethylierung

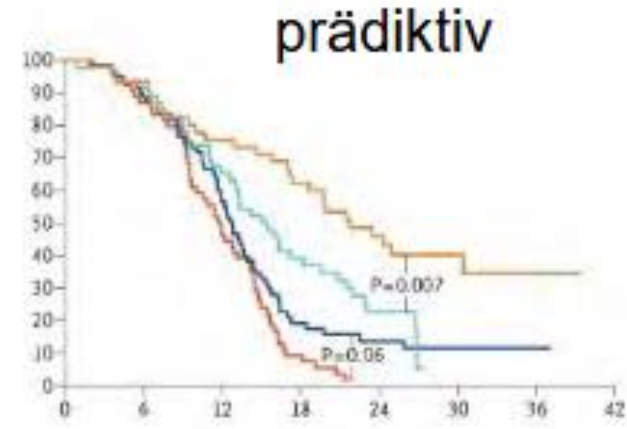
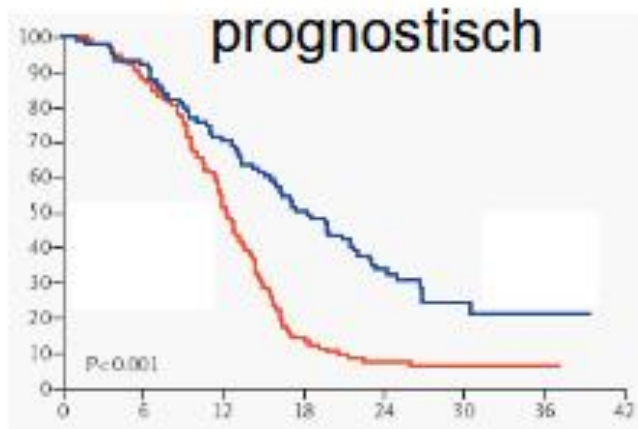
Gesamtüberleben für Patienten mit Glioblastomen in Abhängigkeit vom MGMT-Status und Therapie



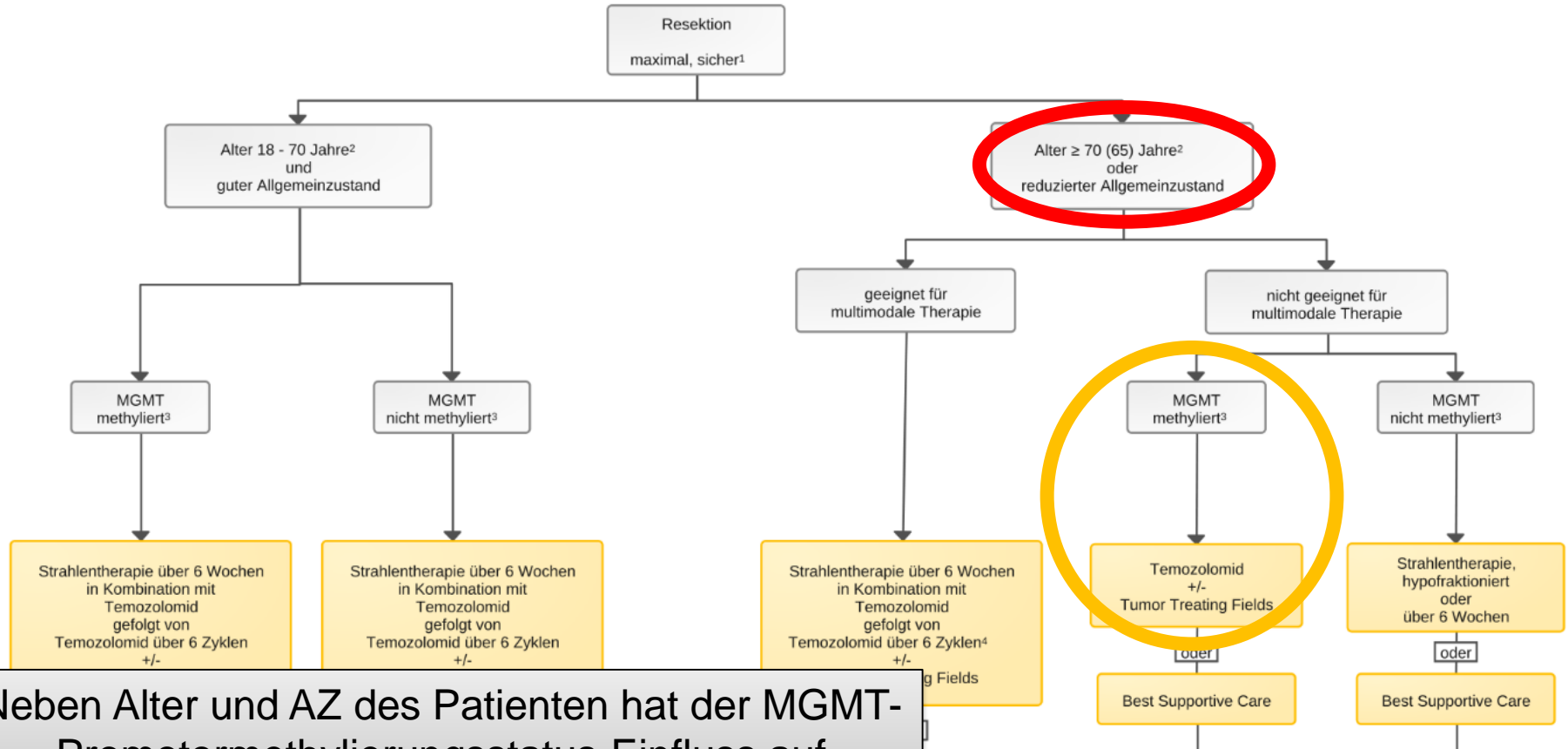
Patienten mit MGMT-methylierten Glioblastomen profitieren stärker von einer zusätzlichen Chemotherapie.

Zusammenfassung MGMT-Promotormethylierung

- MGMT codiert für ein Reparaturenzym
- Expression ist epigenetisch reguliert
- 70% der IDH-mutierten Gliome mit hypermethyliertem MGMT-Promotor
- 50% der IDH-Wildtyp Gliome (v.a. Glioblastom) mit hypermethyliertem MGMT-Promotor
- Pyrosequenzierung mit Bisulfit-konvertierter DNA
- methylierter MGMT-Promotor bei Glioblastomen **prognostisch günstig**
- prädiktiv**: methylierter MGMT-Promotor macht Therapieansprechen auf alkylierende Substanzen (Temozolomid) wahrscheinlicher



Algorithmus für postoperative Therapien beim Glioblastom IDHwt WHO-Grad 4 (adaptiert nach [123])

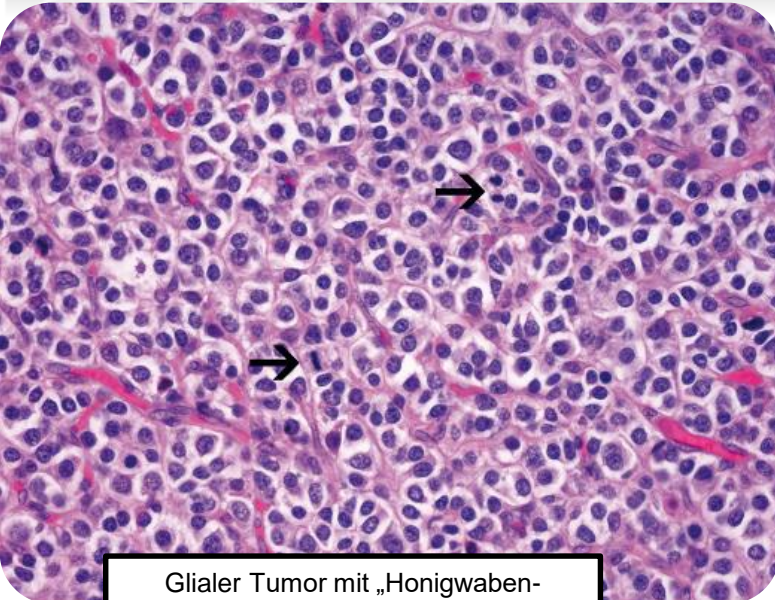
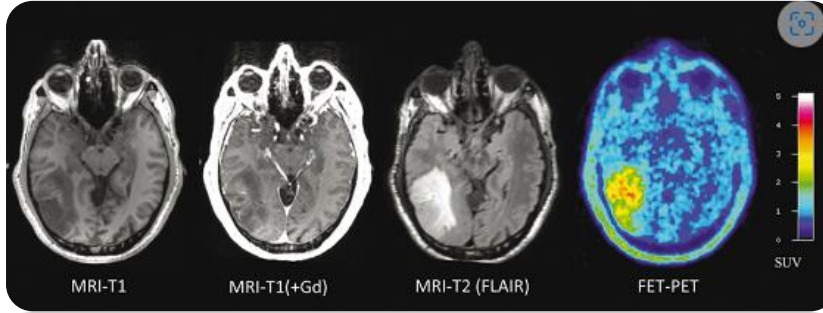


Neben Alter und AZ des Patienten hat der MGMT-Promotormethylierungsstatus Einfluss auf therapeutisches Vorgehen/TMZ Gaben

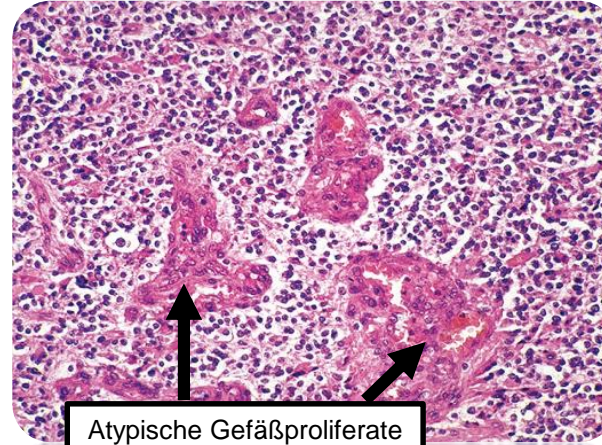
ONKOPEDIA, Gliome im Erwachsenenalter, 08/2021, <https://www.onkopedia.com/s/HYFJ0A>, Zugriff am 03.10.2023 adaptiert

Molekulare Marker Anhand von Beispielen:
1p/19q Status bei Oligodendrogliomen

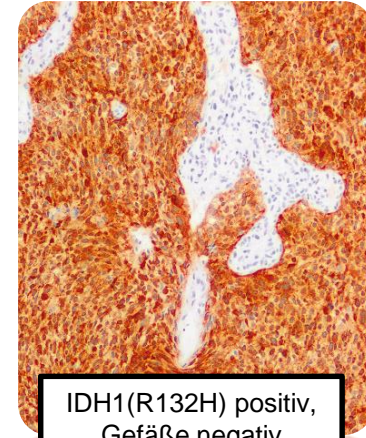
37 jähriger Patient mit Kopfschmerzen, epileptischem Anfall und Sehstörung



Glialer Tumor mit „Honigwabenercheinungsbild“, zartes Gefäßnetz und Mitosen



Atypische Gefäßproliferate

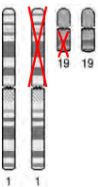


IDH1(R132H) positiv, Gefäße negativ

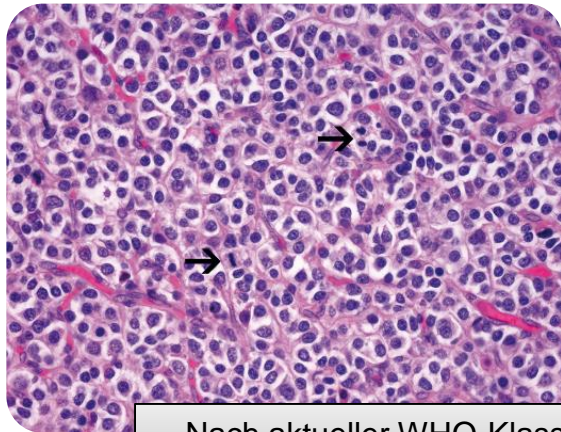
Maligner glialer Tumor mit oligoider Morphologie und nachweisbarer IDH1-Mutation

→ V.a. Oligodendrogliom Grad 3

Nach aktueller WHO-Klassifikation zur Diagnosestellung Nachweis einer 1p/19q-co-Deletion erforderlich

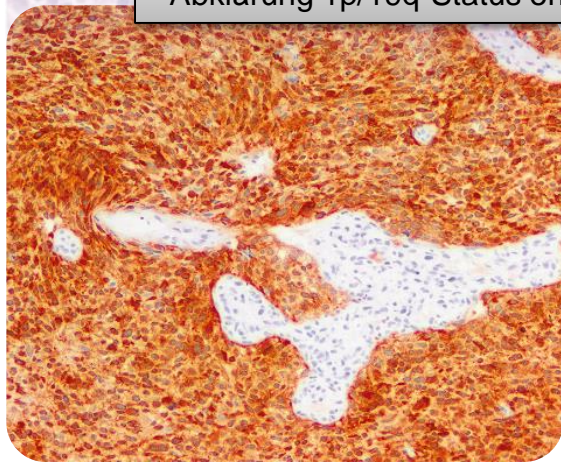


Molekulare Marker Anhand von Beispielen:
1p/19q Status bei Oligodendrogliomen

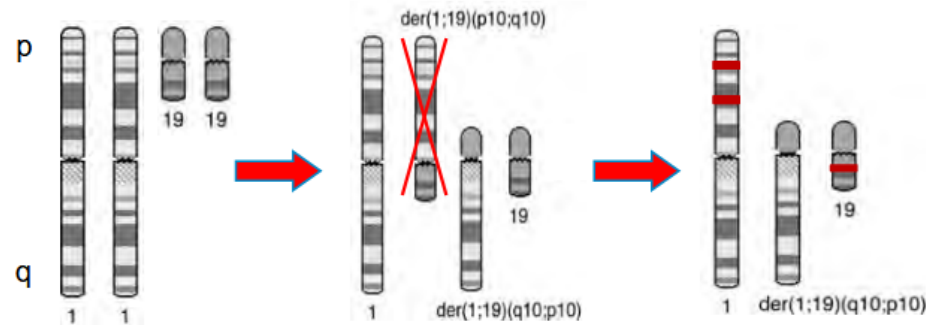


Kombinierter Allelverlust eines kurzen Arms von Chromosom 1 (1p) und eines langen Arms von Chromosom 19 (19q) mit loss of heterozygosity (LOH) **charakteristisch Oligodendrogliome**:
diagnostische, prognostische und prädiktive Relevanz

Nach aktueller WHO-Klassifikation
Abklärung 1p/19q-Status erforderlich



Mechanismus

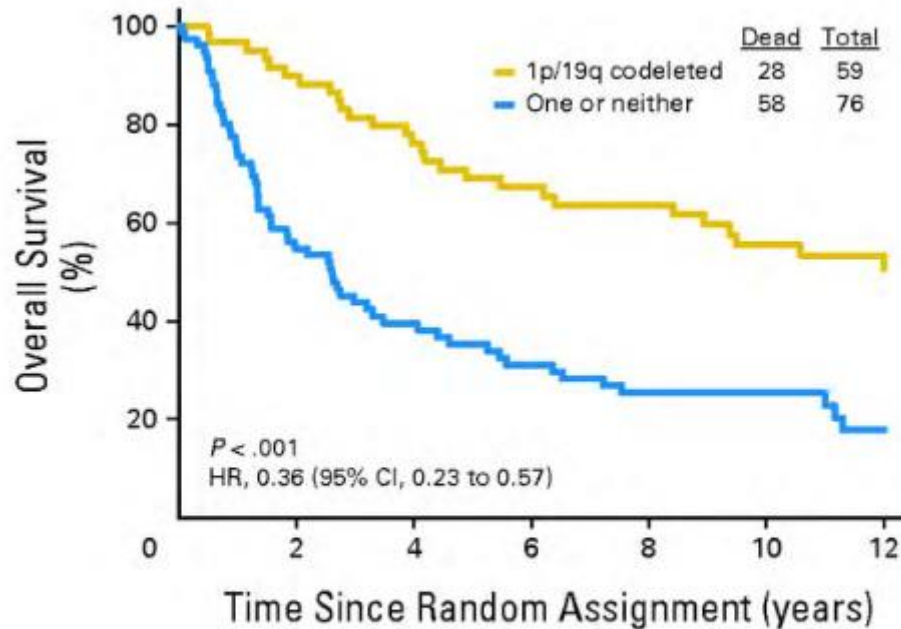


balancierte Translokation, $t(1;19)(q10;p10)$

1. Hit: Verlust des Derivatchromosoms $der(1;19)(p10;q10)$

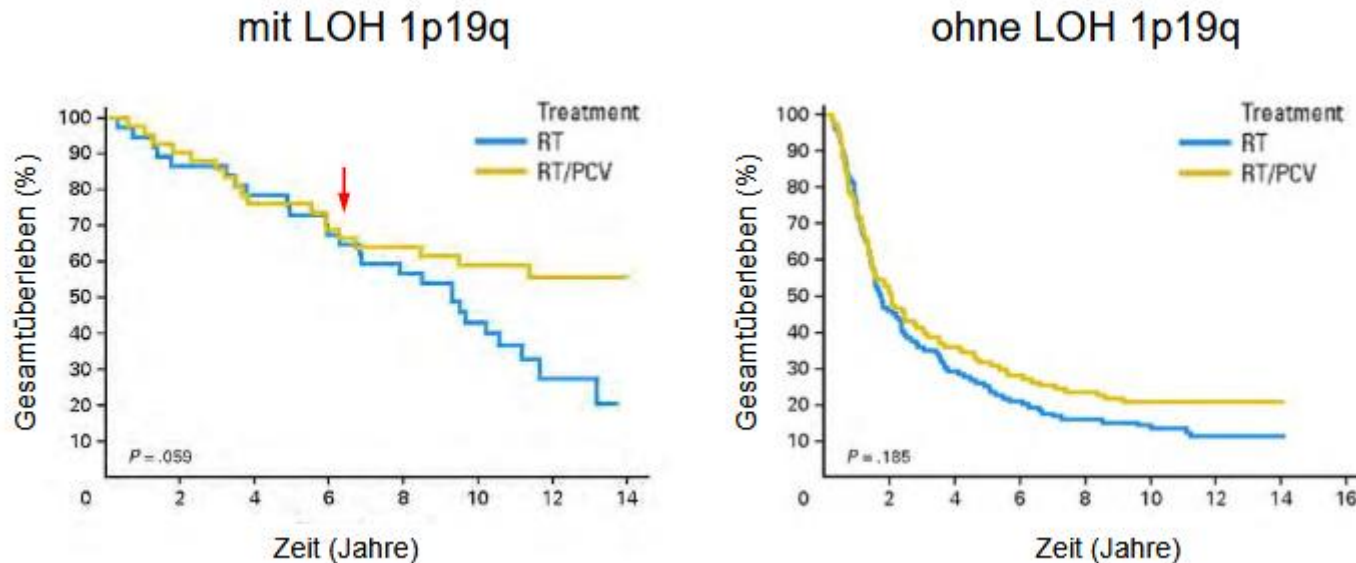
2. HIT: Mutationen in den nicht mehr heterozygoten Abschnitten
- Onkogenese -

Prognostischer Stellenwert 1p/19q co-Deletion



Patienten mit kombiniertem 1p/19q-Verlust weisen ein längeres Gesamtüberleben auf.

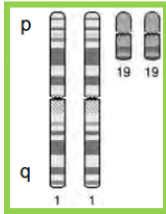
Prädiktiver Stellenwert 1p/19q co-Deletion



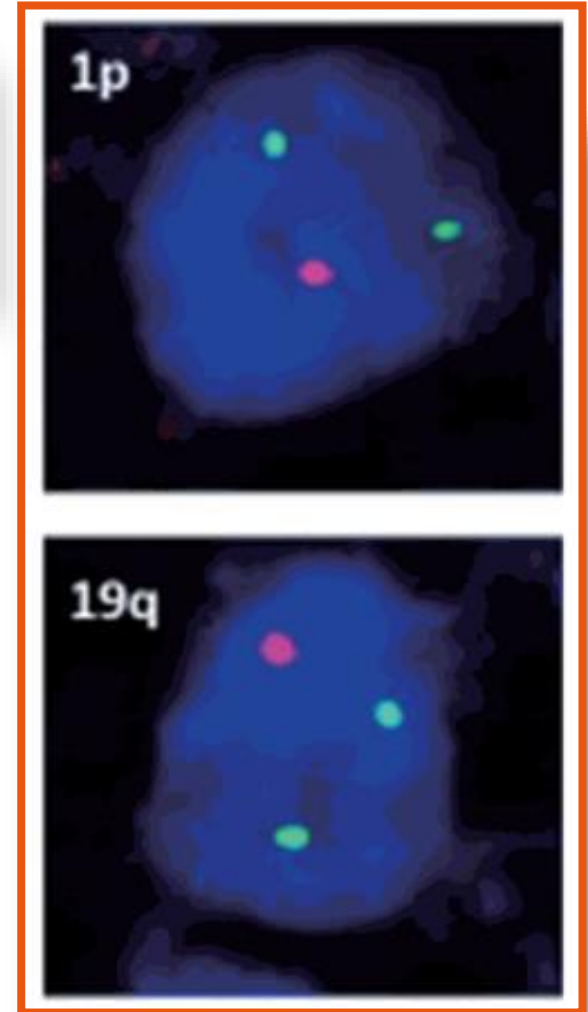
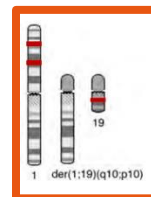
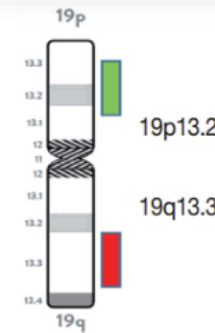
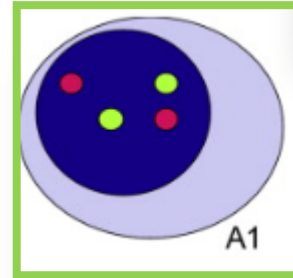
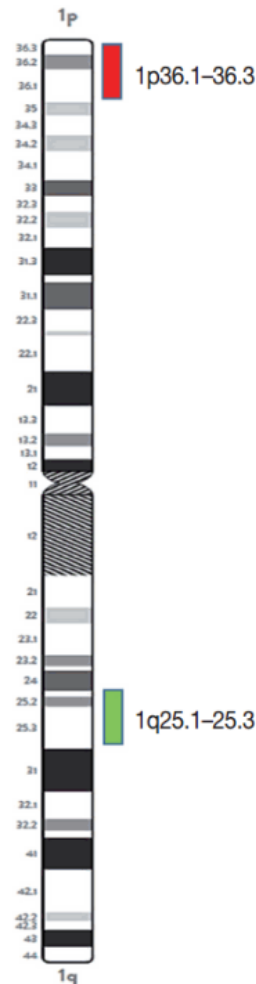
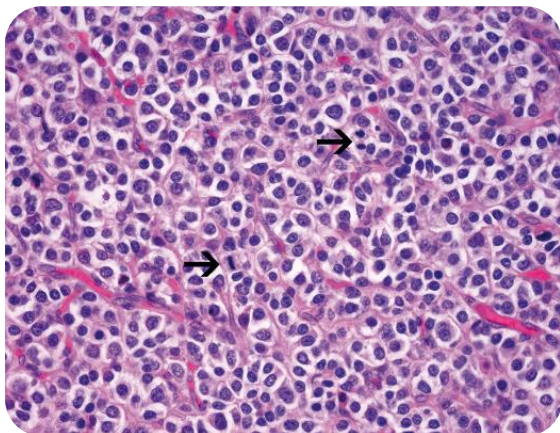
Patienten mit einem LOH 1p19q profitieren von einer Chemotherapie mit PCV im Vergleich zu Patienten ohne LOH PCV

Molekulare Marker Anhand von Beispielen:
1p/19q Status bei Oligodendrogliomen

Nachweismethoden einer 1p/19q co-Deletion



Chromogene/ fluoreszente
in-Situ Hybridisierung
CISH/FISH mit
spezifischen Sonden



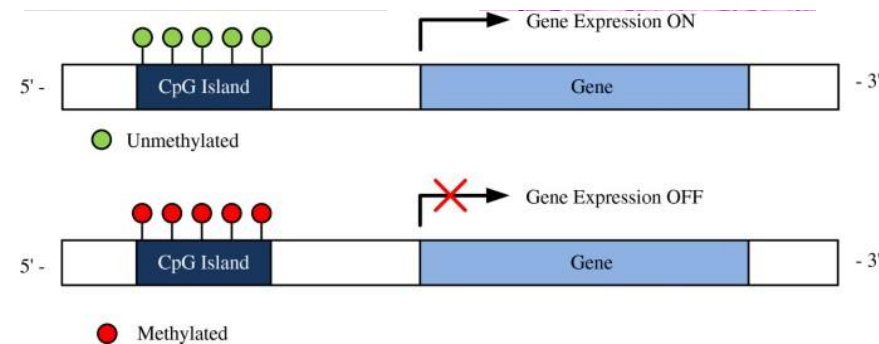
https://www.jpatholm.org/journal/Figure.php?xn=jptm-2017-03-08.xml&id=f3-jptm-2017-03-08&number=16691&p_name=0642_16691
FISHing Tips: What Every Clinician Should Know About 1p19q Analysis in Gliomas Using Fluorescence in situ Hybridisation - ScienceDirect

Article | Published: 14 March 2018

DNA methylation-based classification of central nervous system tumours

David Capper, David T. W. Jones, Martin Sill, Volker Hovestadt, Daniel Schrimpf, Dominik Sturm, Christian Koelsche, Felix Sahm, Lukas Chavez, David E. Reuss, Annekathrin Kratz, Annika K. Wefers, Kristin Huang, Kristian W. Pajtlar, Leonille Schweizer, Damian Stichel, Adriana Olar, Nils W. Engel, Kerstin Lindenberg, Patrick N. Harter, Anne K. Braczynski, Karl H. Plate, Hildegard Dohmen, Boyan K. Garvalov, ... Stefan M. Pfister  + Show authors

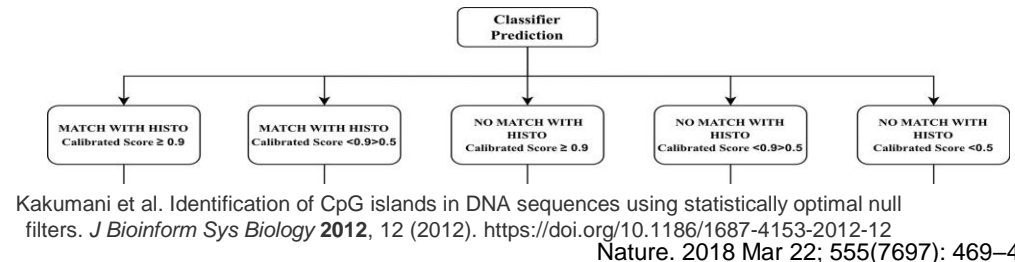
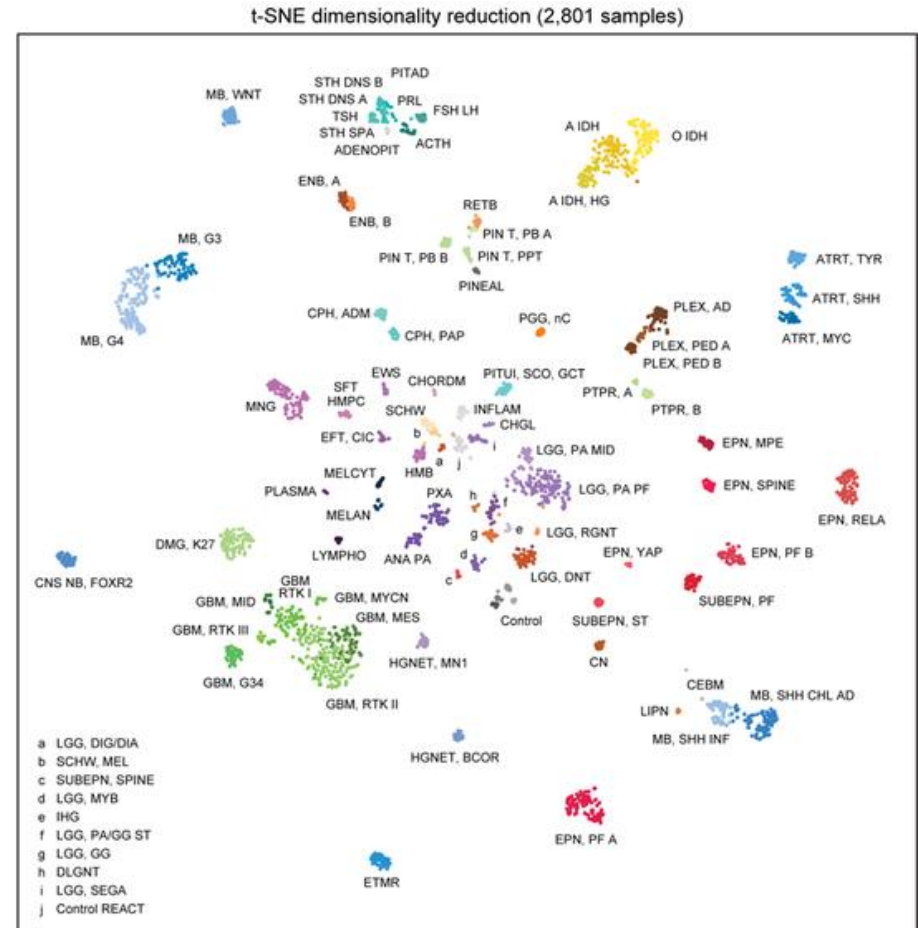
Nature 555, 469–474 (2018) | Cite this article

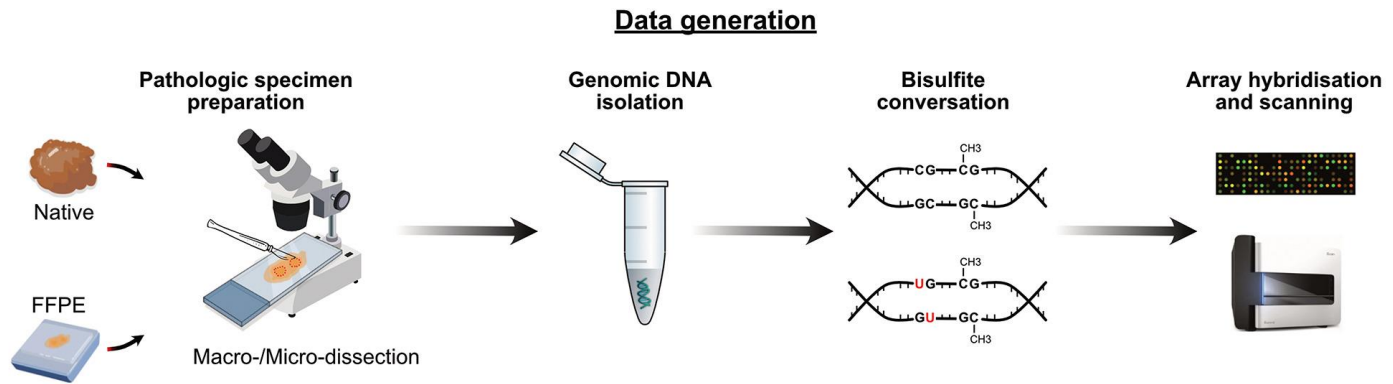


Morphologische Ähnlichkeiten und anatomisch lokalisatorische Häufungen lassen eine biologische Signatur vermuten


Koelsche C, von Deimling A. Methylation classifiers. 2022 Jun;61(6):346-355. doi: 10.1002/gcc.23041. Epub 2022 Apr 14. PMID: 35388566.

<https://neuropathology-web.org/chapter1/chapter1cOligodendroglia.html>
<https://tumourclassification.iarc.who.int/chaptercontent/45/49>






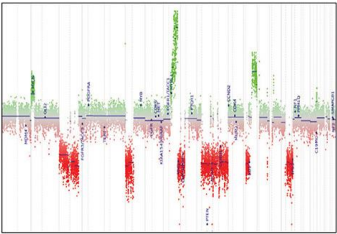
Data visualization and classification



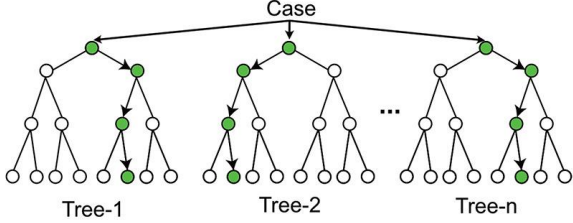
www.moleculareuropathology.org
OR
www.molecularsarcomapathology.org



Copy number analysis

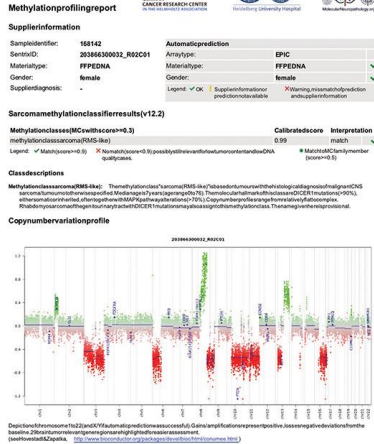


Random forest classifier



Methylation class prediction

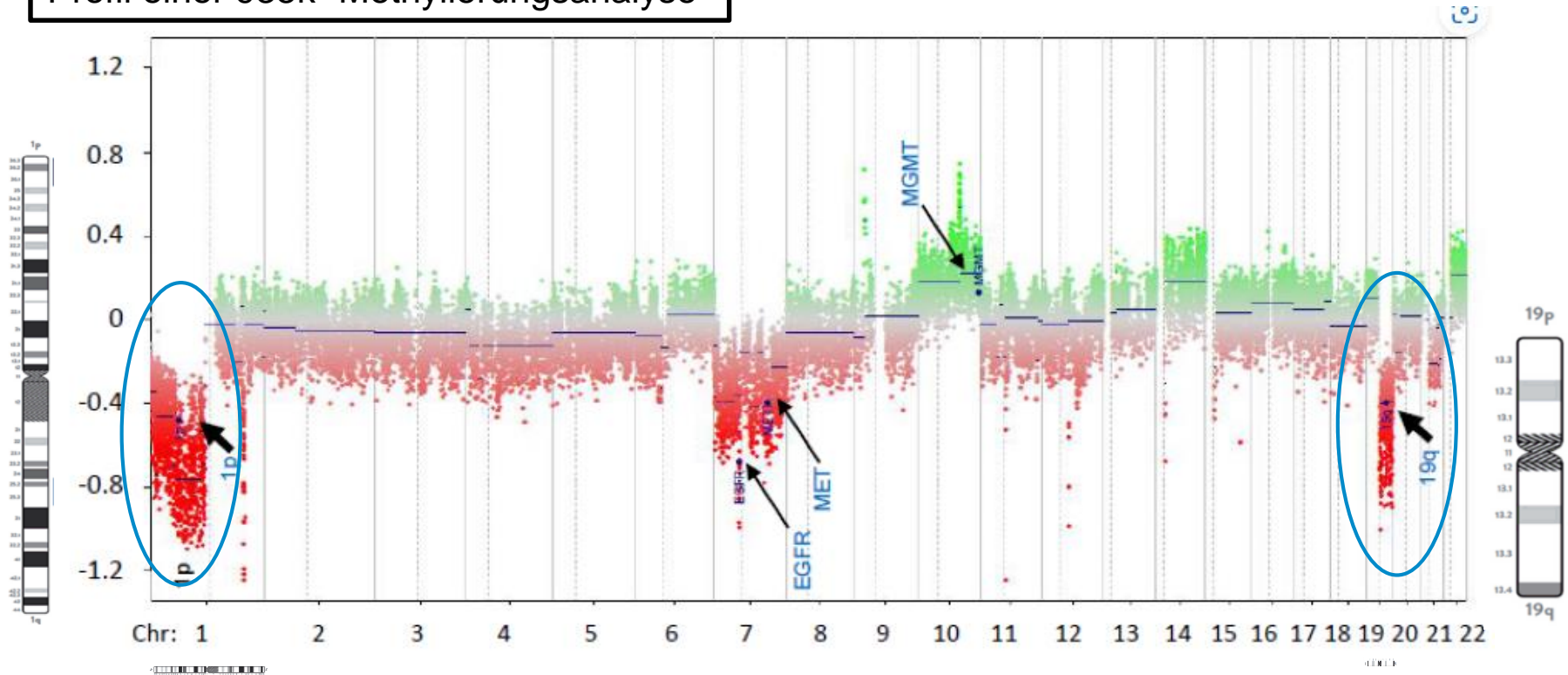
Methylation profiling report



Koelsche C, von Deimling A. Methylation classifiers: Brain tumors, sarcomas, and what's next. *Genes Chromosomes Cancer*. 2022 Jun;61(6):346-355. doi: 10.1002/gcc.23041. Epub 2022 Apr 14. PMID: 35388566.

Nachweismethoden einer 1p/19q co-Deletion

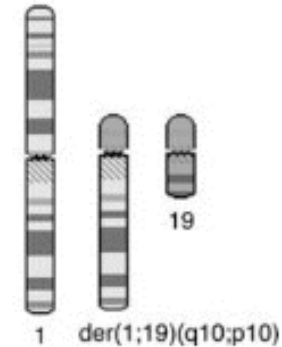
Mittels copy number variation (CNV)
Profil einer 935k- Methylierungsanalyse



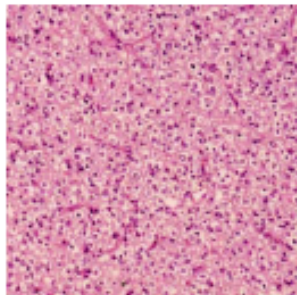
Chromosomale Verluste auf 1p und 19q

Steckbrief 1p/19q co-Deletion

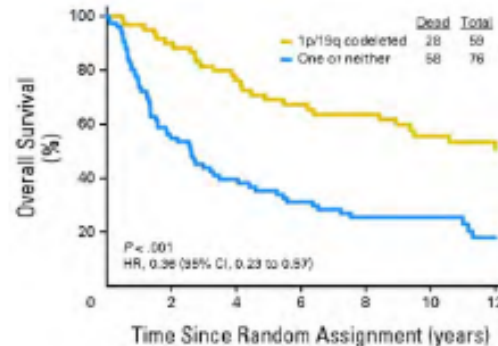
- Verlust eines kurzen Arms von Chromosom 1 (1p) und eines langen Arms von Chromosom 19 (19q)
- diagnostisch
- prognostisch: positiv.
- prädiktiv: positiv prädiktiv für Ansprechen auf zusätzliche Chemotherapie
- Nachweis: FISH / CISH, CNV-Profil aus 935k-Analyse, PCR- Mikrosatellitenanalyse



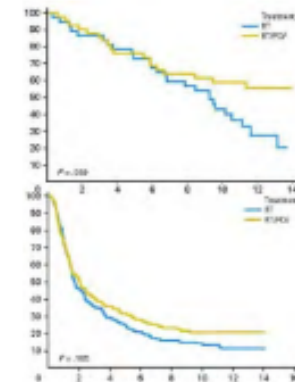
diagnostisch



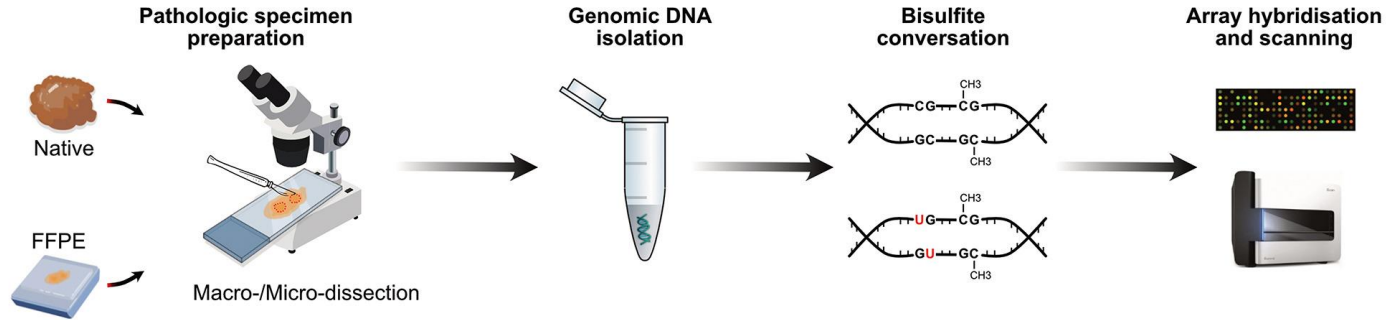
prognostisch



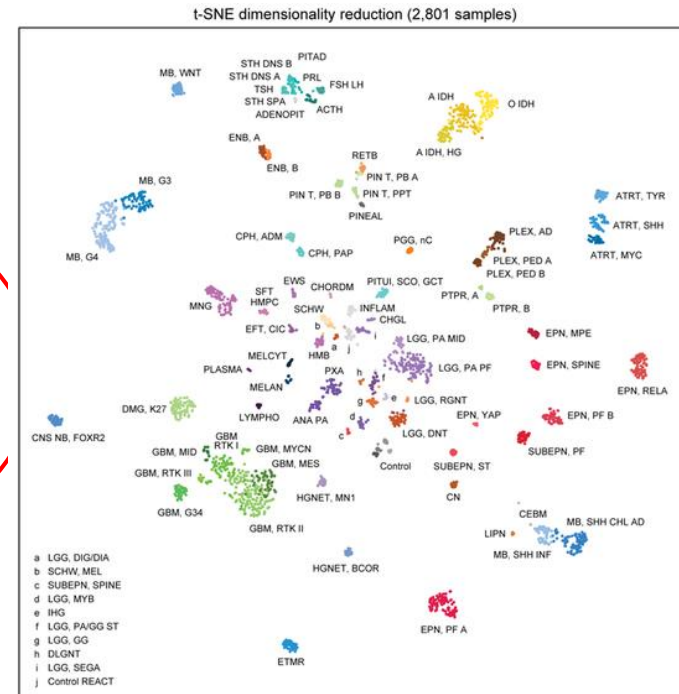
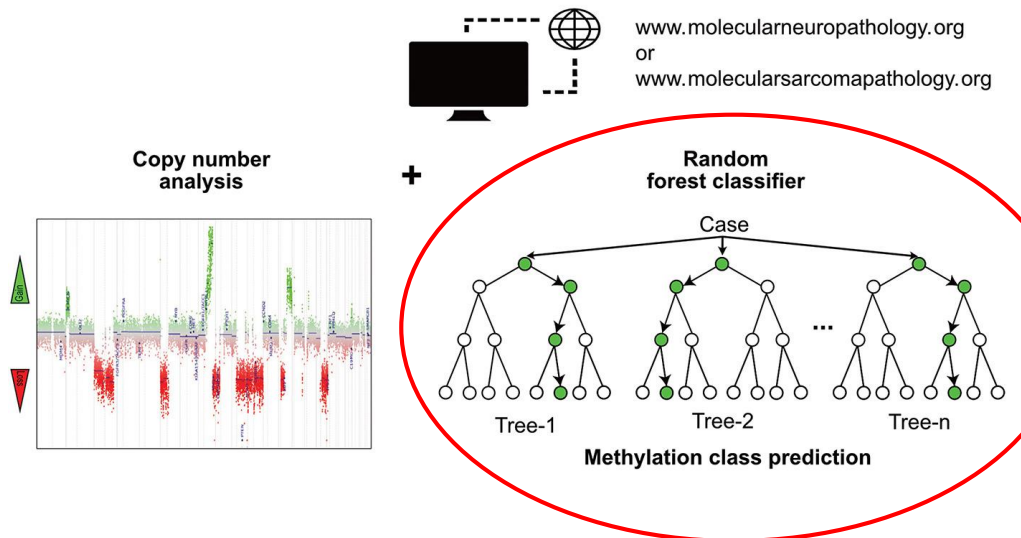
prädiktiv



Data generation



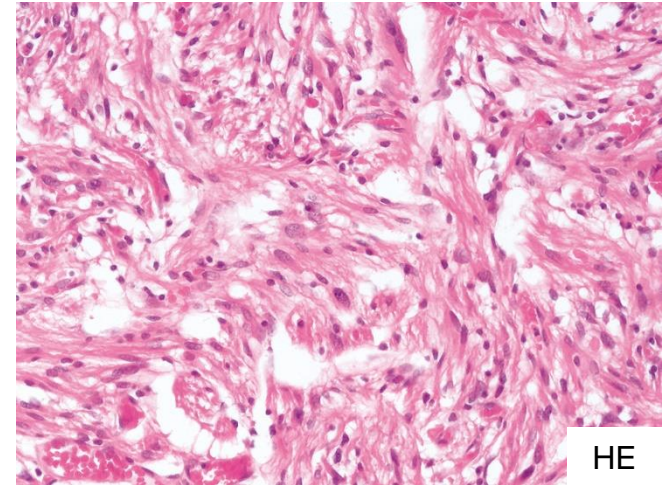
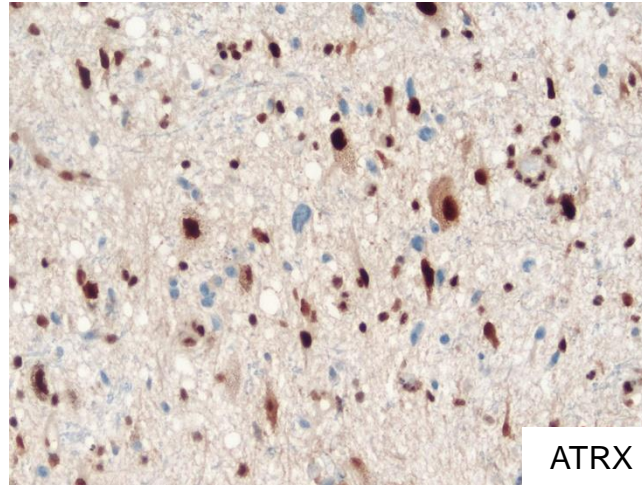
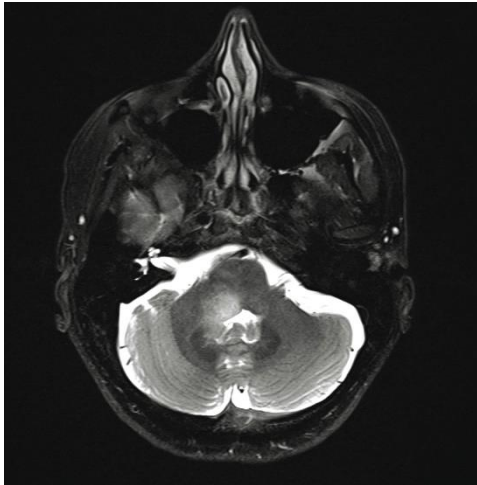
Data visualization and classification



Koelsche C, von Deimling A. Methylation classifiers: Brain tumors, sarcomas, and what's next. *Genes Chromosomes Cancer*. 2022 Jun;61(6):346-355. doi: 10.1002/gcc.23041. Epub 2022 Apr 14. PMID: 35388566.

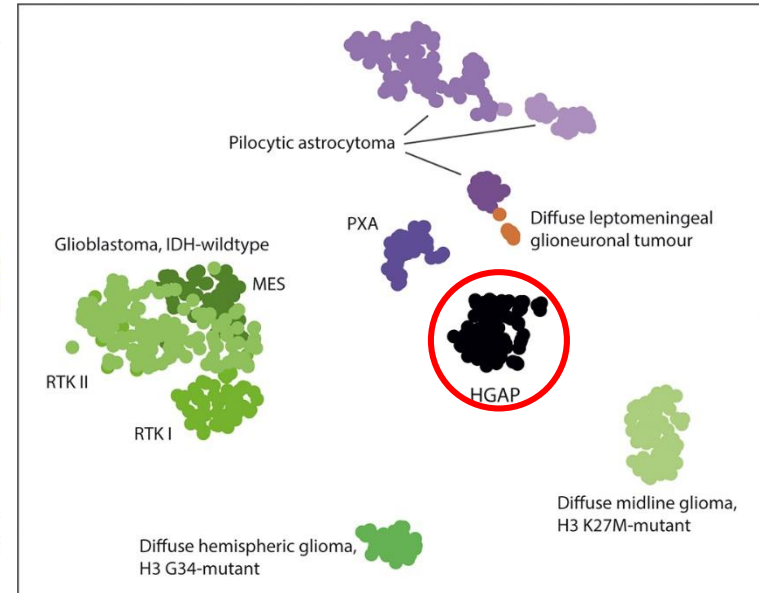
Nature. 2018 Mar 22; 555(7697): 469–474.

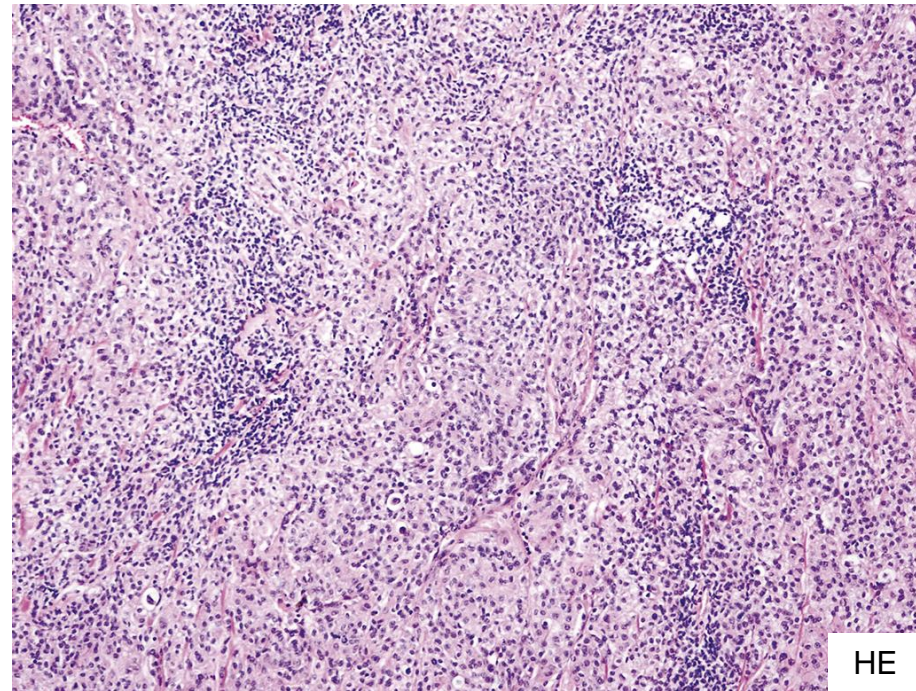
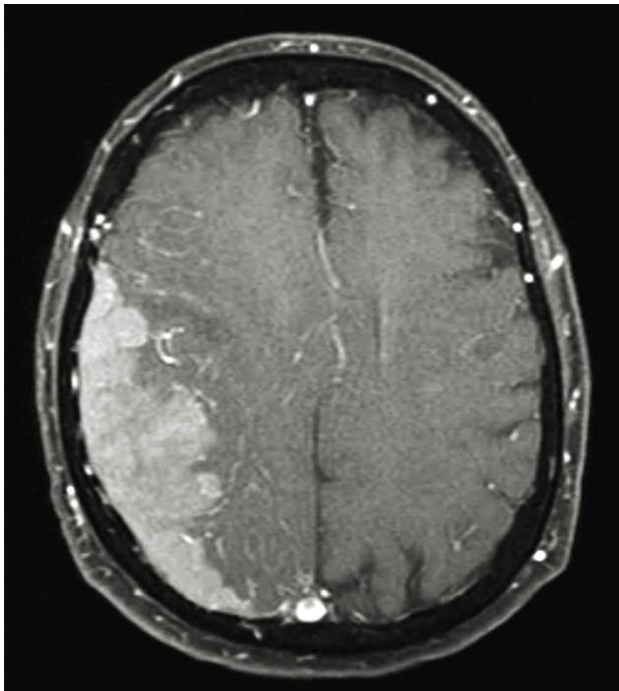
Höhergradiges Astrozytom mit piloiden Eigenschaften: aktuell nur über Methylomanalyse diagnostizierbar!



Diagnostic criteria for high-grade astrocytoma with piloid features

Essential:	
An astrocytic glioma	
AND	
A DNA methylation profile of high-grade astrocytoma with piloid features	
Desirable:	
MAPK pathway gene alteration	
Homozygous deletion or mutation of <i>CDKN2A</i> and/or <i>CDKN2B</i> , or amplification of <i>CDK4</i>	
Mutation of <i>ATRX</i> or loss of nuclear ATRX expression	
Anaplastic, histological features	



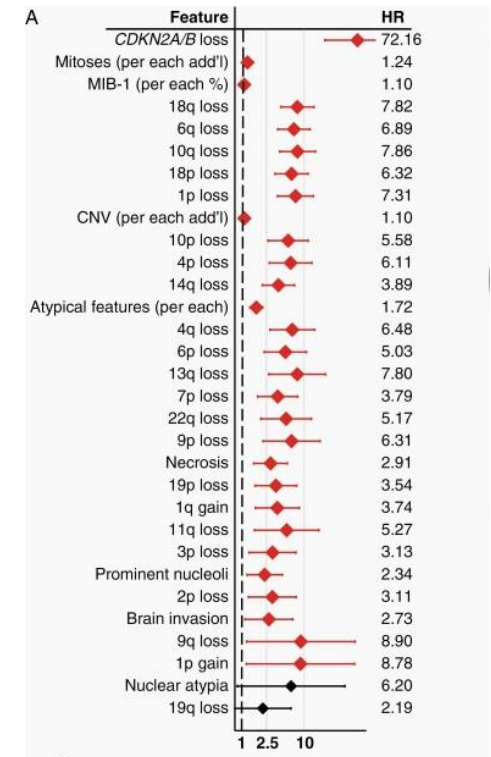
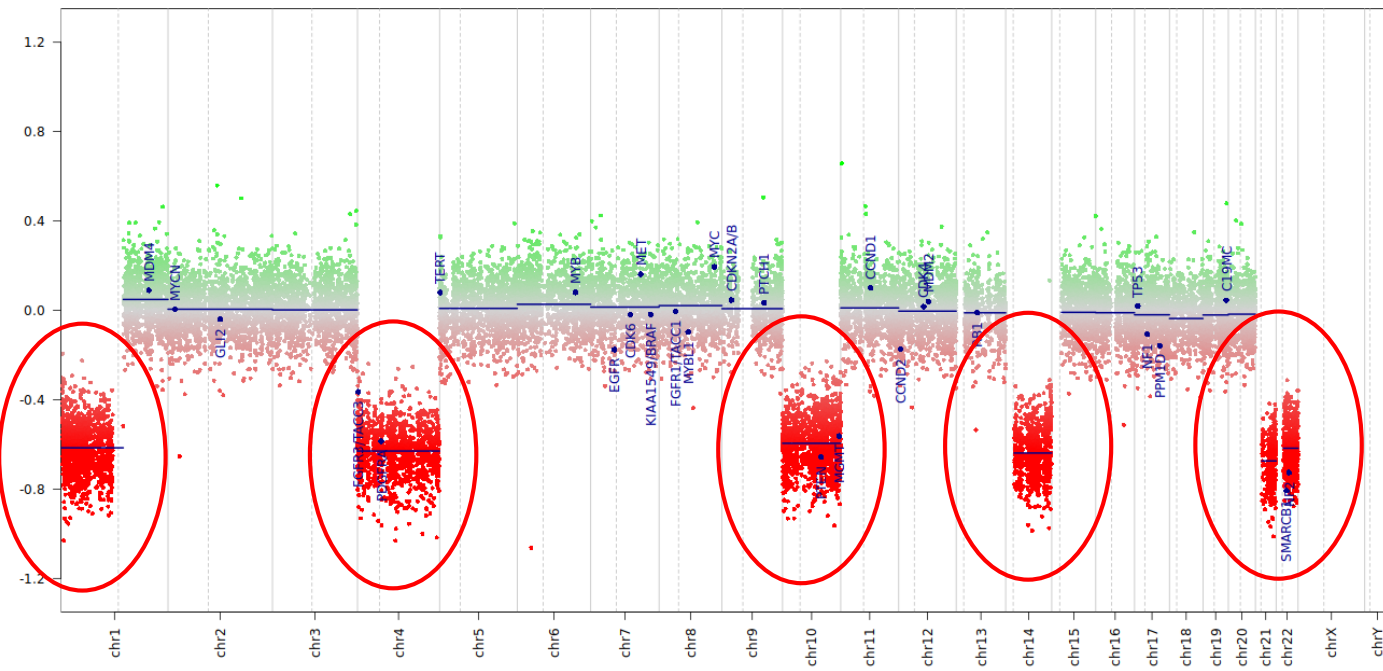


Bildgebend und HE-
diagnostisch starker
Verdacht auf Atypie. Formal
werden die histologischen
Kriterien aber nicht erfüllt.
Was nun?

Histopathologische Kriterien der Atypie

- ≥ 2.5 mitoses/mm² (equating to ≥ 4 mitoses per/10 HPF of 0.16 mm²)
- Hirninfiltration
- Drei der folgenden:
 - hohe Zelldichte,
 - hohe N:C ratio,
 - prominente Nukleoli,
 - "sheeting" (flächenhaftes, strukturloses Wachstum)
 - Nekrosen:

<https://tumourclassification.iarc.who.int/chaptercontent/45/91>



JOURNAL ARTICLE ACCEPTED MANUSCRIPT

cIMPACT-NOW Update 8: Clarifications on molecular risk parameters and recommendations for WHO grading of meningiomas ^{FREE}

Felix Sahn ✉, Kenneth D Aldape, Priscilla K Brastianos, Daniel J Brat, Sonika Dahiya, Andreas von Deimling, Caterina Giannini, Mark R Gilbert, David N Louis, David R Raleigh ... Show more

Neuro-Oncology, noae170, <https://doi.org/10.1093/neuonc/noae170>

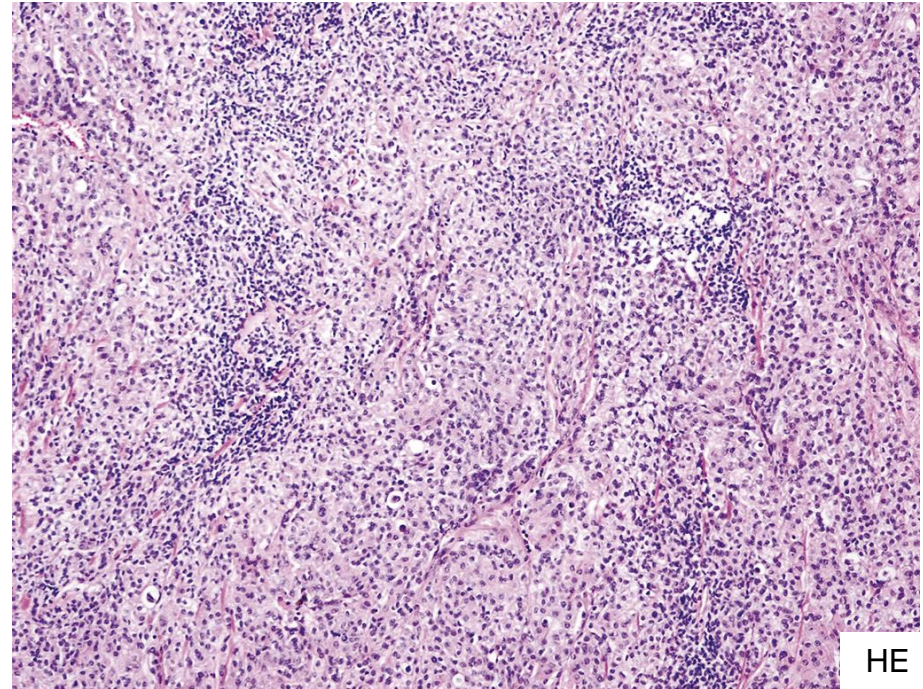
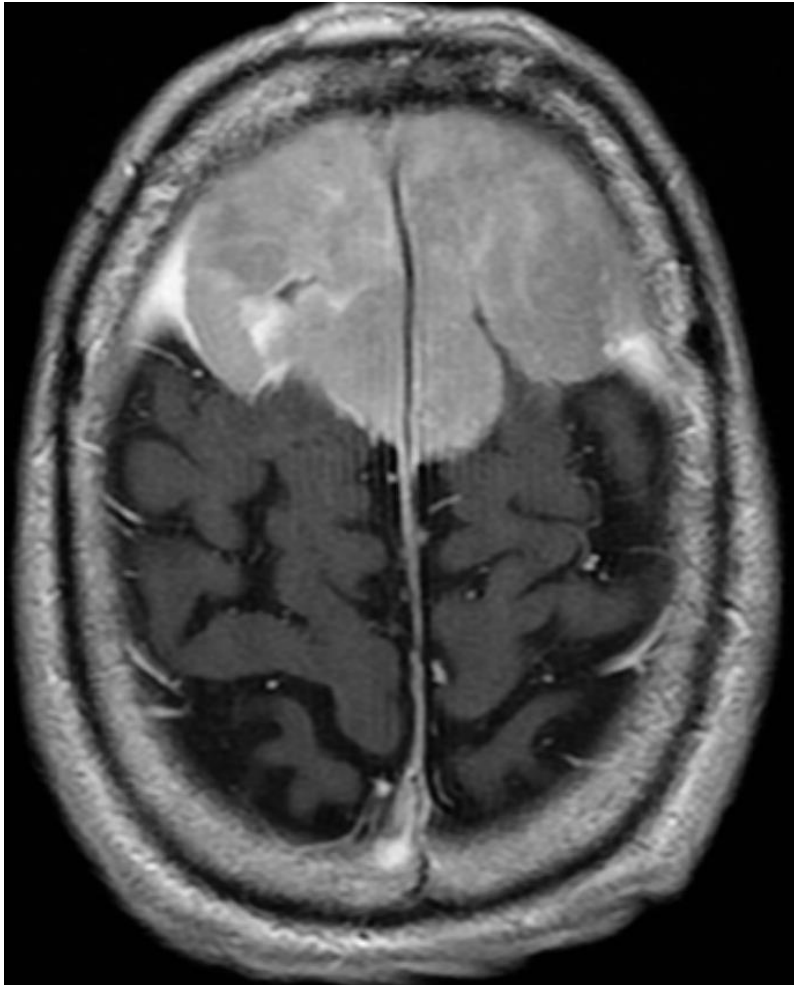
Published: 30 August 2024 Article history ▾

1p/22q-Codeletion als Kriterium für Atypie in neuer WHO erwartbar

C

Points/feature:		Score No. (11 max)	Grade
High-risk molecular alterations	1p- 1 pt 3p- 1 pt 4p/q- 1 pt 6p/q- 1 pt 10p/q- 1 pt 14q- 1 pt 18p/q- 1 pt 19p/q- 1 pt CDKN2A/B- 1 pt		
Mitoses	4-19 1 pt >20 2 pts	Grade 2 2-3	
		Grade 3 ≥4	

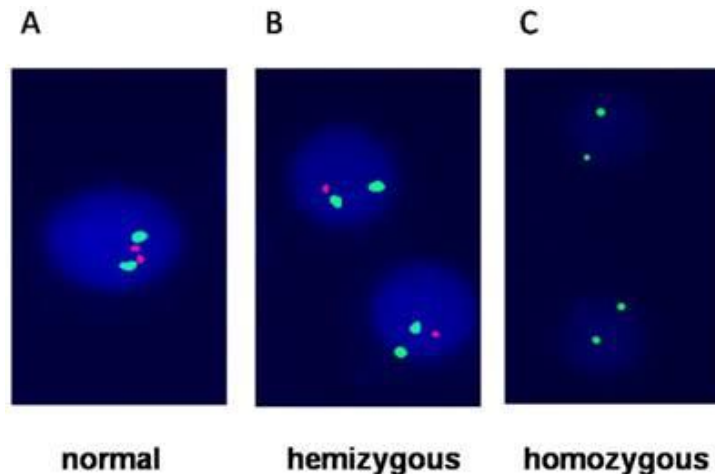
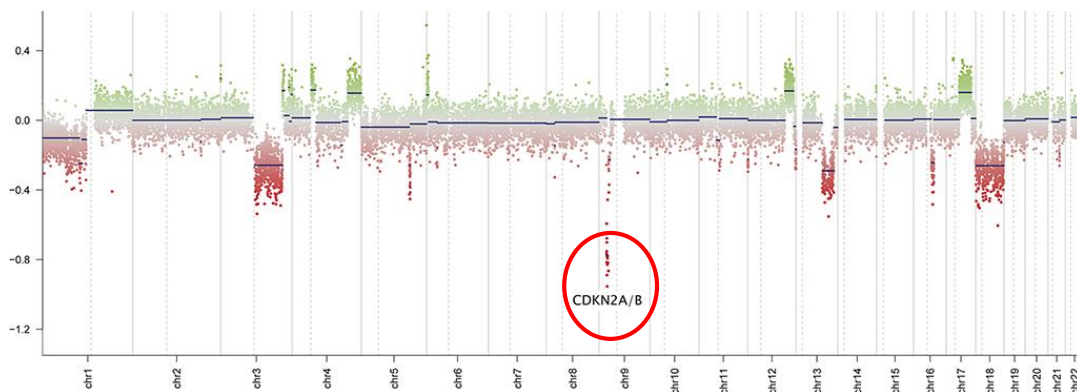
Driver et al. A molecularly integrated grade for meningioma. Neuro Oncol. 2022 May 4;24(5):796-808. doi: 10.1093/neuonc/noab213.



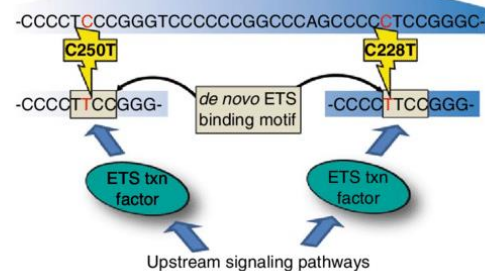
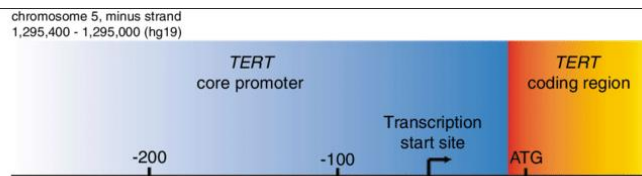
Histologische Kriterien der Anaplasie
 ≥ 12.5 Mitosen/mm² (≥ 20 mitoses/10 HPF of 0.16 mm²)

Bildgebend und HE-diagnostisch
starker Verdacht auf Anaplasie.
Formal werden die histologischen
Kriterien aber nicht erfüllt. Was nun?

CDKN2A/B-Deletion: via Methylom oder CISH



TERT-Promotermutation: via NGS



Molekulare Kriterien der Anplasie bei Meningeomen:

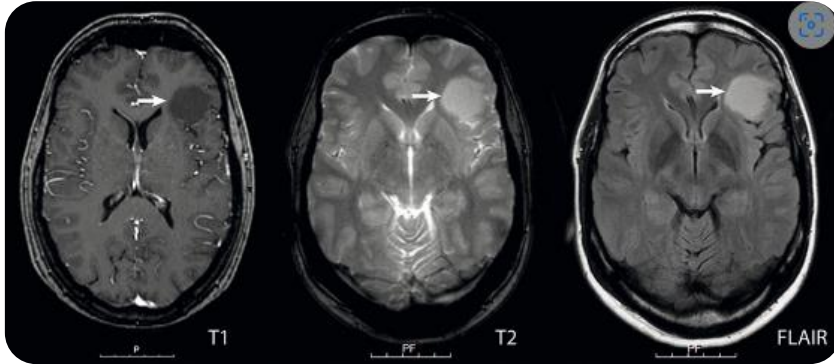
- CDKN2A/B-Deletion
- TERT-Promotermutation

https://www.researchgate.net/profile/Christopher_Pirozzi/publication/258445461/figure/fig1/AS:467496881922048@1488471350191/TERT-promoter-mutations-generate-de-novo-ETS-binding-sites-The-C228T-mutation-within-the-png

Xu et al. *J Cancer* 2015; 6(11):1114-1120. doi:10.7150/jca.11959.
<https://www.jcancer.org/v06p1114.htm>

Molekulare Marker Anhand von Beispielen:
Molekulare Signatur in Frühformen von Gliomen

75 jähriger Patient, epileptischem Anfall



MR-morphologisch in T1 hypointense intraaxiale
Läsion ohne Kontrastmittelaufnahme, radiologisch
V.a. hirneigenen Tumor

Probeentnahme geplant



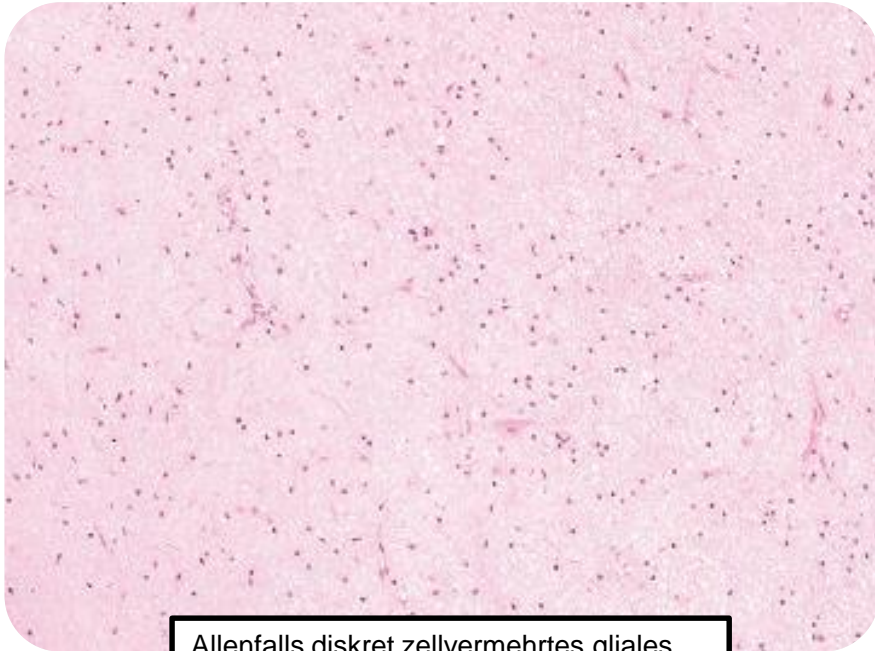
Neurochirurg gibt bei
Probeentnahme an,
dass er sich
intraoperativ nicht
ganz sicher sei, ob er
in der Läsion ist

Allenfalls diskret zellvermehrtes gliales Gewebe,
Keine Mitosen/ Gefäßproliferate oder Nekrosen;
Morphologisch kein eindeutiger Tumor. Molekular?

NGS und
935k (EPIC)
angefordert

<https://th.bing.com/th/id/OIP.D9g93jYW9xwch3nlqwpZBQHaE6?w=241&h=180&c=7&r=0&o=5&pid=1.7>
Blue-BooksOnline (WHO.int)

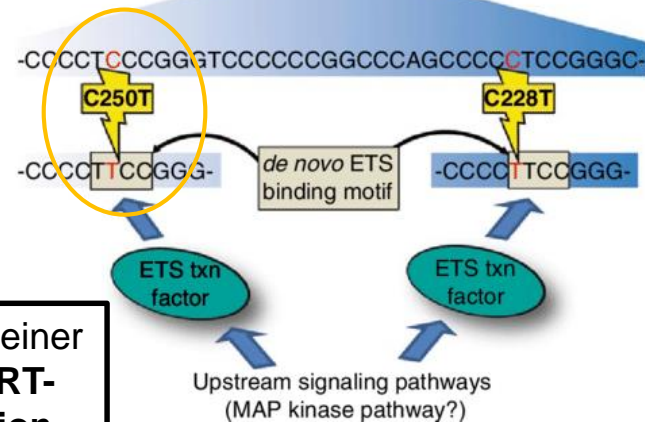
Molekulare Marker Anhand von Beispielen:
Molekulare Signatur in Frühformen von Gliomen



Allenfalls diskret zellvermehrtes gliales Gewebe, keine Mitosen/ Gefäßproliferate oder Nekrosen; Morphologisch kein eindeutiger Anhalt für Tumor. Molekular?

NGS: Nachweis einer pathogenen TERT-Promotormutation „C250T“, H3 und IDH-Wildtyp

chromosome 5, minus strand
1,295,400 - 1,295,000 (hg19)



Molekulare Marker Anhand von Beispielen: Molekulare Signatur in Frühformen von Gliomen

Ergebnis 935k Methylierungsanalyse:
Methylierungsklasse Glioblastom, IDH-Wildtyp, RTK II
Das copy number variation (CNV) Profil u.a. mit **Zugewinnen auf Chromosom 7** und Verlusten auf **Chromosom 10 (Chr.7+/10-)**
Bei markierten Einzelgenen Hinweis auf **EGFR-Amplifikation** und **CDKN2A/B Deletion**

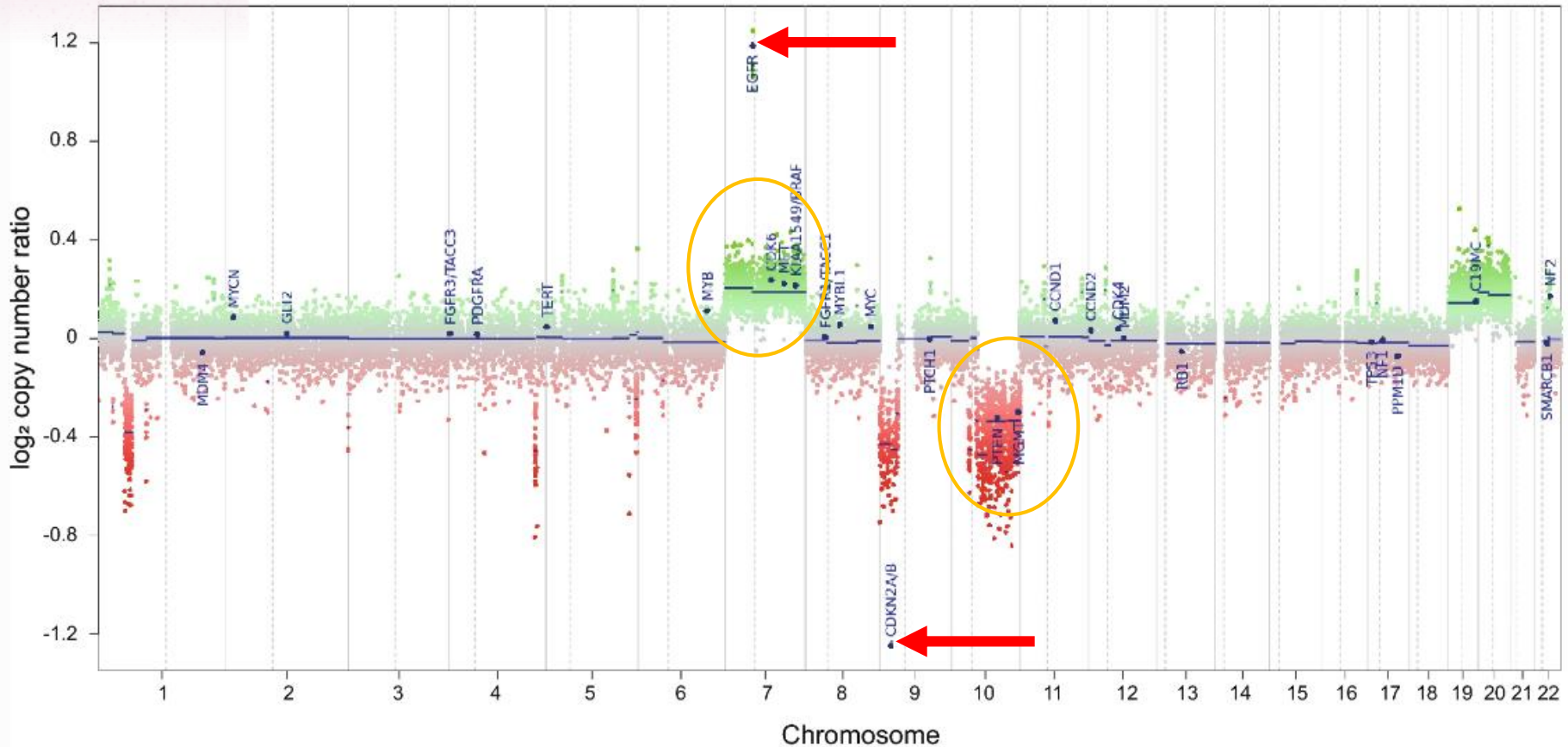
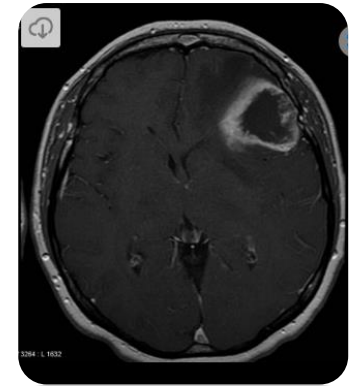
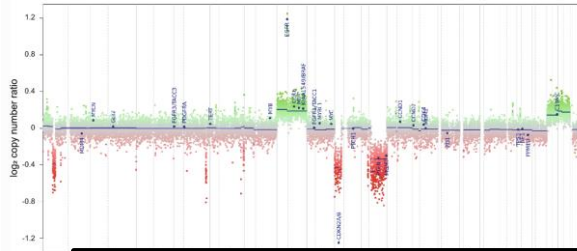
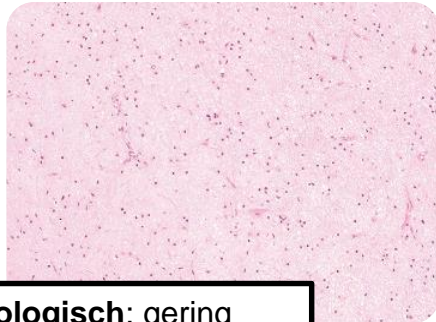
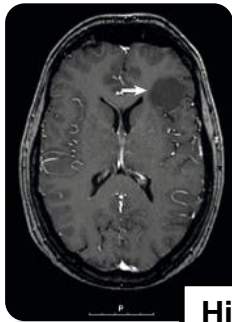


Figure 1 | Practical implementation of DNA methylation and copy-number-based CNS tumor diagnostics: the Heidelberg experience | SpringerLink

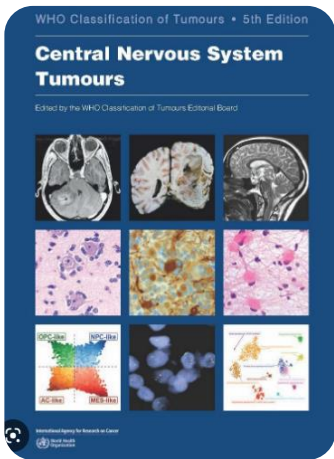
Molekulare Marker Anhand von Beispielen:
Molekulare Signatur in Frühformen von Gliomen



Histologisch: gering zellvermehrtes gliales Gewebe ohne Mitosen, Gefäßproliferate oder Nekrosen

Molekular: pathogene pTERT-Mutation „C250T“, IDH-/H3 Wildtyp, Methylierungsklasse Glioblastom RTKII, im CNV-Profil **Chr.7+/10- Signatur**, Hinweis auf **EGFR-Amplifikation** und CDKN2A/B- Deletion, MGMT-nicht methyliert

Nach 6 Monaten lokales Rezidiv, nun mit KM-Aufnahme



Essential diagnostic criteria for glioblastoma CNS WHO grade 4

An IDH-wildtype, H3-wildtype, diffuse astrocytic glioma

AND

One or more of the following:

- Microvascular proliferation
- Necrosis
- **TERT promoter mutation**
- **EGFR gene amplification**
- **+7/-10 chromosome copy-number alterations**

Desirable:

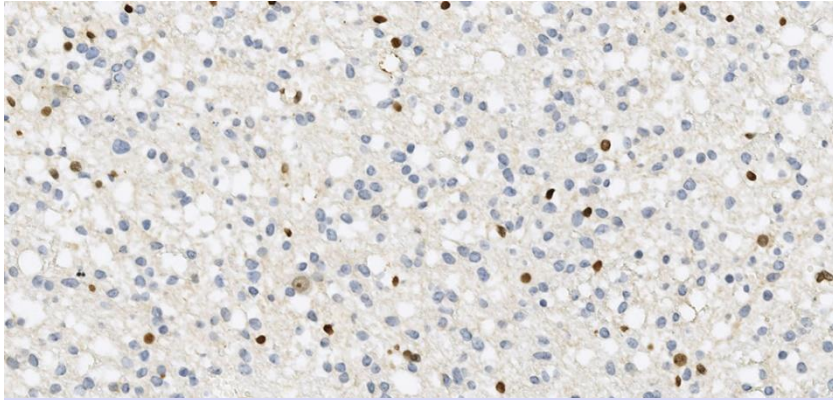
DNA methylation profile of glioblastoma, IDH-wildtype

Integrierte Diagnose:
Glioblastom, IDH-Wildtyp, ZNS WHO-Grad 4

Mittels molekularer Signaturen können morphologische (noch) unauffällige (Frühformen) oder Proben aus dem Randbereich einer Läsion als Tumor identifiziert werden

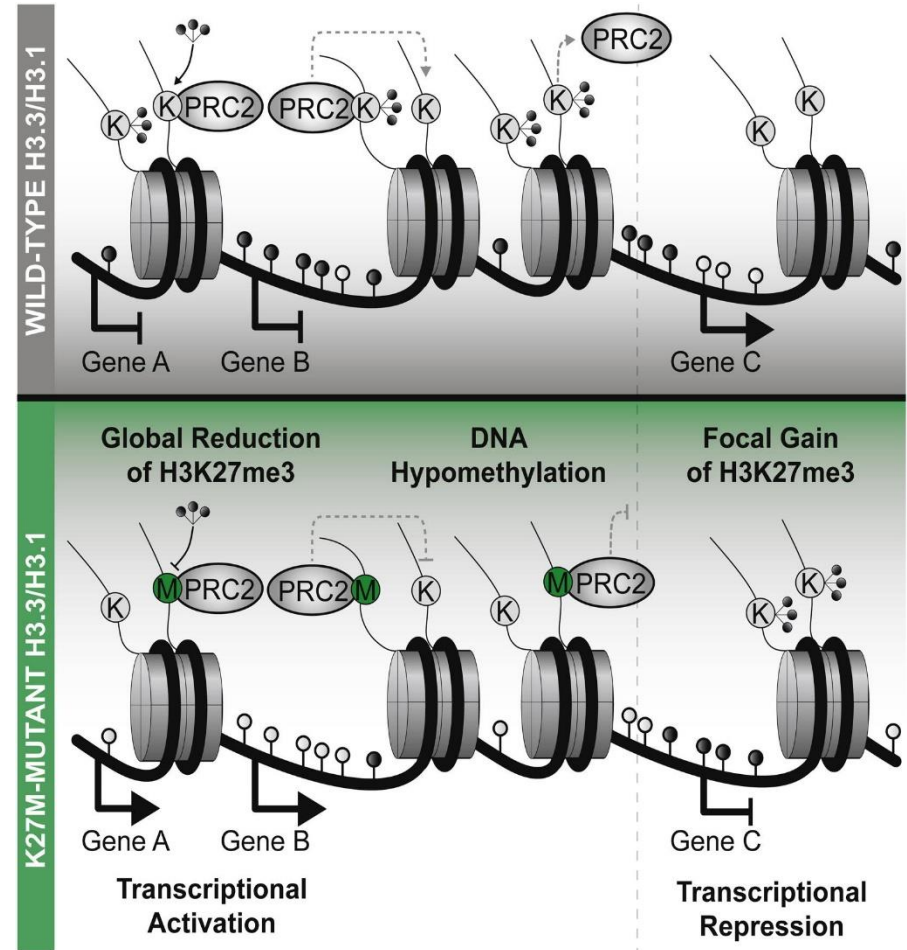
Figure 1 | Practical implementation of DNA methylation and copy-number-based CNS tumor diagnostics: the Heidelberg experience | SpringerLink Blue-BooksOnline (WHO.int) Case courtesy of Frank Gaillard, Radiopaedia.org, rID: 5132

Immunohistochemischer Marker einer molekularen Veränderung: H3K27me3



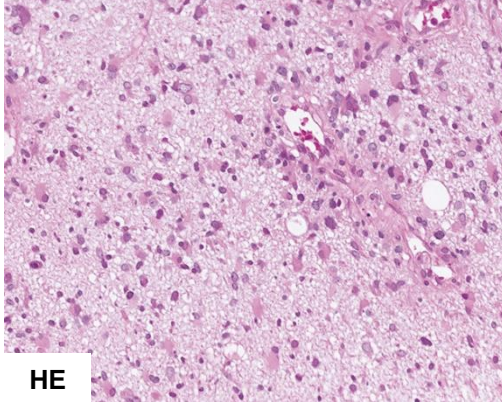
H3K27me3

Verlust von H3K27me3 führt zu epigenetischen und Genexpressionsveränderungen, beispielsweise durch eine H3K27M-Mutation.

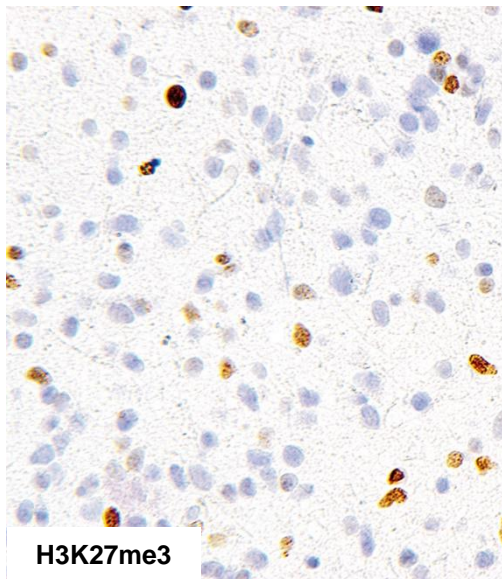


Bender et al. Reduced H3K27me3 and DNA hypomethylation are major drivers of gene expression in K27M mutant pediatric high-grade gliomas. *Cancer Cell*. 2013 Nov 11;24(5):660-72. doi: 10.1016/j.ccr.2013.10.006. Epub 2013 Oct 31.

Diagnose: Diffuses Mittelliniengliom, H3K27-alteriert, ZNS WHO-Grad 4



HE

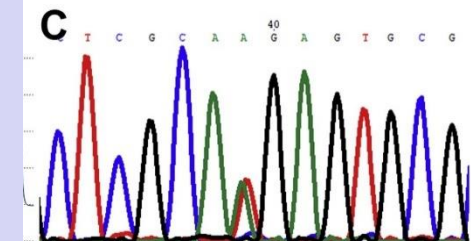
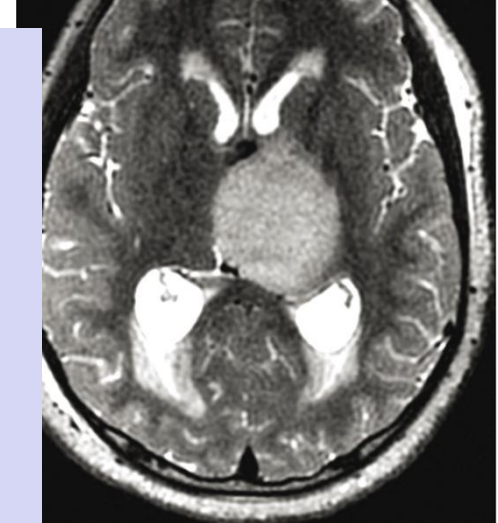


H3K27me3

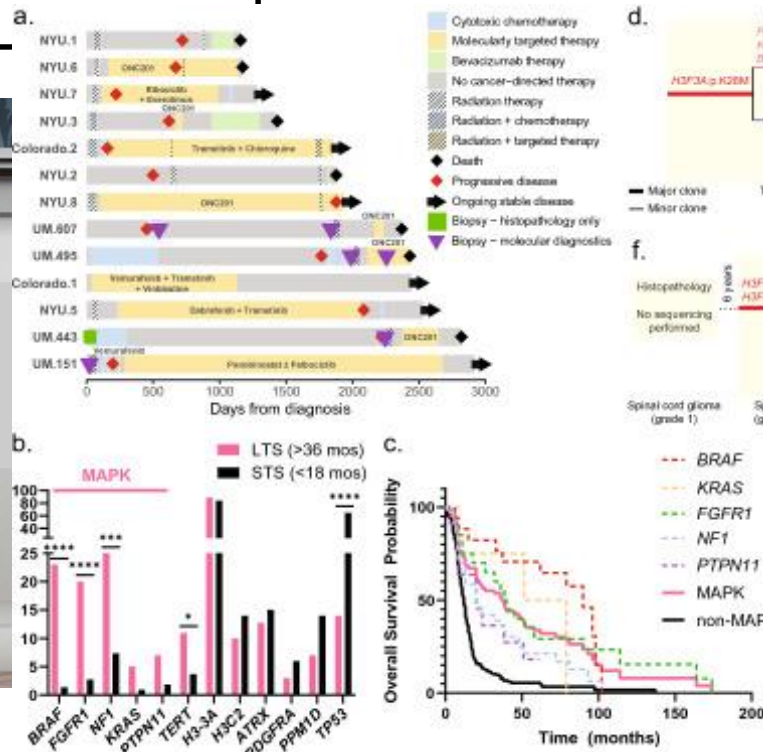
- Diffuses IDH-Wildtyp-Gliom
- Verlust der Expression von H3K27me3
- 3 Subtypen
 - H3K27M-Mutation (selten H3K27I)
 - EZHIP-Überexpression
 - EGFR-alteriert
- Eigenes Methylomprofil

Klinisch:

Kinder, junge und ältere Erwachsene



Molekulare Marker anhand von Beispielen:
 Diagnostisches Problem: Diffuses Mittelliniengliom
 Grad ...?

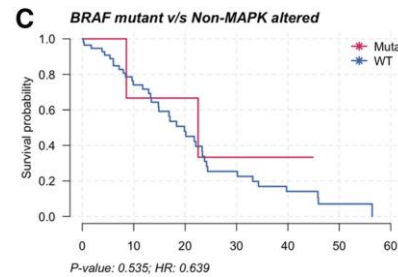
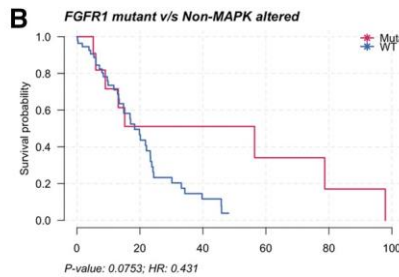
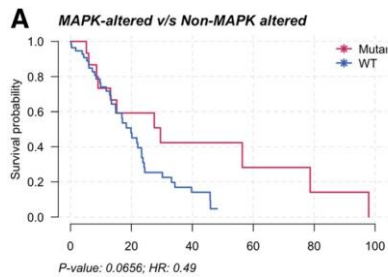
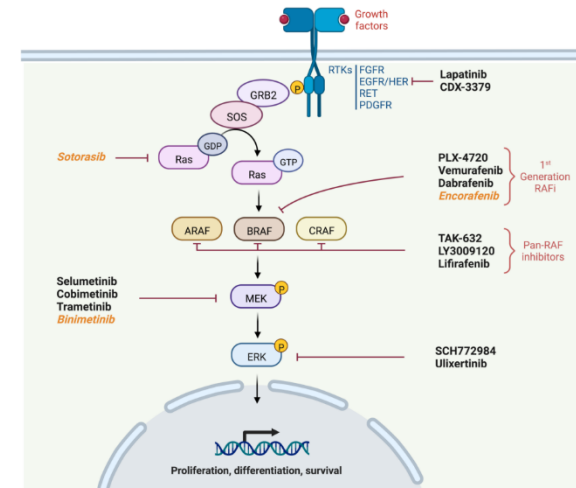
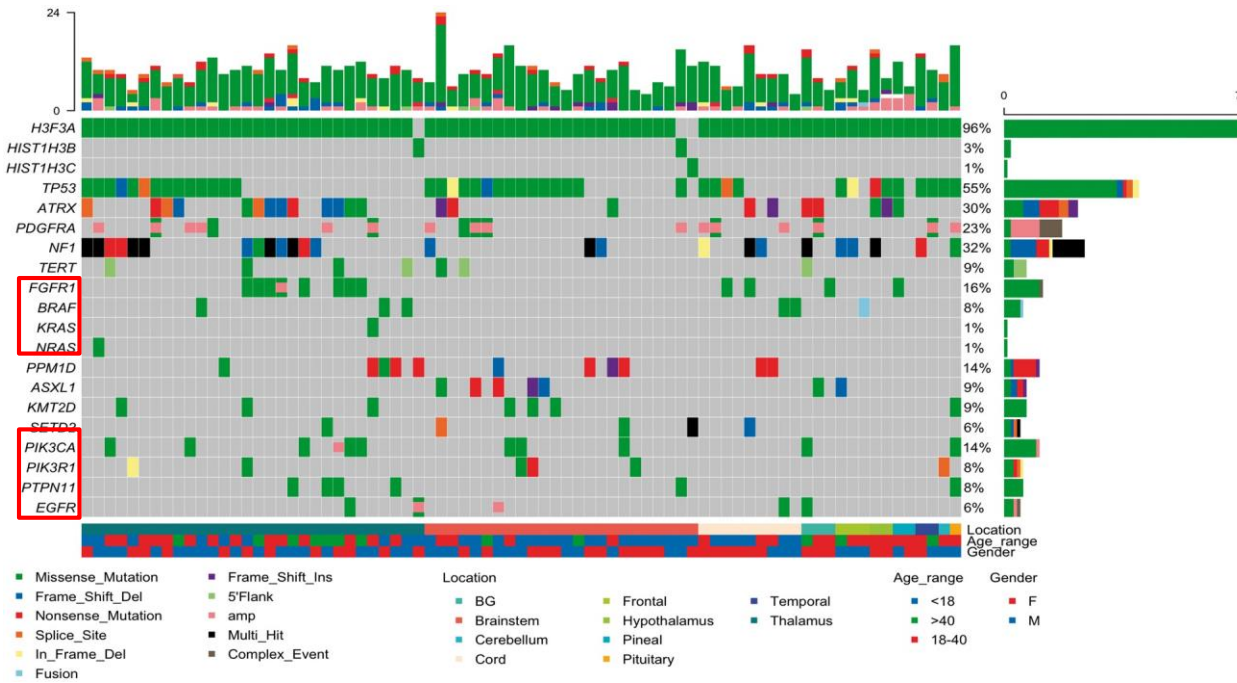


- eigenes DNA-Methylierungsprofil
- MAPK-Mutationen
- keine TP53 Mutation

Long term survival-assoziiierter Subtyp
 des H3K27M-DMG: "Diffuses
 Mittelliniengliom, H3K27M-mutiert und
 MAPK pathway-alteriert"
 Andere Gradierung notwendig?

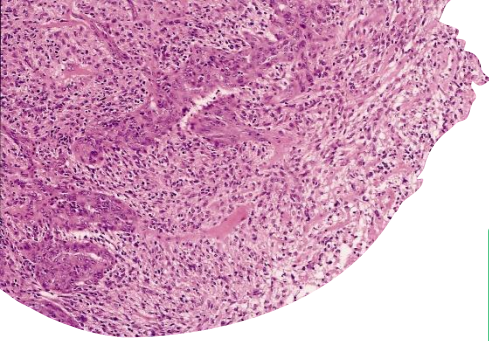
Roberts et al. Clinical, genomic, and epigenomic analyses of H3K27M-mutant diffuse midline glioma long-term survivors reveal a distinct group of tumors with MAPK pathway alterations. Acta Neuropathol. 2023 Dec;146(6):849-852. doi: 10.1007/s00401-023-02640-7. Epub 2023 Oct 18. PMID: 37851269; PMCID: PMC10627895.
<https://escaperoomspiele.com/das-raetsel-der-tueren/>
<https://www.istockphoto.com/de/fotos/hinter-t%C3%BCr>

Molekulare Marker anhand von Beispielen: Therapeutische Chance? Targeted therapy bei diffusen Mittelliniengliomen



Prognostisch. Prädiktiv?

Auswahl an Vor- und Nachteilen molekularer Befunde



- +Diagnose für morphologisch diskrete Befunde mittels molekularer Signatur möglich
- +Früherkennung
- +kleine Proben und Proben aus der Infiltrationszone diagnostizierbar (Komplikationsrate↓)
- +Re-Biopsie häufig entbehrlich (↓Patientenrisiko, ↓ Kosten)
- +NGS Paneldiagnostik zur Untersuchung therapierelevanter Alterationen
- +Erkenntnisgewinn zu bekannten und neu identifizierten Entitäten

- Kostenintensiv und nicht flächendeckend verfügbar
- Turnaround Zeiten 1-2 Wochen
- molekulare Befunde müssen in den histologischen/klinischen Kontext gestellt werden – nicht immer einfach

ORIGINAL ARTICLE

A Novel Type of IDH Wild-type Glioma Characterized by Gliomatosis Cerebri-like Growth Pattern, TERT Promoter Mutation, and Distinct Epigenetic Profile

Muench, Amos MSc¹; Teichmann, Daniel¹; Spille, Dorothee MD²; Kuzman, Peter MD³; Perez, Eilis MSc⁴; May, Sven-Axel MD¹; Mueller, Wolf C. MD⁵; Kombos, Theodoros MD⁶; Nazari-Dehkordi, Shokufe MD⁶; Onken, Julia MD⁶; Vajkoczy, Peter MD⁶; Ntoulas, Georgios MD⁷; Bettencourt, Conceição PhD^{1†}; von Deimling, Andreas MD^{2‡}; Paulus, Werner MD^{5§}; Heppner, Frank L. MD^{1,¶,§,¶¶,###}; Koch, Arend MD^{1,||}; Capper, David MD^{1,||}; Kaul, David MD^{1,||}; Thomas, Christian MD^{5§}; Schweizer, Leonille MD^{1,||,###,†††,‡‡‡}

Author Information[Ⓒ]

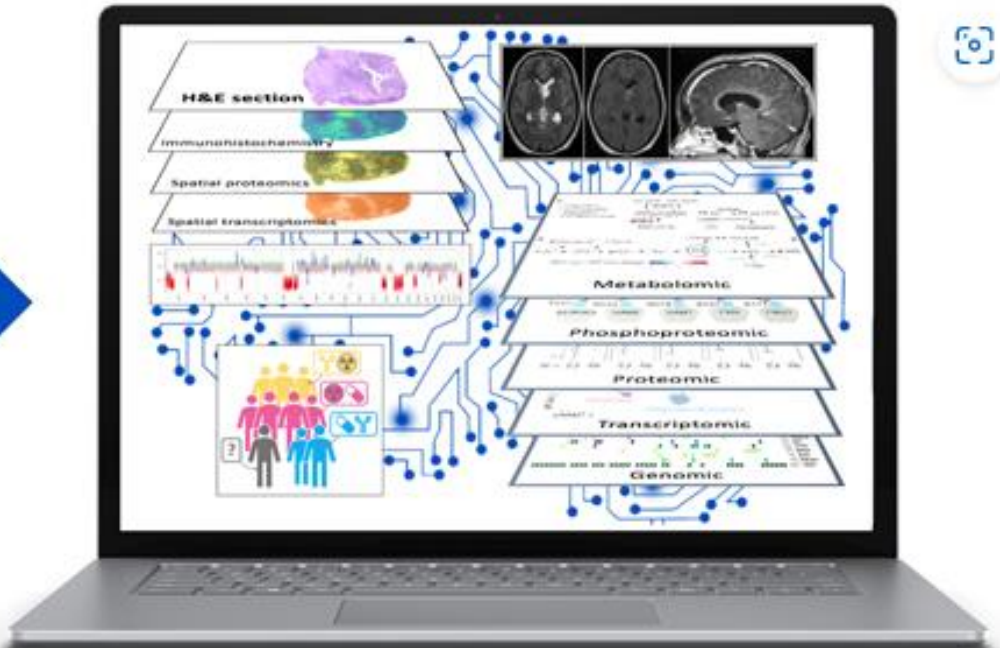
The American Journal of Surgical Pathology ();10.1097/PAS.0000000000002118, September 22, 2023. | DOI: 10.1097/PAS.0000000000002118

SDC PAP Metrics



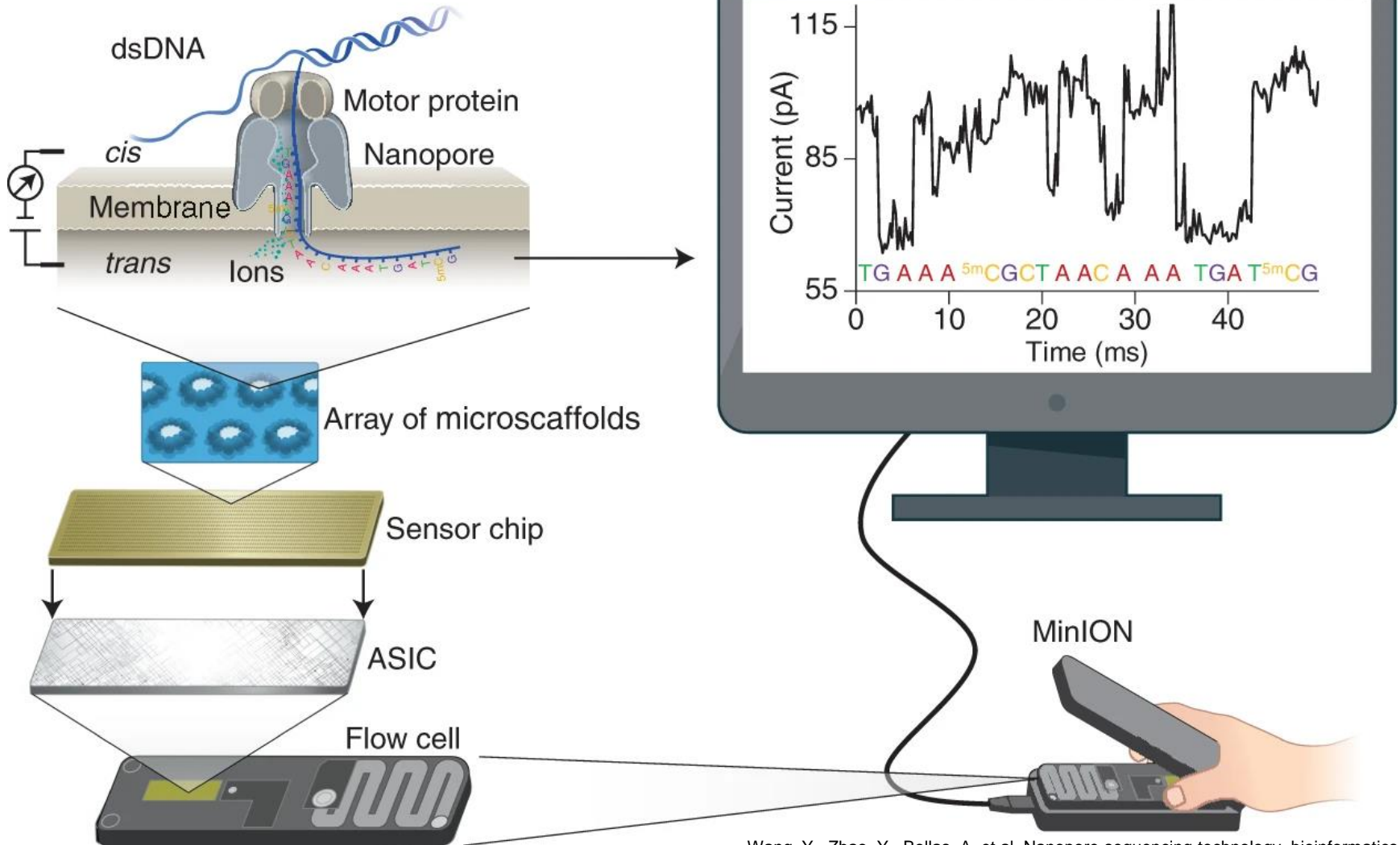
Tumorklassifikation nie perfekt und als „work in progress“ zu verstehen, immer abhängig von aktuellem Kenntnisstand und verfügbaren Methoden

TVU21-81959
I-A
HE 19
11 5








<https://www.uni-muenster.de/Ejournals/index.php/fnp/article/view/3804/3853>

Nanopore Sequencing - Prinzip




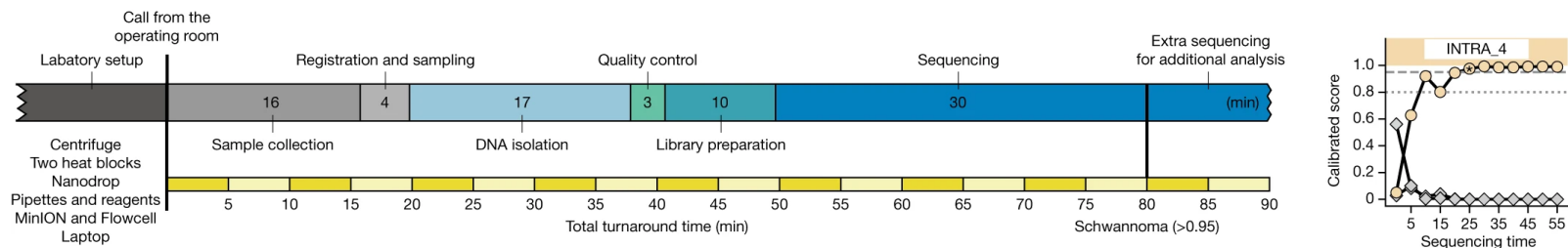
Wang, Y., Zhao, Y., Bollas, A. et al. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. Nat Biotechnol 39, 1348–1365 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01108-x>

Classification of Brain Tumors by Nanopore Sequencing of Cell-Free DNA from Cerebrospinal Fluid

Ann-Kristin Afflerbach,^{a,b} Christian Rohrandt,^c Björn Brändl,^d Marthe Sönksen,^a Jürgen Hench,^e Stephan Frank,^e Daniela Börnigen,^f Malik Alawi,^f Martin Mynarek ^a Beate Winkler,^a Franz Ricklefs ^g Michael Synowitz,^h Lasse Dührsen,^g Stefan Rutkowski,^a Annika K. Wefers ^{i,j} Franz-Josef Müller,^{d,k} Melanie Schoof ^{a,b,†} and Ulrich Schüller ^{a,b,i,x,†}

Rapid brain lymphoma diagnostics through nanopore sequencing of cytology-negative cerebrospinal fluid

J. Hench¹  · C. Hultschig¹ · I. Bratic Hench¹ · H. Sadasivan² · Ö Yaldizli³ · G. Hutter⁴ · S. Dirnhofer¹ · A. Tzankov¹ · S. Frank¹



Vermeulen, C., Pagès-Gallego, M., Kester, L. et al. Ultra-fast deep-learned CNS tumour classification during surgery. *Nature* 622, 842–849 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06615-2>

Take Home

- Bedeutung molekularer Marker
 - diagnostisch, prädiktiv, prognostisch
- Überblick zu wichtigen molekularen Alterationen und deren Auswirkung
 - IDH-Mutation
 - 1p/19q co-Deletion
 - MGMT-Promotormethylierung bei Glioblastomen
 - molekulare Signatur von Glioblastomen
 - Diffuses Mittelliniengliom



Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit



Bei Fragen, Anmerkungen, Lob/ Kritik:

Max.Braune@medizin.uni-leipzig.de