

# Klasifikace nádorů centrálního nervového systému – WHO 2016 Update

## Classification of Central Nervous System Tumors – WHO 2016 Update

### Souhrn

Recentně aktualizovaná klasifikace nádorů centrální nervové soustavy (CNS) zpracovaná Světovou zdravotnickou organizací (WHO) v roce 2016 využívá poprvé kromě histopatologických kritérií také molekulárně genetické charakteristiky (biomarkery) nádorových buněk a zavádí pojem tzv. integrované diagnostiky. Molekulárně genetické biomarkery mají mnohdy zásadní vliv na prognózu nemocných a/nebo výběr vhodné terapie u řady nádorových entit. Aktualizace tak představuje významný pokrok ve srovnání s klasifikací nádorů CNS z roku 2007. Přesnější zařazení nádorů za pomoci známých a nyní široce akceptovaných molekulárně genetických biomarkerů umožní také další výzkum protinádorové léčby a konzistentní vřazování nemocných do klinických studií. Hlavním nedostatkem nového přístupu je především přítomnost skupin nádorů blíže nespecifikovaných (Not Otherwise Specified; NOS). Nádory řazené v současné době k NOS entitám budou pravděpodobně přesněji charakterizovány s pokračujícím výzkumem molekulární genetiky v neuroonkologii. Rovněž budou překonány provozně-technické bariéry molekulárně genetických analýz, což dále umožní významně zmenšit skupinu NOS nádorů. Předpokládá se, že nová klasifikace usnadní klinické, experimentální i epidemiologické studie a povede tak ke zlepšení života nemocných s mozkovými nádory. Předložený přehled přináší nejdůležitější poznatky z nové klasifikace nádorů CNS a jejich klinické souvislosti.

### Abstract

Recently updated classification of the central nervous system (CNS) tumours prepared by the World Health Organization (WHO) in 2016 uses, in addition to the histopathological criteria, also molecular genetic characteristics (biomarkers) of tumour cells and introduces the so-called integrated diagnostics concept for the first time. Molecular genetic biomarkers often have a major impact on the patients' prognosis and/or selection of an appropriate therapy in a variety of tumour entities. This update represents a significant progress compared to the 2007 classification of CNS tumours. The more precise classification of tumours using well-known and widely accepted molecular genetic biomarkers, will also facilitate further research in anticancer therapeutics and consistent inclusion of patients into clinical trials. The presence of a tumour group called „not otherwise specified“ (NOS) is the major drawback of this novel approach. Tumours currently classified as the NOS entities are likely to be more accurately characterized with an ongoing neurooncological research in molecular genetics. The operational and technical barriers of molecular genetic analyses will be also overcome and this will further enable significant reduction of the NOS tumour entities. It is assumed that the new classification will facilitate clinical, experimental as well as epidemiological studies and thereby will improve the life of patients with brain tumours. This review presents the key findings from the new classification of the CNS tumours together with their clinical sequelae.

Podporováno projektem Ministerstva zdravotnictví České republiky pro konceptuální rozvoj výzkumné organizace 00669806 – Fakultní nemocnice Plzeň.

Podporováno z Národního programu udržitelosti I (NPU I) č. LO1503 poskytovaného Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR.

Podporováno grantem SVV 2016 č. 260 283.

Podporováno Programem rozvoje vědních oborů Univerzity Karlovy (Progres Q39).

**Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.**

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

**Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.**

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.

**J. Polívka<sup>1</sup>, T. Řepík<sup>1</sup>, L. Holubec<sup>2</sup>, J. Polívka jr.<sup>1-3</sup>**

<sup>1</sup> Neurologická klinika LF UK a FN Plzeň

<sup>2</sup> Biomedicínské centrum, LF UK v Plzni

<sup>3</sup> Ústav histologie a embryologie, LF UK v Plzni



**Ing. et Ing. Jiří Polívka jr.**

**Biomedicínské centrum**

**LF UK v Plzni**

**Husova 3**

**301 66 Plzeň**

**e-mail: polivkajiri@gmail.com**

Přijato k recenzi: 18. 11. 2016

Přijato do tisku: 7. 2. 2017

### Klíčová slova

nádory CNS – klasifikace 2016 – WHO – IDH mutace – 1p/19q kodelece – integrovaná diagnostika – molekulární genetiky – personalizovaná medicína

### Key words

CNS tumors – classification 2016 – WHO – IDH mutation – 1p/19q co-deletion – integrated diagnostics – molecular genetics – personalized medicine

## Úvod

Klasifikace nádorů CNS dle Světové zdravotnické organizace (World Health Organization; WHO) z roku 2007 vycházela z konceptu histogeneze, z mikroskopické podobnosti nádorových buněk, jejich předpokládaného původu a stupně diferenciaci [1]. Příkladem jsou nádory astrocytárního a oligodendroglialního fenotypu řazené do dvou skupin bez ohledu na značnou heterogenitu uvnitř těchto kategorií a rozdílné chování nádorů zejména v astrocytární skupině. V posledních dvou dekádách byly objasněny mnohé molekulárně genetické podklady procesu kancerogeneze primárních nádorů centrální nervové soustavy (CNS) [2–4]. Některé molekulárně genetické charakteristiky byly v přípravě klasifikace z roku 2007 již známy. Výsledky tehdejších výzkumů však ještě neumožnily jejich klinicky relevantní využití v nádorové klasifikaci, třebaže již poskytovaly důležité prognostické i prediktivní informace. Příkladem může být chromozomální aberace – kombinovaná ztráta genetického materiálu z krátkého raménka chromozomu 1 a dlouhého raménka chromozomu 19 (tzv. kodelece 1p/19q) – známá od roku 1994 převážně u nádorů s oligodendroglialní složkou [5]. Ta může sloužit k odhadu vyšší účinnosti kombinované léčby radioterapií a chemoterapií (režimem prokarbazin, lomustin-CCNU, vinkristin (PCV)) u pacientů s anaplastickými oligodendrogliony a oligoastrocytomy a je nyní doporučena k rutinnímu stanovení u tohoto typu nádorů [6–9]. Dalším důležitým příkladem jsou mutace genů izocitrát dehydrogenázy 1 a 2 (IDH1/2), jejichž přítomnost v nádorové tkáni znamená významně příznivější prognózu pacientů s gliomy v podstatě napříč všemi stupni malignity [10–19].

Tyto a další nové poznatky neuroonkologického výzkumu postupně vedly k požadavku na úpravu původní klasifikace nádorů CNS z roku 2007. K tomuto tématu se v roce 2014 konalo multioborové setkání odborníků pod patronací International Society of Neuropathology v nizozemském Haarlemu, které stanovilo doporučení, jak zapracovat do nádorové diagnostiky molekulárně genetické biomarkery a připravit půdu pro úpravu stávající klasifikace [20]. Následovala práce 117 oslovených specialistů z 20 zemí a tří denní konference pracovní skupiny 35 neuropatologů, klinických neuroonkologů a dalších vědců z 10 zemí v německém Heidelbergu. Výsledkem intenzivní multioborové spolupráce je update klasifikace nádorů centrálního nervového systému WHO v roce

2016 (2016 CNS WHO) [21]. V následujícím textu jsou uvedeny nejvýznamnější údaje a změny, které nová klasifikace přináší.

## Hlavní princip 2016 CNS WHO klasifikace

Nejvýznamnější novinkou upravené klasifikace je bezesporu využití analýzy kombinace fenotypu s genotypem nádoru, tzv. integrované diagnostiky nádorů CNS. Předpokládá se, že tento přístup umožní specifikovat biologicky více homogenní a přesněji definované entity, než umožňovala stávající klasifikace. To by mělo přinést zpřesnění diagnostiky, zlepšení klinického managementu nemocných, přesnější určení prognózy a také predikci odpovědi na léčbu. Současně však tato klasifikace přináší skupinu nádorů, která nezapadá do určených entit, není blíže specifikována, a je tudíž označována jako „not otherwise specified“ (NOS).

Diagnostika užitím histopatologického a molekulárně biologického přístupu nově upřednostňuje molekulárně genetické principy (alespoň u některých jednotek, např. gliomů), avšak diagnostiku na nich samotných stavět nelze. Dosud je hlavním kritériem fenotyp, nicméně pro přesnější specifikaci nádoru je nutná integrace jeho fenotypu i genotypu [4,20,21].

## Názvosloví (nomenklatura) používané v 2016 WHO CNS klasifikaci

Určení nádoru v aktuální klasifikaci sestává z histopatologického názvu následovaného genetickou charakteristikou, pokud je u dané nádorové jednotky známa a klinicky využitelná. Například *Difúzní astrocytom, IDH mutace, Meduloblastom, WNT aktivace, Ependymom, RELA fúze pozitivní* nebo *Oligodendrogliom, IDH mutace a 1p/19q kodelece*. U nádorů bez přítomnosti genetické mutace je oficiální název divoká varianta genu tedy „wildtype“, např. glioblastom, IDH wildtype. Důležité je zmínit se o skupině nádorů označovaných jako NOS. To v praxi znamená, že pomocí použitých molekulárně genetických charakteristik zatím nelze nádor přesně klasifikovat. Jde o nádory, které s rozvojem poznání bude patrně možno lépe specifikovat v budoucnu. Tato skupina je vyčleněna rovněž pro pracoviště, kde nelze provést v současné době již známou molekulárně genetickou diagnostiku, a z těchto provozně-technických důvodů je pak takový nádor zařazen do skupiny nádorů blíže nespecifikovaných (NOS). Cílem je samo-

zřejmě tento nedostatek v diagnostice a diagnostických možnostech jednotlivých pracovišť co nejdříve eliminovat.

## Nejdůležitější změny v klasifikaci nádorů CNS ve vztahu k jednotlivým histopatologickým jednotkám

V následujícím textu přinášíme stručný přehled nejdůležitějších změn vybraných histopatologických jednotek spolu s integrací molekulárně genetických charakteristik v nové klasifikaci nádorů CNS. Detailní přehled všech změn také u ostatních skupin primárních nádorů CNS uvádí autoři Louis et al [21].

### Difúzní gliomy a skupina ostatních astrocytárních nádorů

Nejvýznamnější změny se týkají difúzních gliomů. V nové klasifikaci jsou difúzní infiltrativně rostoucí gliomy astrocytárního i oligodendroglialního fenotypu zařazeny do jedné velké skupiny. Dále se člení nejen podle jejich histopatologické charakteristiky, ale také podle výskytu molekulárně genetických biomarkerů. Mezi nejdůležitější patří mutace genu *IDH1/2*, chromozomální kodelece 1p/19q, mutace genů *ATRX*, *TP53*, *BRAF* a *TSC1/TSC2*. Jednotlivé typy difúzních gliomů jsou určeny zejména dle přítomnosti nebo nepřítomnosti mutací *IDH1/2 a/nebo* kodelece 1p/19q (schéma 1). Zpřesnění diagnostiky nádoru má pro nemocné podstatný význam. Z patogenetického hlediska jde o dynamickou klasifikaci založenou na analýze fenotypu i genotypu nádoru. Z klinického hlediska takto rozdělené jednotky nádorů sdílejí obdobné prognostické biomarkery. Přítomnost *IDH1/2* mutací má podobně jako kodelece 1p/19q příznivý význam prognostický. Kodelece 1p/19q má zároveň také význam prediktivní ve vztahu ke kombinované léčbě radio- a chemoterapií PCV u anaplastických oligodendroglomů, jak bylo podrobně popisováno v souvisejících přehledových pracích autorů v tomto časopise [22,23]. Aktualizované členění tak může pomoci při rozhodování o užití vhodné konvenční terapie a/nebo také cílené protinádorové léčby v nově založených klinických studiích.

Glioblastomy jsou v nové klasifikaci děleny na *glioblastom, IDH wildtype* (90 % glioblastomů predominantně u nemocných starších 55 let) a *glioblastom, IDH mutace* (10 % glioblastomů, odpovídající názvu sekundární glioblastom, jemuž předcházela náleží difúz-

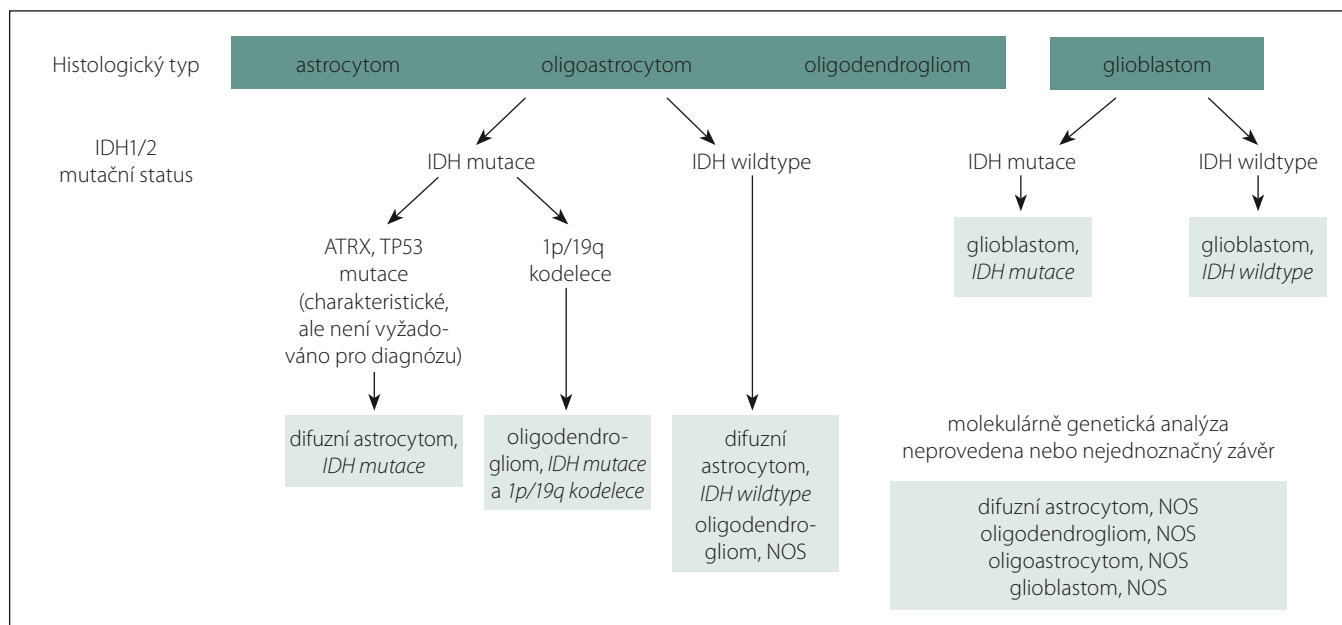


Schéma 1. Zjednodušený algoritmus nové klasifikace difuzních gliomů CNS na základě integrované diagnostiky propojením fenotypových a genotypových znaků nádoru (upraveno dle [21]).

NOS – nádory blíže nespecifikované.

ního gliomu s výskytem převážně u mladších osob). V případě, kdy stanovení *IDH* mutace nebylo provedeno, se jedná o *glioblastom, NOS*. Jsou popsány také další vzácnější subtypy glioblastomů.

Diagnostika oligodendrogliomu a anaplastického oligodendrogliomu nově vyžaduje stanovení mutace genu *IDH1/2* a kodelece 1p/19q. V případě, že histologicky typický anaplastický oligodendrogliom nemá tyto genetické charakteristiky, je nutno pečlivě pátrat po genetických znacích glioblastomu, případně je třeba uvažovat o pilocytárním astrocytomu, dysembryoplastickém neuroepiteliálním tumoru a světlouněném ependymomu jakožto „anaplastický oligodendrogliom mimics“. Označení *oligodendrogliom, NOS* je nutno užít tehdy, pokud oba výše uvedené molekularně genetické znaky nebyly vyšetřeny.

S využitím nové klasifikace lze téměř všechny nádory oligoastrocytárního fenotypu přiřadit pomocí molekularně genetických analýz buď k oligodendrogliomům (1p/19q kodelece přítomna, *IDH1/2*-mutovaný, *ATRX*-wildtype) nebo naopak k astrocytomům (*IDH1/2*-mutovaný, *ATRX*-mutovaný, 1p/19q kodelece nepřítomna). Pouze sporné případy nebo relativně vzácné případy jednoznačných oligoastrocytomů (přítomnost duálního genotypu oligoastrocytomu v jednom nádoru) jsou označeny jako *oligoastrocytom, NOS* a *anaplastický oligoastrocytom, NOS*.

Samostatnou skupinu tzv. ostatních astrocytárních nádorů nově tvoří jednotky s relativně ohraničeným růstem, jako je pilocytární astrocytom, pleomorfní xantastrocytom (obě charakterizované častou přítomností mutací genu *BRAF*) a subependymální velkobuněčný astrocytom (s častými mutacemi genů *TSC1/TSC2*). Důležité je konstatování, že v nové klasifikaci si mají nozologicky mnohem blíže difuzní astrocytom s oligodendrogliomem než difuzní astrocytomy a pilocytární astrocytom, což je fakt dlouho známý z klinické zkušenosti. Neméně důležité je definitivní odstranění samostatné entity „gliomatosis cerebri“. Nyní je uvažováno spíše o speciálním vzoru růstu a šíření nádoru definovaném u mnoha subtypů gliomů.

### Ependymomy

Ependymomy jsou podrobně zkoumány a v přípravě je především vylepšené schéma gradingu, neboť současné obtížné zařazení ependymomů do jednotlivých stupňů malignity často neodpovídá klinickým pozorováním [24]. Předpokládá se, že další výzkum molekularní genetiky ependymomů přinese preciznější rozdělení těchto nádorů do jednotlivých jednotek s významnými klinickými souvislostmi. V aktualizované klasifikaci 2016 CNS WHO je prozatím s využitím molekularní genetiky vyčleněn *ependymom, RELA fusion-pozitivní*, který tvoří většinu supratentoriálních nádorů u dětí [25,26]. Fúzní on-

koprotein C11orf95-*RELA* přítomný u *RELA fusion*-pozitivních ependymomů vede k patologické aktivaci nuclear factor kappa B buněčné signalizace spojené se vznikem a růstem nádorů a je také zkoumán jako potenciální nový cíl protinádorové léčby.

### Embryonální tumory – meduloblastomy

Největší změny z embryonálních tumorů prodělala klasifikace meduloblastomů. Nové jsou tyto nádory děleny do čtyř molekularně genetických skupin, a to *meduloblastom, WNT-aktivovaný*, *meduloblastom, SHH-aktivovaný*, *meduloblastom skupina 3* a *meduloblastom skupina 4*. Mezi skupinami existují dramatické prognostické rozdíly a zároveň související rozdíly v léčbě [27–29]. Zároveň je také v nové klasifikaci umožněna histopatologická klasifikace meduloblastomů do jednotlivých nádorových jednotek (klasický typ, desmoplastický/nodulární typ, meduloblastom s extenzivní nodularitou, velkobuněčný a anaplastický typ). Předpokládá se, že neuropatologové provedou integrovanou diagnostiku stanovením jak histopatologického, tak molekularně genetického typu meduloblastomu a jejich syntézu.

### Závěr

2016 CNS WHO klasifikace představuje významný pokrok ve srovnání s klasifikací nádorů CNS z roku 2007. Aktualizovaná verze

poprvé používá molekulárně genetické biomarkery mající zásadní vliv na prognózu nemocných a mnohdy i výběr vhodné terapie u řady nádorových jednotek. Přesnější zařazení nádorů CNS za pomoci známých a akceptovaných molekulárně genetických biomarkerů umožní také další výzkum protinádorové léčby a konzistentní vřazování pacientů do klinických studií. V neposlední řadě se zlepšila kategorizace nádorů CNS pro epidemiologické účely. Hlavním nedostatkem nového přístupu zůstává přítomnost skupin NOS. Nádory řazené v současné době k NOS entitám budou pravděpodobně přesněji charakterizovány s pokračujícím výzkumem molekulární genetiky v blízké budoucnosti. Rovněž budou překonány provozně-technické bariéry molekulárně genetických analýz, což dále umožní významně zmenšit skupinu NOS nádorů. Předpokládá se, že 2016 CNS WHO klasifikace usnadní klinické, experimentální i epidemiologické studie a povede tak ke zlepšení života nemocných s mozkovými nádory.

## Literatura

- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007;114(2):97–109.
- Louis DN. The next step in brain tumor classification: "Let us now praise famous men"... or molecules? *Acta Neuropathol* 2012;124(6):761–2. doi: 10.1007/s00401-012-1067-4.
- Weller M, Pfister SM, Wick W, et al. Molecular neuro-oncology in clinical practice: a new horizon. *Lancet Oncol* 2013;14(9):e370–9. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70168-2.
- Wirsching HG, Weller M. The Role of Molecular Diagnostics in the Management of Patients with Gliomas. *Curr Treat Options Oncol* 2016;17(10):51. doi: 10.1007/s11864-016-0430-4.
- Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, et al. Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol* 1994;145(5):1175–90.
- Cairncross G, Wang M, Shaw E, et al. Phase III trial of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendroglioma: long-term results of RTOG 9402. *J Clin Oncol* 2013;31(3):337–43. doi: 10.1200/JCO.2012.43.2674.
- van den Bent MJ, Brandes AA, Taphoorn MJ, et al. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951. *J Clin Oncol* 2013;31(3):344–50. doi: 10.1200/JCO.2012.43.2229.
- Polivka J jr, Polivka J, Repik T, et al. Co-deletion of 1p/19q as Prognostic and Predictive Biomarker for Patients in West Bohemia with Anaplastic Oligodendroglioma. *Anticancer Res* 2016;36(1):471–6.
- Polivka J jr, Polivka J, Rohan V, et al. New treatment paradigm for patients with anaplastic oligodendroglial tumors. *Anticancer Res* 2014;34(4):1587–94.
- Sanson M, Marie Y, Paris S, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol* 2009;27(25):4150–4. doi: 10.1200/JCO.2009.21.9832.
- Weller M, Felsberg J, Hartmann C, et al. Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *J Clin Oncol* 2009;27(34):5743–50. doi: 10.1200/JCO.2009.23.0805.
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008;321(5897):1807–12. doi: 10.1126/science.1164382.
- Yan H, Parsons DW, Jin G, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 2009;360(8):765–73. doi: 10.1056/NEJMoa0808710.
- Hartmann C, Hentschel B, Wick W, et al. Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol* 2010;120(6):707–18. doi: 10.1007/s00401-010-0781-z.
- Weiler M, Wick W. Molecular predictors of outcome in low-grade glioma. *Curr Opin Neurol* 2012;25:767–73. doi: 10.1097/WCO.0b013e32835a0217.
- Polivka J, Polivka J jr, Rohan V, et al. Isocitrate dehydrogenase-1 mutations as prognostic biomarker in glioblastoma multiforme patients in west bohemia. *BioMed Res Int* 2014;2014:735659. doi: 10.1155/2014/735659.
- Zou P, Xu H, Chen P, et al. IDH1/IDH2 mutations define the prognosis and molecular profiles of patients with gliomas: a meta-analysis. *PLoS One* 2013;8(7):e68782. doi: 10.1371/journal.pone.0068782.
- Polivka J, Polivka J jr, Krakorova K, et al. Current status of biomarker research in neurology. *EPMA J* 2016;7:14. doi: 10.1186/s13167-016-0063-5.
- Polivka J, Pesta M, Janku F. Testing for oncogenic molecular aberrations in cell-free DNA-based liquid biopsies in the clinic: are we there yet? *Expert Rev Mol Diagn* 2015;15(12):1631–44. doi: 10.1586/14737159.2015.1110021.
- Louis DN, Perry A, Burger P, et al. International Society Of Neuropathology – Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain Pathol Zurich Switz* 2014;24(5):429–35. doi: 10.1111/bpa.12171.
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 2016;131(6):803–20. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1.
- Polivka J, Polivka J jr, Rohan V, et al. Glioblastoma Multiforme – a Review of Pathogenesis, Biomarkers and Therapeutic Perspectives. *Cesk Slov Neurol N* 2013;76/109(5):575–83.
- Polivka J jr, Polivka J, Rohan V, et al. Current View on Management of Central Nervous System Low-grade Gliomas. *Cesk Slov Neurol N* 2016;79/112(5):534–40.
- Ellison DW, Kocak M, Figarella-Branger D, et al. Histopathological grading of pediatric ependymoma: reproducibility and clinical relevance in European trial cohorts. *J Negat Results Biomed* 2011;10:7. doi: 10.1186/1477-5751-10-7.
- Parker M, Mohankumar KM, PUNCHIHEWA C, et al. C11orf95-RELA fusions drive oncogenic NF-κB signaling in ependymoma. *Nature* 2014;506(7489):451–5. doi: 10.1038/nature13109.
- Pietsch T, Wohlert I, Goschzik T, et al. Supratentorial ependymomas of childhood carry C11orf95-RELA fusions leading to pathological activation of the NF-κB signaling pathway. *Acta Neuropathol* 2014;127:609–11. doi: 10.1007/s00401-014-1264-4.
- Coluccia D, Figueiredo C, Isik S, et al. Medulloblastoma: Tumor Biology and Relevance to Treatment and Prognosis Paradigm. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2016;16(5):43. doi: 10.1007/s11910-016-0644-7.
- Khatua S. Evolving molecular era of childhood medulloblastoma: time to revisit therapy. *Future Oncol* 2016;12(1):107–17. doi: 10.2217/fon.15.284.
- Kool M, Korshunov A, Remke M, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathol* 2012;123(4):473–84. doi: 10.1007/s00401-012-0958-8.