

**Universita Karlova**

**2. lékařská fakulta**

Doktorský studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



**MUDr. Kateřina Trková**

Specifika biologie gliálních nádorů vysokého stupně malignity dětského věku

Different biological characteristics of high-grade gliomas in children

Disertační práce

Školitel: doc. MUDr. Michal Zápotocký, Ph.D.

Praha, 2024

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem disertační práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 5.3.2024

Kateřina Trková



.....

Podpis autorky

## **Poděkování**

Tato práce je výsledkem spolupráce nejen s mnoha kolegy a kolegyněmi na Klinice dětské hematologie a onkologie 2.LF UK a FN Motol a v rámci Prague Brain Tumor Research Group s kolegy z Ústavu patologie a molekulární medicíny, Neurochirurgické kliniky dětí a dospělých a Kliniky zobrazovacích metod, ale řady dalších laboratorních i klinických pracovišť na mnoha českých i zahraničních institucích. Bez těchto skvělých spolupracovníků by tato práce nemohla vzniknout a velmi si vážím jejich pomoci.

Děkuji svému školiteli doc. Michalovi Zápotockému, Ph.D. za jeho velmi vstřícný a trpělivý přístup a vedení mé vědecké i klinické práce. Dále bych ráda poděkovala MUDr. Davidu Sumerauerovi, Ph.D., RNDr. Lence Krskové, Ph.D., MUDr. Aleši Víchovi Ph.D., doc. Vladimíru Benešovi III. Ph.D., doc. Martinu Kynčlovi, Ph.D. a dalším kolegům za cennou spolupráci.

V neposlední řadě děkuji našim pacientům a jejich rodinám za důvěru a spolupráci, bez které by tento výzkum nemohl vzniknout a kteří procházejí velmi těžkou cestou svého onemocnění.

Děkuji za podporu a péči svému manželovi. Na závěr patří velký dík mé matce Mgr. Haně Váňové za to, že mi umožnila mé vzdělání a podporuje mě neustále v mé profesi.

## **Specifika biologie gliálních nádorů vysokého stupně malignity dětského věku**

### **Abstrakt**

Nádory centrálního nervového systému představují nejčastější malignitu z řad solidních tumorů dětského věku, přičemž gliomy vysokého stupně malignity tvoří jednu z nejagresivnějších podskupin. Přes pokrok v dětské onkologii zůstává prognóza dětí s gliomy vysokého stupně malignity nepříznivá, což podtrhuje potřebu hlubšího pochopení jejich biologie a vývoje nových terapeutických postupů. Diagnostika dětských nádorů centrálního nervového systému je komplexní a zahrnuje klinické, radiologické a patologické vyšetření, včetně nejnovějších molekulárně biologických technik, které hrají klíčovou roli v přesné klasifikaci a prognóze. WHO klasifikace nádorů centrálního nervového systému z roku 2021 představuje více než 100 histopatologických jednotek, s významným rozšířením znalostí o molekulárních charakteristikách včetně genetických a epigenetických alterací. Tato disertační práce se zaměřuje na komplexní molekulární charakterizaci kohorty dětských pacientů s gliomy vysokého stupně malignity, identifikaci klíčových onkogenních mutací, sekundárních alterací a methylačních tříd s cílem identifikace nových terapeutických cílů. Byla provedena detailní analýza molekulárních, radiologických a klinických charakteristik radioterapií indukovaných gliomů, které představují významný pozdní následek radioterapie a jsou součástí kohorty gliomů vysokého stupně malignity. Významným přínosem práce je zdůraznění heterogenity gliomů vysokého stupně malignity u dětí a odhalení specifických molekulárně biologických vzorců, které mohou sloužit jako potenciální terapeutické cíle. Detailní molekulární charakterizace radioterapií indukovaných gliomů dále poskytla důležité informace pro odlišení těchto nádorů od primárních gliomů vysokého stupně malignity a recidiv primárního onemocnění. Práce tak přináší nové poznatky o molekulární patogenezi dětských gliomů vysokého stupně malignity, podtrhuje význam integrace histopatologických, molekulárně genetických a radiologických dat pro přesnou diagnostiku a výběr optimální terapie, a naznačuje směry budoucího výzkumu v oblasti dětské neuroonkologie.

### **Klíčová slova**

nádory centrálního nervového systému (CNS), gliomy vysokého stupně malignity (HGG), radioterapií indukované gliomy (RIG), molekulárně biologická charakterizace, WHO klasifikace nádorů CNS, onkogenní mutace, cílená terapie

## **Different biological characteristics of high-grade gliomas in children**

### **Abstract**

Central nervous system tumors represent the most common solid tumor malignancy of childhood, with high-grade gliomas forming one of the most aggressive subgroups. Despite advances in pediatric oncology, the prognosis of children with high-grade gliomas remains unfavorable, underscoring the need for a deeper understanding of their biology and the development of new therapeutic approaches. The diagnosis of pediatric central nervous system tumors is complex and involves clinical, radiological and pathological investigations, including the latest molecular biological techniques, which play a key role in accurate classification and prognosis. The 2021 WHO classification of central nervous system tumors represents more than 100 histopathological entities, with significant expansion of knowledge on molecular characteristics including genetic and epigenetic alterations. This dissertation focuses on a comprehensive molecular characterization of a cohort of pediatric patients with high-grade gliomas, identifying key oncogenic mutations, secondary alterations and methylation classes with the aim of identifying novel therapeutic targets. A detailed analysis of the molecular, radiological and clinical characteristics of radiotherapy-induced gliomas that represent a significant late sequela of radiotherapy and are part of a cohort of high-grade gliomas was performed. A major contribution of this work is to highlight the heterogeneity of high-grade gliomas in children and to reveal specific molecular biological patterns that may serve as potential therapeutic targets. Furthermore, the detailed molecular characterization of radiotherapy-induced gliomas has provided important information to differentiate these tumors from primary high-grade gliomas and recurrences of primary disease. Thus, this work provides new insights into the molecular pathogenesis of high-grade pediatric gliomas, highlights the importance of integrating histopathological, molecular-genetic and radiological data for accurate diagnosis and selection of optimal therapy, and suggests directions for future research in pediatric neuro-oncology.

### **Key words**

central nervous system (CNS) tumors, high grade gliomas (HGG), radiotherapy induced gliomas (RIG), molecular biological characterization, WHO classification of CNS tumors, oncogenic mutations, targeted therapy

## Seznam použitých zkratk

ALL – akutní lymfoblastická leukémie

AT/RT – atypický teratoidní/rhabdoidní tumor

CAR-T–T lymfocyty s chimerickým antigenním receptorem

CMMRD – syndrom konstitutivního deficitu genů mismatch opravy

CNS – centrální nervový systém

CT – výpočetní tomografie

CNV – změny počtu kopií

DIPG – difúzní intrinsický pontinní gliom

DMG – difúzní středočárový gliom

ETMR – embryonální tumor s mnohovrstevnatými rozetami

HGG – high-grade gliomy, gliomy vysokého stupně malignity

H3 – Histon 3

LGG – low-grade gliomy, gliomy nízkého stupně malignity

MAPK – mitogenem aktivované proteinkinázy

MRI – zobrazení magnetickou rezonancí

NF1 – neurofibromatóza typ 1, NF2 – neurofibromatóza typ 2

PA – pilocytický astrocytom

pedHGG\_MYCN – „Diffuse paediatric-type high grade glioma, MYCN subtype“

pedHGG\_RTK1 – „Diffuse paediatric-type high grade glioma, RTK1 subtype“

pedHGG\_RTK2 – „Diffuse paediatric-type high grade glioma, RTK2 subtype“

PXA – pleomorfní xantoastrocytom

RIG – radioterapií indukovaný gliom/gliomy

TME – tumorózní mikroprostředí

WHO – světová zdravotnická organizace

## Obsah

1	Úvod.....	9
1.1	Nádory CNS dětského věku .....	9
1.2	Rizikové faktory .....	9
1.3	Diagnostika.....	10
1.3.1	Klinický obraz.....	10
1.3.2	Zobrazovací metody .....	10
1.3.3	Histopatologické a molekulárně biologické vyšetření .....	11
1.4	Klasifikace nádorů CNS .....	11
1.5	Gliomy vysokého stupně malignity u dětí.....	14
1.5.1	Difúzní středočárový tumor, H3 K27 alterovaný.....	16
1.5.2	Difúzní pediatrický gliom H3 G34 mutovaný.....	17
1.5.3	Difúzní pediatrický high-grade gliom, H3-wildtype a IDH-wildtype.....	18
1.5.4	Infantilní hemisferální gliom.....	19
2	Cíle práce .....	19
3	Metodika .....	20
3.1	Methylační array.....	20
3.1.1	Princip metody .....	21
4	Výsledky .....	22
4.1	H3 mutované high-grade gliomy .....	24
4.1.1	Role H3F3A G34R/V mutace a genu <i>PDGFRA</i> v gliomagenezi.....	24
4.1.2	Thalamické high-grade gliomy s overexpresí <i>EZH1</i> .....	25
4.2	H3 wildtype high-grade gliomy.....	25
4.2.1	Skupina low-grade glioma-like .....	26
4.2.2	High-grade gliomy s amplifikací <i>MYCN</i> .....	27
4.2.3	Infantilní high-grade gliomy .....	28
4.2.4	Hypermutantní high-grade gliomy .....	28
4.3	Radioterapií indukované gliomy .....	28
5	Diskuze .....	30
6	Závěr .....	38
7	Souhrn.....	38
8	Summary .....	39
9	Použitá literatura .....	40
10	Přílohy.....	58

11	Další publikace autorky.....	59
----	------------------------------	----



# 1 Úvod

## 1.1 Nádory CNS dětského věku

Nádory centrálního nervového systému (CNS) jsou po akutních lymfoblastických leukémiích (ALL) druhými nejčastějšími malignitami vyskytujícími se v dětském věku. Zároveň se jedná o nejčastější nádorová solidní onemocnění v této věkové skupině s incidencí 6,14 na 100 000 ročně.(Ostrom et al. 2020) Bohužel je to zároveň skupina onemocnění, která je navzdory intenzivnímu výzkumu a pokroku v dětské onkologii zatížena největší letalitou. Nádory mozku a míchy tvoří velmi diverzní a širokou skupinu, která se především díky novým molekulárně biologickým poznatkům prospektivně stále rozšiřuje. Současná WHO klasifikace z roku 2021 (5.edice) nyní obsahuje více než 100 histopatologických jednotek nádorů CNS. Naše poznání ve smyslu původu, příčin a vývoje těchto onemocnění se díky využití „omik“ stále rozšiřuje.(Ostrom, Francis, and Barnholtz-Sloan 2021)

## 1.2 Rizikové faktory

Navzdory velkému pokroku v molekulárně biologickém poznání se o rizikových faktorech, které se podílejí na rozvoji nádorových onemocnění CNS u dětí, ví zatím jen málo. Výzkumu bylo podrobena mnoho jak environmentálních, tak genetických faktorů, mezi kterými by mohl být nalezen ten klíčový pro rozvoj u většiny tumorů CNS. Bohužel žádný takto jednoznačný nebyl dosud identifikován.(Ostrom et al. 2019) Popsány jsou dosud dva zásadní faktory, a to jsou vrozené genetické predispozice a expozice radiačnímu záření. Ukazuje se, že expozice radiačnímu záření je u dětí rizikovější než u dospělých zejména na základě vyšší radiosenzitivity a delší době života, během které mohou rozvinout takto indukovanou malignitu.(Kleinerman 2006)

Vrozené genetické predispozice byly identifikovány u zhruba 4 % dětských případů nádorů CNS. Mezi nejvýznamnější genetické syndromy patří v tomto případě Neurofibromatóza 1. a 2. typu (NF1, NF2),Tuberózní skleróza, Gorlinův syndrom, Syndrom Li-Fraumeni, Syndrom konstitutivního deficitu genů mismatch opravy (CMMRD) a DICER1 syndrom.(Ostrom et al. 2019) I přesto, že se jedná o velmi vzácné genetické predispozice, hrají významnou roli v managementu léčby nádorů CNS u dětí. Jejich identifikace je nutná pro správnou volbu léčby u pacienta, ať už ve smyslu cílené léčby, která je podmíněna nálezem příslušné genetické alterace, či s ohledem na toxicitu léčby, která může být u daných genetických syndromů významně vyšší. Důležitým faktorem je také další surveillance pacienta s ohledem na časnou

detekci dalších onemocnění, která mohou být s danou genetickou predispozicí spjata. Důležitý je rovněž případný screening a genetické poradenství dalších rodinných příslušníků.(Broniscer and Nichols 2018)

## 1.3 Diagnostika

### 1.3.1 Klinický obraz

Stanovit u dítěte prvotní podezření na nádor CNS je klíčové, nicméně často velmi obtížné. Prvotní příznaky bývají často zaměňovány s běžnými bolestmi hlavy, poruchami chování, gastroenteritidou či psychomotorickým opožděním. Klinická prezentace nádorů CNS u dětí je velmi různorodá a pečlivá anamnéza spolu s neurologickým vyšetřením jsou klíčové kroky ve vyšetření takového dítěte.(Fleming and Chi 2012) Příznaky se odvíjejí od postižené části CNS, a to především v závislosti na tom, zda se jedná o supratentoriální, infratentoriální nebo míšní oblast. V případě infratentoriálních tumorů se jedná často o projevy zvýšeného intrakraniálního tlaku. Mezi ně patří typicky ranní bolesti hlavy, zvracení a otoky papily zrkového nervu. Zvýšený nitrolební tlak může také být spojen s parézou hlavových nervů, které se mohou projevit šilháním, dvojitým viděním, úklonem hlavy. U kojenců může vést k makrocefalii. Dramatickým projevem rychle zvýšeného intrakraniálního tlaku může být náhlá porucha vědomí.(Wilne et al. 2007) Dalšími příznaky provázející léze v infratentoriální oblasti mohou být parézy hlavových nervů, poruchy hybnosti, rovnováhy či kmenových reflexů.(Amid, Keene, and Johnston 2015)

Jedním z nejčastějších z příznaků supratentoriálních tumorů bývají křeče.(Wilne et al. 2007) Dále to mohou být rozličné poruchy zorného pole, postižení endokrinních systémů, poruchy růstu a chování.(Amid et al. 2015)

Primární míšní tumory jsou u dětí velmi vzácné, tvoří 2 % dětských nádorů CNS. V jejich klinické manifestaci se objevuje nejčastěji bolest zad, senzomotorické postižení či poruchy svěračů ve smyslu inkontinence či retence.(Amid et al. 2015)

### 1.3.2 Zobrazovací metody

Zobrazovací metody jsou zásadní v procesu diagnostiky i dlouhodobého sledování pacienta.(Stein and Ribeiro 2015) Výpočetní tomografie (CT) je vhodná při potřebě okamžitého

a rychlého vyšetření, je však samozřejmě spojena s radiologickou zátěží pacienta. Jednoznačnou metodou volby pro zobrazení struktur CNS je magnetická rezonance (MRI). Na základě moderních protokolů MRI jako je spektroskopie či perfuzní sekvence můžeme specifický nádor CNS velmi přesně definovat již na začátku diagnostického procesu.

### 1.3.3 Histopatologické a molekulárně biologické vyšetření

Tradiční histopatologické vyšetření kombinované s moderními metodami molekulárně biologického vyšetřování jsou nezbytnými kroky v diagnostice nádorů CNS. Zásadním faktorem v úspěšnosti tohoto procesu je centralizace takových pacientů a jejich vzorků, které se dostanou k rukám zkušených neuropatologů, kteří jsou zahrnuti do procesu vyšetřování ještě před samotným provedením biopsie. Některé diagnózy mohou být stanoveny okamžitě s použitím základního hematoxylin-eozinového barvení. Naopak mnohdy je třeba využít velmi detailních imunohistochemických, cytogenických, genetických a epigenetických vyšetřovacích nástrojů.(Diamandis et al. 2015) Do čela se nyní v neuropatologii dostává methylační array, která bude více spolu popsána v části Metodika.

## 1.4 Klasifikace nádorů CNS

Nádory CNS jsou velkou léčebnou výzvou dětské onkologie jako takové. K tomuto faktu přispívá i faktor jejich velmi velké heterogenity. Ta je zásadní především na molekulárně biologické úrovni, na které se mohou histologicky podobné jednotky velmi lišit. Vývoj na poli genetiky a epigenetiky přináší detailní charakteristiku jednotlivých podskupin nádorů, která je zásadní pro volbu vhodné léčby pacientů a zejména umožňuje pokrok v hledání nových cílených terapeutických postupů.(Pfister, Capper, and Jones 2018) Klasifikace WHO z roku 2021 obsahuje více než 100 subtypů nádorů CNS. Základy se samozřejmě opírají o histologickou a imunohistochemickou charakteristiku, ale mnoho nových jednotek je definováno čistě na základě změn nádorového genomu a methylačního profilu.(Louis et al. 2021) Detailní popis WHO klasifikace nádorů CNS není předmětem této práce. Velmi obecně lze nádory CNS dělit na gliální/glioneuronální a non-gliální.

Mezi non-gliálními nádory tvoří v dětské neuroonkologii nejvýznamnější jednotku nádory embryonální. Z nich je klinicky nejvýznamnější skupina meduloblastomu, nejčastějšího maligního tumoru CNS dětského věku. Dále se do kategorie embryonálních nádorů řadí ETMR (embryonální tumor s mnohovrstevnatými rozetami) a AT/RT (atypický teratoidní/rhabdoidní tumor). Další významné skupiny non-gliálních nádorů dětského věku jsou pineální tumory,

kraniofaryngom, meningiomy, tumory choroidálního plexu a další vzácné jednotky jako jsou lymfomy CNS a germinální tumory.(Pfister et al. 2018)

Gliální/glioneuronální nádory lze rozdělit na ependymomy (jejichž bližší charakteristika není předmětem této práce), gliomy nízkého stupně malignity neboli low-grade gliomy (LGG) a gliomy vysokého stupně malignity neboli high-grade gliomy (HGG). Velmi zjednodušeně lze říci, že LGG a HGG se liší zejména dle stupně malignity, obě skupiny však skrývají mnoho molekulárně biologických jednotek, významně odlišných stran prognózy pacienta a možností léčby. LGG zde budou pouze stručně charakterizovány, jelikož hlavní pozornost ve zpracování této disertační práce byla věnována komplexní molekulárně biologické a klinické charakteristice kohorty pacientů s dětskými HGG.

Low-grade gliomy tvoří více než 30 % všech nádorů CNS dětského věku a jsou tak nejčastějším neuroonkologickým nádorem u dětí vůbec.(Ostrom et al. 2015) Histologicky tvoří smíšenou skupinu gliálních a glioneuronálních tumorů, které se však velmi liší svými molekulárně biologickými charakteristikami. Prognosticky se jedná o skupinu pomalu rostoucích, obvykle nemetastazujících tumorů nízkého stupně malignity (WHO grade I-II), jejichž jednotky jsou ovšem spojeny s velmi variabilní prognózou. Pokud je možná kompletní resekce, pak je desetiletá doba přežití bez progresu více než 85 %.(Wisoff et al. 2011) Naopak u tumorů resekčně nepříznivě uložených je to méně než 50 % a pacienti jsou zatíženi významnou morbiditou, která může být způsobena především souvisejícími endokrinopatiemi, poruchami vidění, motorickými či senzorickými dysfunkcemi a neurokognitivním deficitem.(Armstrong et al. 2009; Bandopadhyay et al. 2014; Manoharan et al. 2023; Merchant et al. 2009) Na rozdíl od histologicky podobných lézí u dospělých, dětské LGG ve většině případů netransformují do vyšších stupňů malignity a zdá se, že při přechodu do dospělosti jejich růst dokonce utichne.(Bandopadhyay et al. 2014; Krishnatry et al. 2016) Společnou charakteristikou těchto nádorů je jednorázový onkogenní zásah, který se nachází v RAS/MAP kinázové dráze. Zhruba 20-30 % LGG je lokalizovaných v průběhu zrakové dráhy s nejvyšší incidencí během první dekády života. Ačkoliv většina z nich vzniká sporadicky, až u jedné třetiny pacientů je diagnostikována NF1, což vedlo i k iniciálnímu poznání MAPK alterací u těchto pacientů.(Paulsson et al. 2018)

Nejnovější WHO klasifikace nádorů CNS klade důraz na integraci histopatologických a molekulárních charakteristik LGG s cílem usnadnit jejich diagnostiku. Rozděluje pediatrické LGG na tři velké skupiny: “Circumscribed astrocytic gliomas“ tzv. ohraničené astrocytární

gliomy, “Paediatric-type diffuse low-grade gliomas“ tzv. difúzní pediatrické low-grade gliomy a glioneuronální low-grade gliomy.(Louis et al. 2021)

Nejčastěji zastoupenými nádory ze skupiny ohraničených astrocytárních gliomů je pilocytický astrocytom (PA) a pleomorfní xantoastrocytom (PXA). Pilocytický astrocytom (WHO grade I) je nejčastějším histologickým typem dětských LGG vůbec. Lokalizován je obvykle v zadní jámě lební a v průběhu optické dráhy dále v mozkových hemisférách a hlubokých středočárových strukturách. V podstatě všechny PA nesou genetickou alteraci v MAPK dráze, zahrnující mutace genu *NFI* (obvykle germinální), bodové mutace v exonu 15 genu *BRAF*, (*BRAF* V600E), genovou fúzi *KIAA1549::BRAF*, mutace nebo genové fúze genů *KRAS* a *FGFR1*.(Jones et al. 2013; Khater et al. 2019; Zhang et al. 2013) Pleomorfní xantoastrocytom, nejčastěji lokalizovaný supratentoriálně v oblasti temporálního laloku, se klinicky u pacientů často manifestuje křečemi.(Ida et al. 2015) Molekulárně biologicky je charakterizován přítomností mutace *BRAF* V600E či jinými alteracemi v MAPK dráze a homozygotní delecí v genu *CDKN2A/B*.(Ida et al. 2015; Phillips et al. 2019)

Významnými zástupci skupiny difúzních pediatrických low-grade gliomů jsou difúzní astrocytom *MYB*, *MYBL1* alterovaný a difúzní low-grade gliom s alterací MAPK dráhy. Angiocentrický gliom (WHO grade I), lokalizovaný obvykle kortikálně, je charakterizovaný genovou fúzí *MYB::QKI* případně jinou *MYB* alterací.(Louis et al. 2021)

Častým zástupcem skupiny glioneuronálních tumorů u dětí a mladých dospělých je dysembryoplastický neuroepiteliální tumor WHO grade I, charakteristický nálezem alterace v genu *FGFR1* a gangliogliom WHO grade I, obvykle s přítomnou alterací v MAPK dráze.

Poznání genových alterací u LGG v RAS/MAPK dráze a poznatek, že za rozvojem těchto nádorů stojí mutace nebo fúze jednoho genu, přineslo zásadní průlom v léčbě pacientů. Terapie tyrosinkinázovými inhibitory – nejčastěji *BRAF* inhibitory nebo *MEK* inhibitory jako Dabrafenib, Trametinib a Selumetinib – je nyní vedle neurochirurgie, chemoterapie a případně radioterapie standardní součástí léčby LGG.(Bouffet et al. 2022; Fangusaro et al. 2021; Nicolaides et al. 2020; Wright et al. 2020) Navzdory velkému pokroku, který se odehrává v léčbě LGG, zůstává v tomto poli zejména kvůli chronicitě části těchto nádorů mnoho výzev, týkajících se délky podávání léčby a jejich dlouhodobých následků.

## 1.5 Gliomy vysokého stupně malignity u dětí

Gliomy vysokého stupně malignity neboli high-grade gliomy (HGG) tvoří zhruba 10 % dětských nádorů CNS u dětí. Bohužel se zároveň jedná o vysoce agresivní malignitu s nejvyšší letalitou v dětské onkologii vůbec. Prognóza dlouhodobého přežití u těchto pacientů je méně než 10 %.(Mackay et al. 2017) To je jeden ze zásadních faktorů, kvůli kterému se neuroonkologický výzkum upíná k poznání těchto onemocnění a hledání nových terapeutických možností.

Většinu dětských HGG tvoří primární HGG, zatímco u dospělých vznikají často maligní transformací z LGG. Vzácnou, nicméně velmi důležitou skupinu HGG tvoří tzv. radioterapií indukované gliomy. Radioterapie v léčbě primárního onemocnění je prokazatelně jediný vnější faktor, který se na vzniku HGG podílí. Radioterapií indukované gliomy mohou vznikat u ozářených pacientů s mediánem 9 let od léčby jejich primárního onemocnění radioterapií.(Leary, Anderson-Mellies, and Green 2022) Molekulárně biologická charakteristika radioterapií indukovaných gliomů byla jedním z výzkumných cílů této práce a bude popsána v části Výsledky.

Historicky byly HGG ve WHO klasifikaci klasifikovány jako anaplastický astrocytom (WHO grade III) nebo glioblastom (WHO grade IV). Současná WHO klasifikace již definuje několik entit na základě genetických a epigenetických poznatků posledních dvou dekad. Zároveň je nyní již jisté, že se pediatrické HGG velmi liší svými molekulárně biologickými vlastnostmi od svých dospělých protějšků, a proto ve WHO klasifikaci tvoří samostatnou skupinu High-grade gliomy dětského typu.(Louis et al. 2021) Ta se rozděluje na čtyři typy pediatrických HGG: Difúzní středočárový gliom, H3 K27 alterovaný, Difúzní hemisferální tumor H3 G34 mutovaný, Difúzní high-grade gliom pediatrického typu, H3-wildtype, IDH-wildtype a Infantilní hemisférický gliom. Tyto typy se klinicky liší svou anatomickou lokalizací, věkovou predilekcí a prognózou.

Mutační nálož u HGG je ve srovnání s HGG dospělých poměrně nízká, její medián je zhruba 15 nesynonymních kódujících mutací na nádor.(Wu et al. 2014) Variabilita je v tomto ohledu velmi široká mezi jednotlivými typy HGG. U infantilních HGG je mutační nálož velmi nízká – s mediánem 2, naopak u dětí s vrozenou genetickou predispozicí CMMRD je to medián více než 6 000 nesynonymních kódujících mutací na nádor.

Také u HGG se nacházejí genetické mutace v kanonických drahách, jež se podílejí na vzniku difúzních gliomů u dospělých, jako je např. dráha TP53, dráha PI3K či dráha RB1, ale frekvence specifických mutací se liší.(Mackay et al. 2017; Sturm et al. 2014)

Jak již bylo zmíněno, vznik pediatrických HGG maligní transformací z LGG je vzácný. Ovšem u supratentoriálních HGG, u kterých nacházíme mutaci BRAF V600E a *CDNK2A* delecii, byl tento proces popsán u primárních low-grade gangliogliomů či pleomorfních xantoastrocytomů.(Lassaletta et al. 2017; Mistry et al. 2015)

U části tumorů velmi malých dětí histopatologicky odpovídajících glioblastomu se setkáváme s nálezem mutace BRAF V600E, delecí genu *CDKN1A/B* a methylačním profilem odpovídajícím pleomorfnímu xantoastrocytomu: nyní tuto skupinu nazýváme „PXA-like“.(Korshunov et al. 2015; Mackay et al. 2017) Podobně je u HGG velmi malých dětí popsán výskyt genových fúzí *BRAF*, tato skupina je označována jako „LGG-like“ a spojena s velmi dobrou prognózou.(Mackay et al. 2017)

Molekulárně biologickou značkou, která je charakteristická pro pediatrické HGG, jsou alterace postihující geny regulující epigenetické modifikace genomu. Pediatrické HGG byly popsány v roce 2012 jako vůbec první nádorové onemocnění, které je řízeno přímo histonovou mutací.(Schwartzentruber et al. 2012) Ta se skutečně vyskytuje u více než 50 % pediatrických HGG a u méně než 1 % HGG dospělých. Jedná se o hotspot mutace v genu pro histon 3 – konkrétně geny *HIST1H3B* a *H3F3A*, kódující varianty histonu 3 H3.1 respektive H3.3.(Schwartzentruber et al. 2012)

Jedná se o substituce aminokyselin na N-konci histonu 3, který vyčnívá z core nukleosomu, a který podléhá významným posttranslačním modifikacím ovlivňujících stav chromatinu a další buněčné procesy. Mutace K27M způsobená substitucí aminokyselin lyzin za methionin v pozici 27 vede ke ztrátě trimethylace tím, že blokuje Polycomb represive complex 2, který katalyzuje methyl transferázovou aktivitu proteinu Enhancer of Zeste Homolog Protein (EZHIP). Trimethylace vede za normálních okolností ke kompakci chromatinu a represii transkripce – tento stav je mutací narušen.(Kasper and Baker 2020)

Mutace G34R/V způsobená substitucí glycinu za arginin nebo valin v pozici 34 je vzácnější variantou. Přesný mechanismus, jakým se podílí na onkogenezi, není tak jednoznačný jako u mutace K27M. Nicméně díky recentnímu výzkumu, na kterém se podílela i naše skupina (jak bude více uvedeno v sekci Výsledky), je možný mechanismus efektu mutace v biologii onemocnění lépe objasněn.

Ostatní významné molekulárně biologické alterace budou dále popsány u jednotlivých typů pediatrických HGG dle WHO klasifikace.

#### 1.5.1 Difúzní středočárový tumor, H3 K27 alterovaný

Difúzní středočárový tumor, H3 K27 alterovaný (WHO grade IV) je anatomicky lokalizován v oblasti mozkového kmene – historicky a často i nyní běžně označovaný v této lokalitě jako difúzní intrinsický pontinní gliom (DIPG), či v oblasti thalamu – často bilaterálně, u adolescentů pak také unilaterálně nebo v oblasti míchy – v literatuře označovaný obecně jako difúzní středočárový gliom (DMG). Až 40 % DIPG se chová metastaticky.(Buczkwicz, Bartels, et al. 2014) Většina pacientů s DIPG se prezentuje velmi krátkou anamnézou – méně než dva měsíce - s typickými příznaky, kterými jsou paréza hlavových nervů, porucha pyramidové dráhy a ataxie. U DMG jsou to obvykle projevy nitrolební hypertenze a senzomotorický deficit.(Hoffman et al. 2018; Steinbok et al. 2016) Tato velmi agresivní onemocnění postihují nejčastěji věkovou skupinu s mediánem 5 let věku u DIPG, u DMG pak o něco starší pacienty okolo 7-8 let. Diagnóza DIPG může být stanovena pouze na základě typického klinického průběhu a obrazu na MRI, který zobrazuje masu zasahující >50 % mozkového kmene, zaujímající arterii basilaris, je T1 hypointensní, T2 hyperintensní, nesytí se po podání kontrastní látky a neobsahuje cystickou či exofytickou složku.(Cohen, Jabado, and Grill 2017) Dle zvyklostí pracoviště může být ovšem provedena biopsie, což dle zkušeností našeho pracoviště v případě endoskopického jehlového provedení znamená minimální zátěž a riziko pro pacienta. Nádorová masa difúzně infiltruje parenchym CNS, přítomny mohou být hemoragické a nekrotické podíly. Histopatologicky nacházíme obvykle malé, monomorfní buňky, ale mohou být i polymorfní a vykazovat astrocytární, piloidní, oligodendroglíální, obrovskobuněčnou, nediferencovanou nebo epitelooidní cytologii.(Solomon et al. 2016) V patogenezi tohoto onemocnění hraje hlavní roli ztráta trimethylace H3 (K27me3) na podkladě mutace H3.3/H3F3A K27M nebo H3.1/HIST1H3B K27M, jak bylo popsáno výše. U H3 wildtype tumorů je ztráta K27me3 způsobena obvykle vysokou expresí EZHIP.(Bender et al. 2013; Lewis et al. 2013, 2013) S tímto mechanismem se sekáváme obzvláště u bithalamických gliomů, u kterých častěji nacházíme i alterace v genu *EGFR* (amplifikace či bodové mutace).(Sievers et al. 2021) Somatické heterozygotní mutace genů pro histony jsou obvykle doprovázeny řadou dalších somatických mutací, které mohou tvořit klonální subpopulace.(Hoffman et al. 2016; Nikbakht et al. 2016; Vinci et al. 2018) Tyto kanonické mutace spojené se vznikem nádorových onemocnění jsou specifické pro dané typy – mutace v genech *TP53*, *PPM1D*, *ATM*, jsou častější u H3F3A K27M, mutace genů *ACVR1*, *EGFR*,



*PIK3CA*, *PIK3R1*, *PTEN* z velké části u podtypu s mutací HIST1H3B K27M.(Buczkwicz, Hoeman, et al. 2014; Fontebasso et al. 2014; Nikbakht et al. 2016)

Prognosticky se jedná o velmi nepříznivé, letální onemocnění s prognózou přežití dvou let <10 %.(Mackay et al. 2017) U pacientů s nádory nesoucími mutaci HIST1H3B K27M nebo vykazujícími overexpresi EZHIP je celková doba přežití 16 měsíců, u pacientů s nádory s H3F3A K27M mutací je to 11 měsíců.(Castel et al. 2018, 2020; Hoffman et al. 2018) Standardním terapeutickým postupem je v současné době fotonová fokální radioterapie v dávce 54 Gy. Mutace v genu *TP53* je spojována s možnou radiorezistencí.(Werbrouck et al. 2019) Podávání konkomitantní chemoterapie se v klinických studiích neukázalo jakkoliv účelné pro prodloužení délky života pacientů. V současné době probíhá mnoho klinických studií s novými způsoby léčby, jak bude více popsáno v části Diskuze.

### 1.5.2 Difúzní pediatrický gliom H3 G34 mutovaný

Difúzní pediatrický gliom H3 G34 mutovaný (WHO grade 4) je lokalizován v mozkových hemisférách. Popisován je jeho infiltrativní růst postihující středočárové struktury a leptomenigeální metastatický rozsev. Klinicky se manifestuje v závislosti na lokalizaci křečemi či senzomotorickými poruchami. Toto onemocnění postihuje starší děti s mediánem 13-14 let. U této skupiny nádorů je pohlavní predominance chlapců versus dívek 1,4:1.(Korshunov et al. 2016; Mackay et al. 2017) Histopatologicky má difúzní pediatrický gliom H3 G34 mutovaný glioblastomový charakter s vysokou buněčností a mitotickou aktivitou vysoce agresivního astrocytárního tumoru, často s nálezem mikrovaskularizace a nekrózy.(Korshunov et al. 2016; Mackay et al. 2017) V patogenezi tohoto onemocnění hraje zásadní roli missense mutace v genu H3F3A, která vede k záměně aminokyseliny glycinu za arginin nebo valin (viz výše). Zhruba u 90 % těchto nádorů je přítomna mutace genu *TP53* a u 95 % se nachází alterace *ATRX*. Naopak přítomnost mutace H3F3A G34R/V se vzájemně vylučuje s nálezem H3F3A K27M a mutací v genu *IDH1/2*.(Sturm et al. 2012) Difúzní pediatrické gliomy, H3 G34 mutované vykazují obvykle celkovou hypomethylaci DNA, ačkoliv promotor genu pro methyl-guanin methyltransferázu (*MGMT*) bývá často methylován.

Prognóza těchto pacientů je jen o něco málo příznivější než u DMG a to 18-22 měsíců doby celkového přežití.(Korshunov et al. 2016) Na tomto faktu se podílí zejména možnost resekce v anatomicky příznivější lokalizaci mozkových hemisfér. Ta je poté rovněž následována fokální radioterapií.

### 1.5.3 Difúzní pediatrický high-grade gliom, H3-wildtype a IDH-wildtype

Difúzní pediatrický high-grade gliom, H3-wildtype a IDH-wildtype (WHO grade 4) se vyskytuje v široké věkové skupině dětí, adolescentů a mladých dospělých. Jsou definovány celkem tři jeho molekulárně biologické třídy na základě methylačního profilování: „Diffuse paediatric-type high grade glioma, RTK1 subtype“ (pedHGG\_RTK1), „Diffuse paediatric-type high grade glioma, RTK2 subtype“ (pedHGG\_RTK2) a „Diffuse paediatric-type high grade glioma, MYCN subtype“ (pedHGG\_MYCN). (Louis et al. 2021) Anatomicky je lokalizován také spíše nespecificky v oblastech jak supratentoriálních tak infratentoriálních, v oblasti mozkového kmene a mozečku. (Korshunov et al. 2017) MRI obraz odpovídá ostatním high-grade gliomům, obvykle se jedná o tumor sytící se po podání kontrastní látky způsobující efekt masy okolní tkáně. (Korshunov et al. 2017; Tauziède-Espariat et al. 2020) Histopatologický obraz tvoří maligní tumor glioblastomového typu s vysokou mitotickou aktivitou, možnou přítomností mikrovaskularizace a nekrotických podílů nebo primitivní nediferencované morfologie.

V jejich molekulárně biologické diagnostice by měly být nejprve vyloučeny mutace v genu pro *Histon 3*, *IDH1,2*. Další genetické testování může u těchto nádorů odhalit mutace v genu *TP53*, alterace genu *NF1*, amplifikace nebo mutace genu *EGFR*, amplifikace genu *MYCN*. Tři molekulárně biologické podskupiny jsou jasně rozlišeny na základě methylačního profilování. U tumorů podskupiny pedHGG\_RTKI je obvykle přítomna amplifikace genu *PDGFRA* (~33 % případů), u pedHGG\_RTK II je to amplifikace genu *EGFR* (~50 % případů) a jak název napovídá amplifikace genu *MYCN* u MYCN podskupiny (~50 % případů). (Korshunov et al. 2017)

Prognosticky se jedná opět o skupinu velmi agresivních onemocnění s dvouletým přežitím u 23,5 % pacientů a mediánem celkové doby přežití 17,2 měsíce. O využití potenciálně cílitelných změn pro podání léčby, kterými mohou být rekurentní změny *PDGFRA* či *EGFR*, existuje zatím jen málo údajů a jejich efektivita nebyla dostatečně prokázána. U pacientů s genetickou predispozicí CMMRD nebo Lynchovým syndromem, jejichž HGG obvykle klastrují se skupinou pedHGG\_RTKI, nacházíme tumory s hypermutantním fenotypem, u kterých může být s částečným efektem použita imunoterapie tzv. check-point inhibitory. (Mackay et al. 2018) Do skupiny pedHGG\_RTKI spadají také ve většině případů radioterapií indukované gliomy, které budou více charakterizovány v části Výsledky.

#### 1.5.4 Infantilní hemisferální gliom

Infantilní hemisferální gliom je, jak lze z názvu vyčíst, tumor nacházející se v mozkových hemisférách u pacientů velmi nízkého věku – obvykle v prvním roce života. Morfologicky se ve většině případů jedná o velkou nádorovou masu, kterou může tvořit jak cystická, tak solidní složka a obsahovat prokrváčené a nekrotické složky. Histopatologicky byl dříve často mylně zaměňován za anaplastický gangliogliom, ependyom nebo primitivní neuroektodermální nádor CNS. Patogeneticky se na jejich vzniku podílejí genové fúze genů pro tyrosinkinázy *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*, *ALK*, *ROSI* nebo *MET* s různými fúzními partnery. Způsobují aberantní expresi aktivní kinázové domény, což vede k vývoji nádoru prostřednictvím signalizace kanonickými cestami dráhy PI3K a/nebo MAPK. Obvykle nejsou přítomny žádné další genetické změny, což činí nádory obzvláště citlivé na cílenou inhibici příslušných tyrosinkinázových receptorů. Tyto fúzní geny jsou přítomny u 60-80 % případů a jsou terapeuticky využívány. Jedná se tedy o prognosticky příznivější onemocnění než u HGG starších dětí. Ve studiích bylo prokázáno, že pacienti s nádory s fúzí genu *ALK* mají delší celkové pětileté přežití než pacienti s nádory, které nesly změny *ROSI* (53,8 % vs. 25 %), a pacienti s nádory s pozitivní *NTRK* fúzí měli střední prognózu s mírou celkového pětiletého přežití 42,9 %.(Guerreiro Stucklin et al. 2019) Prognózu těchto stále velmi agresivních a devastujících onemocnění může dále zlepšit léčba specifickými inhibitory, jejichž efektivita je nyní hodnocena v klinických studiích. (Clarke et al. 2020)

## 2 Cíle práce

Hypotéza: Genetické a epigenetické alterace určují heterogenitu a biologické chování u primárních pediatrických HGG a radioterapií indukovaných gliomů.

Prvním cílem této práce byla komplexní molekulární charakterizace unikátní historické kohorty pacientů s pediatrickými HGG. Definovali jsme u nich známé onkogenní mutace (jako např. v genu pro *H3*, *BRAF*, *IDH1* a *IDH2*) a u vybraných dokázali určit i sekundární alterace a jejich prognostický význam. U klíčové řídicí mutace H3F3A G34R/V jsme se podíleli na objasnění jejího významu v nádorové patogenezi.

Druhým cílem bylo určit biologické a epigenetické pozadí u vzorků s absencí onkogenních mutací zhodnocením celogenomového methylačního profilu pomocí nového Heidelbergského klasifikátoru. Tím bylo možné ověřit, zda histopatologická diagnóza koreluje s biologickým chováním pediatrických HGG. Definovali jsme unikátní podskupiny v kohortě pediatrických

HGG, které se odlišují svým biologickým chováním, prognózou a přítomností potenciálních terapeutických cílů.

Třetím cílem byla molekulárně-biologická a klinická charakteristika kohorty pacientů s radioterapií indukovanými gliomy, která vedla k poznání jejich biologických vlastností. Provedli jsme srovnání jejich molekulárně biologických charakteristik se skupinou jejich primárních protějšků. Díky komplexním klinickým informacím a dlouhodobému sledování pacientů bylo možné určit míru rizika rozvoje tohoto onemocnění u pacientů, kteří podstoupili radioterapii v rámci léčby svého primárního onemocnění.

### 3 Metodika

Předmětem výzkumu byla kohorta 114 klinicky anotovaných pacientů od roku 2000 do roku 2023. Molekulárně biologicky se nám podařilo charakterizovat 100 pacientů. U pacientů s dostupnými vzorky jsme použili Sangerovo sekvenování na nejčastější bodové mutace u HGG v genech pro histon *H3*, *IDH1,2*, *BRAF*, *ACVR1*, *FGFR1*, *PIK3CA*; dále celogenomovou methylační array (Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip) a u vybraných vzorků sekvenování nové generace (NGS) a to jak DNA i RNA sekvenování.

Podrobný popis molekulárně biologických metod použitých při vyšetřování nádorových vzorků je uveden v každé z příložených publikací, které jsou hlavní součástí výsledků této práce. Zde uvádím detailní popis methylační array a Heidelbergského klasifikátoru, protože se jedná o moderní nástroj, který zásadně ovlivnil klasifikaci tumorů CNS v poslední dekádě.

#### 3.1 Methylační array

Složitost a rozmanitost nádorů CNS dle WHO klasifikace značí také velkou náročnost přesné diagnostiky. Historicky byla konkrétní diagnóza stanovována klasickými histopatologickými metodami, což vedlo ke značné variabilitě mezi pozorovateli, zejména v případech difuzních gliomů, ependymomů a supratentoriálních primitivních neuroektodermálních nádorů. Tato subjektivita posuzování komplikuje klinické rozhodování a interpretaci klinických studií. Během postupného vývoje poznání a aktualizace WHO klasifikace byly vyčleněny molekulární skupiny pro některé typy nádorů, jako je například meduloblastom či *H3* mutovaný středočárový gliom. Standardizace diagnostických testů včetně genového sekvenování, fluorescenční in situ hybridizace nebo imunohistochemie však zůstává náročná. Analýza methylace DNA doplňuje klasické diagnostické principy a nabízí řešení mnoha těchto problémů. Klasifikace nádorů CNS založená na využití methylační array představuje revoluční

přístup v onkologii, iniciálně zejména v neuroonkologii, ale nyní již i při klasifikaci dalších solidních tumorů, např. sarkomů. Tato metoda využívá jedinečné epigenetické vzorce methylace DNA k rozlišení různých typů nádorů CNS a nabízí přesný a komplexní diagnostický nástroj. Nádorový methylom odráží somatické změny, ale dokáže identifikovat i buňku původu. Profilování methylace DNA se ukázalo jako robustní a reprodukovatelné, a bylo nápomocné při subklasifikaci skupin nádorů CNS, které byly dříve považovány za homogenní.(Capper et al. 2018)

### 3.1.1 Princip metody

Methylace DNA je epigenetický mechanismus, který zahrnuje přidání methylové skupiny do molekuly DNA, obvykle na cytosinovou bázi dinukleotidů CpG. Tato modifikace může změnit genovou expresi, aniž by se změnila sekvence DNA, ovlivnit buněčnou funkci a přispět k vývoji a diferenciaci buněk. Nádorové buňky často vykazují odlišné methylační profily ve srovnání s normálními buňkami. Tyto vzorce mohou sloužit jako biomarkery pro identifikaci přítomnosti a typu nádorů.(Capper et al. 2018)

Během našeho výzkumného a diagnostického procesu používáme technologii Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip Kit, dle následujícího pracovního postupu (převzato a zjednodušeno z pracovního postupu od firmy Illumina)

1.Extrakce a kvantifikace DNA: Prvním krokem je extrakce nejméně 250ug DNA z nádorových buněk získaných ze zamraženého či parafinového bločku (FFPE), ve kterém patolog vyhodnotí dostatečné procento zastoupení nádorových buněk (více než 50 %).

2. Bisulfitová konverze: Extrahovaná DNA podstoupí bisulfitovou konverzi, při které se nemethylované cytosiny přemění na uracil, zatímco methylované cytosiny zůstanou nezměněny. Tato konverze je klíčová pro rozlišení mezi methylovanými a nemethylovanými sekvencemi DNA.

3. Amplifikace a fragmentace: Bisulfitově upravená DNA je poté amplifikována a enzymaticky fragmentována pro přípravu k hybridizaci.

4. Hybridizace na čípech: Fragmentované produkty DNA jsou následně denaturovány a hybridizovány na čípech, které obsahují více než 850 000 sond navržených pro zkoumání specifických CpG míst 14 495 genů lidského genomu. Hybridizace na čip probíhá prostřednictvím alelově specifického annealingu buď na methylačně specifickou sondu, nebo

na nemethylační sondu. Po hybridizaci následuje jednobázová extenze s dideoxynukleotidy značenými haptenem.

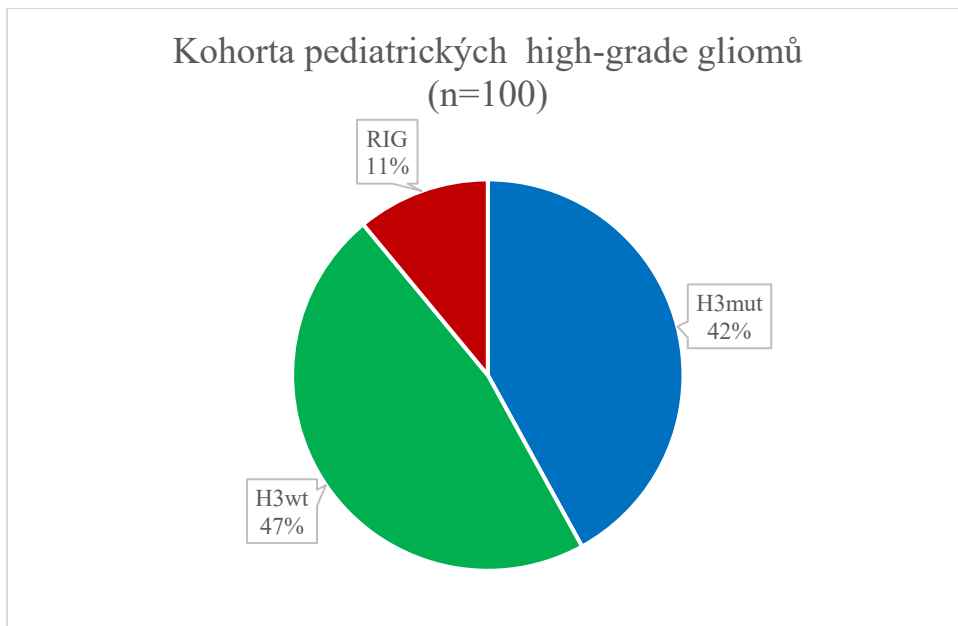
5. Zobrazování a analýza dat: Po inkorporaci těchto dideoxynukleotidů značených haptenem se provádí vícevrstevné imunohistochemické barvení kombinací protilátek, aby se oba typy odlišily. Po barvení se čip naskenuje a je analyzován patentovaným softwarem a jsou vypočteny poměry intenzity fluorescence mezi oběma typy sond. Pro daného jedince na daném lokusu se hodnota poměru 0 rovná nemethylaci lokusu (tj. homozygotní nemethylaci); poměr 1 se rovná úplné metylaci (tj. homozygotní metylaci); a hodnota 0,5 znamená, že jedna kopie je methylovaná a druhá ne (tj. heterozygotnost), v diploidním lidském genomu. Výsledná data tvoří komplexní metylační profil vzorku.

6. Interpretace a vývoj methylačního klasifikátoru: Posledním krokem je interpretace metylačních dat v kontextu klasifikačních kritérií. Pro stanovení příslušné methylační třídy byl vyvinut softwarový nástroj veřejně dostupný na stránkách německé výzkumné skupiny DKFZ (German Cancer Research Center) <https://www.molecularneuropathology.org/> označovaný v neuroonkologické komunitě jako Heidelbergský klasifikátor. Referenční kohorta vzorků, se kterou je srovnáván a klastrován vyšetřovaný vzorek, obsahuje nyní více než 100 000 případů. Při spuštění veřejné verze klasifikátoru 11b4 v roce 2017 bylo definováno 82 methylačních tříd s charakteristickým methylačním profilem, které se prospektivně dále rozšiřují. V roce 2022 to bylo ve verzi klasifikátoru 12.5 celkem 147 tříd a 184 podtříd a procento nádorů, které nebylo možné přiřadit k žádné z dosud popsaných skupin, se snížila z 29 % na 15 %.(Sturm et al. 2023) Velkou předností této metody je možnost získání přehledu počtu změn kopií (CNV) prostřednictvím softwarového balíčku Bioconductor. To přináší velmi cenné informace o genetických změnách, které mohou být potenciálními terapeutickými cíli. Tím tato metoda produkuje velmi komplexní epigenetickou i genetickou charakteristiku vzorku.(Capper et al. 2018; Sturm et al. 2023)

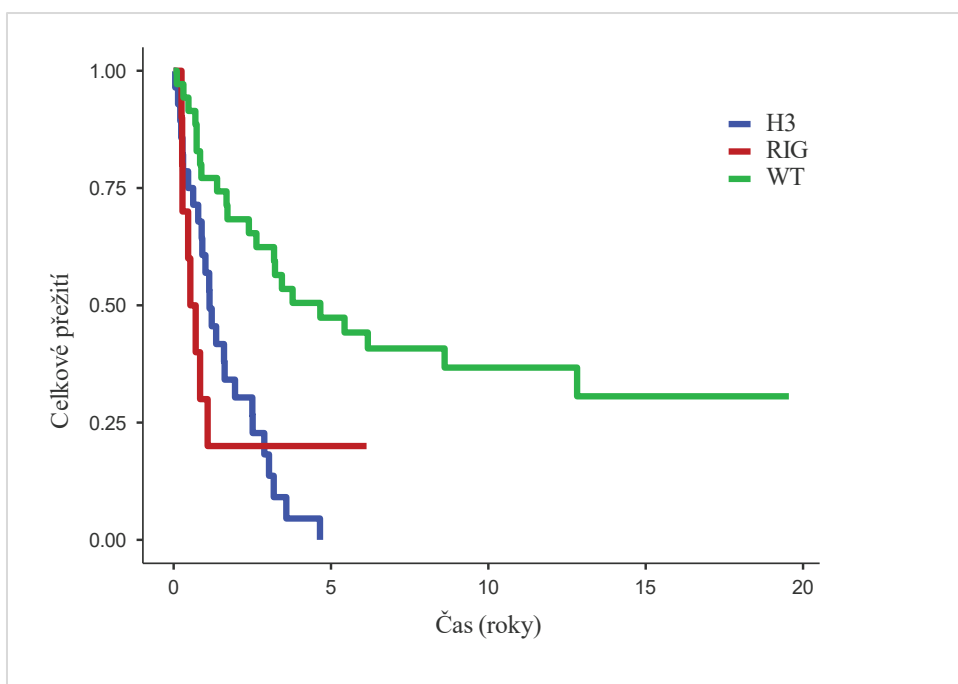
Tento přístup byl zásadní pro zpřesnění klasifikace nádorů CNS, což vedlo k objevení nových nádorových jednotek a podskupin, které dříve nebylo možné identifikovat pomocí tradičních histopatologických metod.

## 4 Výsledky

Naši kohortu kompletně vyšetřených HGG pacientů (n=100) jsme na základě přítomnosti mutace v *H3* a předchozí radioterapie rozdělili do skupin *H3* mutovaných (*H3mut*) n=42, *H3* wildtype (*H3wt*) n=47 a radioterapií indukovaných gliomů n=11 viz. Obr.1.



Obr.1 Rozdělení kohorty pacientů s high-grade gliomy



Obr. 2 Kaplan-Meierova křivka přežití jednotlivých podskupin HGG

(Trková et al., poster konference ISPNO)

## 4.1 H3 mutované high-grade gliomy

Pacientů s *H3* mutovanými gliomy bylo v kohortě 42 (42 %). Zastoupení jednotlivých mutací bylo následující: H3F3A K27M (n=32), H3F3A G34R/V (n=4), HIST1H3B K27M (n=6). Dle WHO CNS klasifikace se jedná o pacienty s difúzními středočárovými tumory, a *H3* K27 alterovanými a difúzními hemisferálními G34 mutovanými gliomy. Nádory se nacházely v odpovídajících lokalizacích, tedy v oblasti mozkového kmene a thalamu a mozkových hemisfér. Ze sekundárních alterací byly u difúzních středočárových tumorů *H3* K27 alterovaných zachyceny alterace v genech *ACVRI* (n=4), *PIK3CA* (n=2) a *FGFR1* (n=1). Methylační array není u těchto jasně klasifikovaných tumorů s prokázanou alterací *H3* rutině prováděna, nicméně vyšetřené vzorky odpovídaly ve verzi 12.5 klasifikátoru methylační třídě „Diffuse midline glioma, H3 K27-altered“ (n=15) v případě středočárových nádorů a methylační třídě „Diffuse hemispheric glioma, H3 G34-mutant“ (n=1) v případě hemisferálních G34-mutovaných gliomů.

Terapeutické možnosti jsou navzdory velkému úsilí celosvětové neuroonkologické komunity u těchto skupin vysoce agresivních nádorů bohužel velmi omezené. U středočárových inoperabilních tumorů je standardem léčby fokální fotonová radioterapie v dávce 54 Gy. V případě hemisferálně uložených tumorů je snaha o maximální resekci, následovaná také fokální radioterapií. Prognóza pacientů je ale uniformně fatální.

### 4.1.1 Role H3F3A G34R/V mutace a genu *PDGFRA* v gliomogenezi

Chen, C. C. L., Deshmukh, S., Jessa, S., Hadjadj, D., Lisi, V., Andrade, A. F., **Vanova, K.**... Jabado, N. (2020). Histone H3.3G34-Mutant Interneuron Progenitors Co-opt PDGFRA for Gliomagenesis. *Cell*, 183(6), 1617-1633.e22

(viz **Příloha 1**)

Naše skupina se podílela na významném objevu principu patogeneze mutace H3F3A G34R/V ve spolupráci se skupinou na Universitě McGill v Montrealu.

Na unikátním souboru téměř 100 nádorů s histonovými mutacemi H3F3A G34R/V (včetně raritních dvojic biologického materiálu z originální diagnózy a recidivy nádoru) jsme prokázali, že oproti dřívějším představám vychází nádor primárně nikoli z gliální tkáně, ale z interneuronových progenitorů charakterizovaných expresí genu *GSX2*. Zjistili jsme, že



významný podíl nádorů nese spolu s mutacemi H3F3A G34R/V mutace v genu *PDGFRA*, spojených také s jeho zvýšenou expresí. Tato vysoká exprese je způsobena právě originální mutací v histonu H3.3, vedoucí ke změně epigenomické situace v buňce. Změna v chromatinovém uspořádání přiblíží enhancer genu *GSX2* k regulačním sekvencím genu *PDGFRA* (fenomémem nazývaným „enhancer hijacking“) a tím zvýší jeho expresi. U části nádorů pak následuje vznik mutace ve zvýšeně exprimovaném genu *PDGFRA* vedoucí k dimerizaci extracelulární části receptoru a masivnímu zvýšení signalizace v této dráze.

Zastavení buněčné maturace způsobené mutací H3F3A G34R/V tak postupuje do další fáze, kdy tato signalizace dráhy MAPK/ERK přes mutovaný receptor *PDGFRA* spouští expresní vzorec typický pro gliální tkáň (konkrétně pro astrocytární linii). Expresie specifických transkripčních faktorů pak vede k obrazu smíšené neuronově-gliální tkáně a tím klasické histopatologické charakteristice těchto nádorů. Samotná mutace v histonu H3.3 se zdá být pro další vývoj nádoru zbytná na rozdíl od signalizace přes mutovaný receptor *PDGFRA* (jak se ukazuje porovnáním tkáně z diagnózy a při recidivě).

Odhalení této unikátní biologické charakteristiky skupiny H3F3A G34R/V mutovaných HGG otvírá dveře k novým potenciálním možnostem léčby směřovaným nikoli na gliální, ale neuronální tkáň, třebaže se bohužel z předběžných výsledků jeví, že jsou tyto nádory na běžné inhibitory *PDGFRA* rezistentní.

#### 4.1.2 Thalamické high-grade gliomy s overexpresí *EZH1P*

U tří našich pacientů s thalamickými HGG jsme našli zvýšenou expresi proteinu *EZH1P* vedoucí ke ztrátě K27me3, která vede k alteraci *H3* mechanismem již popsaným výše. Methylační profil odpovídal třídě „Diffuse midline glioma, H3 K27-altered, subtype EGFR-altered“ (n=2) a „Diffuse paediatric-type high grade glioma, RTK1 subtype“ (n=1). Tyto tumory se vyznačovaly se velmi agresivním chováním, kdy pacienti časně zrelabovali po ukončené RT. U jedné pacientky k selhání léčby došlo i přes použití MEK inhibitoru, který jsme podávali na základě identifikace *PDGFRA* mutace v extracelulární doméně.

## 4.2 H3 wildtype high-grade gliomy

Na rozdíl od skupin H3mut (n=42) a RIG (n=11), které jsou provázeny téměř uniformě fatální prognózou, skupina H3wt obsahovala podíl dlouhodobě přežívajících pacientů. To je znázorněno Kaplan-Meierovou křivkou přežití na Obr. 2. Ve skupině H3wt jsme našli pacienty nesoucí řídící mutace v *IDH1* a *IDH2* (n=2), a *BRAF* (n=6). Jedná se celkově o velmi

heterogenní skupinu pacientů, ve které jsme díky vyšetření NGS a provedení methylační array u vybraných pacientů s dostatečným materiálem byli schopni identifikovat několik významných podskupin.

#### 4.2.1 Skupina low-grade glioma-like

Pacienti s nádory nacházejícími se ve skupině s tzv. „LGG-like“ (n=10) byli charakterizováni iniciálně agresivním klinickým průběhem s histopatologickým nálezem odpovídajícím (dle v okamžiku diagnózy platné WHO klasifikace) anaplastickému astrocytomu WHO grade III, glioblastomu či blíže neurčenému gliomu. Během našeho výzkumu u nich byla odhalena mutace BRAF V600E (n=5) a genové fúze *KIAA1549::BRAF* (n=2) a *FAM73A::BRAF* (n=1). Methylační profil nádorů klastroval se skupinou „Pleomorphic xanthoastrocytoma“ (n=4) a „Pilocytic astrocytoma“ (n=2). Tito pacienti byli kvůli své originální histopatologické diagnóze léčeni intenzivní léčbou určenou pro high-grade gliomy – dle anatomické lokalizace byla provedena resekce, následovaná intenzivní chemoterapií a radioterapií. Z těchto pacientů je celkem osm naživu v remisi onemocnění s mediánem sledování 12 let.

Součástí této skupiny je také pacient s angiocentrickým gliomem kmene s genovou fúzí *MYB::QKI* a methylačním profilem „Diffuse glioma, MYB(L1)-altered“, manifestující se obrazem DIPG, který je podrobně popsán níže.(Trkova et al. 2023)

##### 4.2.1.1 *MYB-alterovaný pontinní gliom s charakteristikami DIPG s dlouhodobou léčebnou odpovědí na léčbu intenzivní chemoterapií*

**Trkova K**, Sumerauer D, Krskova L, Vicha A, Koblizek M, Votava T, Prihan V, Zapotocky M. DIPG-like MYB-altered diffuse astrocytoma with durable response to intensive chemotherapy. *Childs Nerv Syst.* 2023 Sep;39(9):2509-2513. doi: 10.1007/s00381-023-05976-3. Epub 2023 May 11. PMID: 37165121; PMCID: PMC10432314

(viz **Příloha 2**)

Gliomy oblasti mozkového kmene představují obtížně léčitelnou jednotku vzhledem k jejich lokalizaci a heterogenní biologii, která se pohybuje od indolentních LGG až po agresivní difuzní intrinsický pontinní gliom (DIPG). Stanovení správné diagnózy nádoru v pontinní lokalizaci je proto velmi důležité. Publikovali jsme kazuistiku velmi malého dítěte s H3 wildtype DIPG, který byl později charakterizován nálezem genové fúze *MYB::QKI*, léčeného intenzivní chemoterapií ale s vynecháním radioterapie.

Tento 14 měsíční pacient se klinicky manifestoval krátkou anamnézou psychomotorického opožďení, parézou hlavových nervů a obstrukčním hydrocefalem. MRI obraz objemné expanze v pontu odpovídal svými charakteristikami DIPG stejně jako klinický obraz. Vzhledem k netypicky nízkému věku pacienta byla provedena biopsie, kde histologický závěr zněl anaplastický astrocytom, ale mutace H3K27M svědčící pro DIPG nebyla nalezena. Negativní výsledek mělo i vyšetření mutací genu *BRAF* a fúze *KIAA1549::BRAF*. Vzhledem k nezvykle nízkému věku pacienta, obrazu DIPG na MRI a histologii anaplastického astrocytomu byla zahájena intenzivní chemoterapie na základě protokolu HIT-SKK s udržovací chemoterapií vinblastinem, ale bez radioterapie, která by takto malému dítěti přinesla významné riziko dlouhodobých následků. Bylo pozorováno překvapivě rychlé klinické zlepšení a radiologická regrese nádoru s téměř kompletní remisí s trvalým efektem a výborným klinickým stavem více než 6,5 roku po stanovení diagnózy. Na základě tohoto neočekávaného terapeutického výsledku byla doplněna další extenzivní vyšetření včetně celogenomové metylační array a vzorek byl zařazen do metylační třídy „Low-grade glioma, MYB(L1) altered“. RT-PCR navíc odhalila přítomnost fúze *MYB::QKI*, která je typická pro low-grade angiocentrické gliomy, nacházející se však ve většině případů v mozkových hemisférách. Případy popsané v oblasti pontu jsou velmi raritní, navíc náš pacient nenesl histopatologické znaky angiocentrického gliomu. Celkově nás histopatologická klasifikace, molekulárně genetické a epigenetické rysy, klinické chování a lokalizace v pontu vedly k překlasifikování nádoru na pontinní gliom s alterací *MYB*. Náš případ ukazuje, že intenzivnější chemoterapie může dosáhnout dlouhodobého klinického účinku při léčbě *MYB*-alterovaných pontinních gliomů ve srovnání s dříve používanými režimy založenými na strategii pro LGG nebo radioterapii. Zdůrazňuje také význam biopsie a důkladného molekulárního vyšetření lézí v pontu.

#### 4.2.2 High-grade gliomy s amplifikací *MYCN*

Ve skupině H3wt jsme identifikovali čtyři případy HGG s amplifikací *MYCN* a methylačním profilem „Diffuse paediatric-type high grade glioma, *MYCN* subtype“. Tyto tumory se vyskytovaly v různých lokalizacích: jeden diseminovaný, jeden s gliomatosis cerebri a dva hemisférické tumory. Věkové zastoupení pacientů v této skupině bylo od 2-11 let. Prognosticky se jednalo o velmi agresivní onemocnění, kdy tři pacienti této skupiny zemřeli do 2 let od stanovení diagnózy. Unikátní výjimku tvoří pacientka, která podstoupila resekci, intenzivní chemoterapii a radioterapii, a nyní žije více než 20 let od diagnózy.

### 4.2.3 Infantilní high-grade gliomy

Identifikovali jsme podskupinu tzv. infantilních high-grade gliomů – tzn. vyskytujících se u velmi malých dětí (zde mladších 3 let). Lokalizací se jednalo o tři hemisférické gliomy. Methylační profily u dvou z těchto pacientů odpovídaly třídě „Infant hemispheric glioma“ (n=2). U všech tří pacientů byla NGS identifikována genová fúze *ETV6::NTRK3*, *STRN3::NTRK2* a *GIT2::ROSI* a mohla u nich tak být zahájena léčba NTRK inhibitory s dlouhodobým přežitím více než 10 let od doby diagnózy. U jedné z pacientek došlo po vysazení léčby a dlouhodobé remisi k recidivě nádoru. Po opětovném nasazení terapie NTRK inhibitem bohužel vyvinula rezistenci a zemřela po 12 letech od diagnózy.

### 4.2.4 Hypermutantní high-grade gliomy

Identifikovali jsme jednu pacientku s histologicky blíže neurčeným objemným hemisferálním HGG, se somatickou mutací *TP53*, *PTEN* a *NFI*, methylačním profilem „Diffuse paediatric-type high grade glioma, RTK1 subtype“ a vysokou mutační náloží SNV n=386 odpovídající skupině hypermutantních HGG. U pacientky nebyla nalezena vrozená genetická predispozice svědčící pro poruchu DNA mismatch repair, se kterými se nálezy hypermutantních nádorů spojují. Na základě v literatuře dokumentovaného efektivního použití imunoterapie u těchto pacientů jsme zvolili po resekci léčbu tzv. check-point inhibitem nivolumabem. Bohužel i přes to došlo u pacientky k progresi onemocnění. Krátce byla podávána také terapie MEK inhibitem pro mutaci v MAPK dráze. Bohužel 15 měsíců od diagnózy pacientka zemřela při progresi základního onemocnění.

## 4.3 Radioterapií indukované gliomy

**Trkova K**, Sumerauer D, Bubenikova A, Krskova L, Vicha A, Koblizek M, Zamecnik J, Jurasek B, Kyncl M, Malinova B, Ondrova B, Jones DTW, Sill M, Strnadova M, Stolova L, Misove A, Benes V 3rd, Zapotocky M. Clinical and molecular study of radiation-induced gliomas. *Sci Rep.* 2024 Feb 7;14(1):3118. doi: 10.1038/s41598-024-53434-0. PMID: 38326438; PMCID: PMC10850080.

(viz **Příloha 3**)

Naše vědecká skupina provedla komplexní retrospektivní studii zaměřenou na výskyt, histopatologickou a molekulárně biologickou charakteristiku a výsledky léčby radioterapií indukovaných gliomů (RIG) u dětských pacientů. Kohortu tvořilo 11 pacientů, kteří podstoupili

radioterapii krania pro primární nádory mozku a T-buněčnou akutní lymfoblastickou leukémií (T-ALL) na našem pracovišti, a jeden pacient primárně léčený v zahraničí. V kohortě 371 pacientů léčených na našem pracovišti v letech 2000-2022 jsme identifikovali 8 z těchto případů RIG s cílem kvantifikovat kumulativní riziko vzniku radioterapií indukovaného gliomu u ozařovaných pacientů.

Naše zjištění odhalila kumulativní riziko vzniku RIG ve výši 1,60 % po 10 letech a 3,02 % po 15 letech po RT, což podtrhuje dlouhodobé riziko spojené s radioterapií CNS v dětské onkologii. Studie zdůraznila důležitost dlouhodobého sledování a ukázala, že RIG se může vyvinout v průměru 9,5 roku po ukončené primární léčbě (3-31 let), přičemž věk pacientů při primární diagnóze se pohyboval v rozmezí 2-11 let s mediánem 9 let věku.

Zásadním cílem této studie byla molekulární charakterizace RIG, která ukázala, že RIG postrádají běžné mutace, které se pojí s jejich primárními protějšky, jako jsou mutace v genech pro *Histon3*, *IDH1/2* nebo *BRAF*. Tyto nádory vykazovaly methylační profil třídy „GBM\_pedRTK1“ spolu s častým výskytem amplifikace *PDGFRA* a delece *CDKN2A/B*. U jednoho pacienta jsme identifikovali methylační profil „Pleomorphic xanthoastrocytoma“ a mutaci *BRAF V600E*, spojené s jednoznačně lepší prognózou dlouhodobého přežití. Tyto molekulární poznatky mají zásadní význam pro odlišení RIG od primárních nádorů a potenciální nasměrování přístupů k cílené terapii.

Prognóza pacientů s diagnózou RIG byla velmi nepříznivá, s mediánem přežití 7,3 měsíce při využití léčebných postupů léčby primárních HGG. Zároveň jsme ovšem identifikovali dva dlouhodobě přežívající pacienty z kohorty RIG. Jedním z nich byla pacientka s diagnózou *IDH1* wildtype gliomaosis cerebri, kterou však nebylo možné kvůli nedostatku bioptického materiálu dále charakterizovat. Navzdory jasně dokumentované progresi bylo onemocnění v dlouhodobém horizontu (7 let od diagnózy) terapeuticky stabilizováno opětovným ozářením (u této pacientky třetím cyklem radioterapie). Druhý pacient s biologicky příznivějším profilem nádoru (PXA) byl charakterizován mutací *BRAF V600E* a prodělal opakované resekce, radioterapii a léčbu temozolomidem, a je nyní naživu více než 8 let od diagnózy RIG.

Naše studie se rovněž snažila definovat radiologické charakteristiky RIG, které vykazovaly několik různorodých nálezů. Tato variabilita představuje diagnostickou výzvu, kterou RIG představují, a to jejich odlišení od primárních nádorů a radiační nekrózy pouze na základě zobrazovacích metod, a zdůrazňuje nezastupitelnou úlohu pokročilé molekulární diagnostiky při přesné identifikaci a volbě léčby těchto nádorů.

## 5 Diskuze

Cílem mé práce bylo komplexně molekulárně biologicky charakterizovat pediatrickou kohortu pacientů s high-grade gliomy, která byla diagnostikována a léčena na Klinice dětské onkologie a hematologie 2. LF UK a FN Motol v letech 2000-2023 a přinést tak nová důležitá poznání o této skupině devastujících onemocněních dětského věku. Ačkoliv se jedná o velmi vzácná onemocnění, dokázali jsme identifikovat 114 unikátních případů těchto pacientů. Přestože u retrospektivních dat, která byla shromažďována po poměrně dlouhou časovou periodu, hrozí jistá nekonzistence vzhledem k postupně se vyvíjející diagnostice, novým léčebným postupům atd., podařilo se během našeho výzkumu kohortu pacientů velmi detailně charakterizovat a identifikovat molekulárně biologické cíle, které jsou významné pro definování prognózy pacientů a volbu vhodné léčby.

Navzdory úsilí celosvětové neuroonkologické komunity zůstávají pediatrické HGG onemocněním, které je provázeno velmi špatnou, v případě např. DIPG téměř univerzálně fatální prognózou, kdy na poli léčby nedošlo bohužel v posledních dvou dekadách k významnějšímu pokroku.(Braunstein et al. 2017) K naprosto zásadním objevům, které mohou pomoci tyto smutné výsledky měnit, došlo v oblasti výzkumu patogeneze a detailní klasifikace HGG díky využití moderních genetických a epigenetických metod.

Důležitým poznatkem bylo odlišení od dospělých protějšků těchto onemocnění, které se histopatologickým obrazem, kterým je obvykle glioblastom nebo anaplastický astrocytom, v podstatě neliší, ale molekulárně biologicky tvoří velmi rozdílnou skupinu.(Mackay et al. 2017) Identifikace mutací genu *Histon3* u pediatrických HGG je jedním z těchto klíčových rozdílů, který ukázal, jak důležitou roli hrají epigenetické změny v onkogenezi jako takové.(Schwartzentruber et al. 2012) Mutovány jsou nejčastěji geny *H3F3A* a *HIST1H3B* a to mechanismem substituce aminokyselin K27M nebo G34R/V. V naší kohortě jsme tyto mutace identifikovali u 42 % pacientů, tumory nesoucí mutace *H3F3A* K27M a *HIST1H3B* K27M byly lokalizovány v oblasti mozkového kmene a středočárových struktur, tumory s mutacemi *H3F3A* G34R/V pak výhradně v oblasti mozkových hemisfér. Toto rozvrstvení odpovídá dalšímu publikovanému souboru.(Mackay et al. 2017)

V naší studii jsme významně přispěli k pochopení patogeneze mutací *H3F3A* G34R/V u pediatrických HGG a výsledky publikovali v časopise Cell. (Chen et al. 2020) Odhalili jsme, že tyto nádory překvapivě nepocházejí z gliálních, ale z interneuronálních progenitorů charakterizovaných zvýšenou expresí homeodoménového genu *GSX2*. Zjistili jsme, že 50 %

těchto nádorů současně s mutacemi H3F3A vykazuje mutace genu *PDGFRA*, které jsou lokalizovány v extracelulární doméně proteinu a spojeny s jeho zvýšenou expresí. Tato signalizace aktivuje dráhu MAPK/ERK, což spouští expresi genů typických pro gliální tkáň, konkrétně pro astrocyty, což vede k vývoji smíšené glioneuronální tkáně. Ačkoliv předběžné výsledky naznačují rezistenci těchto nádorů vůči běžným inhibitorům *PDGFRA*, pochopení tohoto mechanismu může usnadnit cestu k léčbě tohoto onemocnění.

U kmenových a středočárových lézí, které nesou mutaci H3F3A K27M nebo HIST1H3B K27M, jsme identifikovali sekundární alterace v genech *ACVR1*, *PIK3CA*, *FGFR1*, *PDGFRA* a *TP53*, které se spolupodílejí na vývoji těchto malignit a zároveň mohou znamenat příležitosti při hledání cílené léčby, podobně jako v dalších studiích. (Groves, Bandopadhyay, and Cooney 2023) U pacienta s H3F3A K27M mutovaným DIPG, který se manifestoval atypicky v 17 letech věku, jsme vyšetřením NGS našli mutaci *PDGFRA* N659K. Při další progresi onemocnění po provedené fokální reiradiaci jsme na základě prvních v literatuře popsáných zkušeností zahájili podávání *PDGFRA* inhibitoru avapritinibu. (Mayr et al. 2022) Bohužel i přes tento terapeutický zásah došlo k progresi onemocnění a pacient zemřel 11 měsíců od diagnózy.

U pacientů s DIPG a DMG – nádorů s uniformě fatální prognózou – je nyní terapeutickým standardem, který však vede pouze k zmírnění klinických příznaků a prodloužení délky života, fokální radioterapie o celkové dávce obvykle 54 – 59,4 Gy v 30-33 frakcích po 1,8 Gy. Dle našich i v literatuře popsáných zkušeností se jeví efektivní a bezpečná možnost paliativní reiradiace v době progresu těchto pacientů v odstavu minimálně 6 měsíců od primární radioterapie s dokumentovanou dobou prodloužení délky života v průměru o 6 měsíců. To odpovídá i zkušenosti publikované v této práci (Lassaletta et al. 2018), kde použitá reiradiace vedla k prodloužení života o 4 měsíce oproti historické kohortě, kde reiradiace použita nebyla.

V současnosti probíhá v zahraničí několik klinických studií, které se snaží na základě molekulárně biologických výsledků získaných biopsiemi pacientů s DIPG a DMG o pokrok v léčbě tohoto devastujícího onemocnění. Jedná se zejména o studii s využitím molekuly ONC201, což je antagonist dopaminového receptoru D2, u kterého byl demonstrován průnik do mozkové tkáně, terapeutické koncentrace a aktivita cílená na tkáň gliomu. Toho je dosaženo prostřednictvím hyperaktivace mitochondriální caseinolytické proteázy, zvýšené signalizací dráhy PI3K/AKT poháněné tvorbou reaktivních forem kyslíku sekundárně v důsledku mitochondriální degradace a indukci apoptózy. (Venneti et al. 2023) Dalším příkladem nových léčebných postupů je cílení povrchových markerů jako je např. GD2. U pacientů s DIPG bylo v rámci klinické studie také testováno podání geneticky upravených T lymfocytů

s chimerickým antigenním receptorem – tzv. CAR T lymfocytů cílených proti povrchovému antigenu GD2, který je hojně exprimován na buňkách nesoucích mutaci H3 K27M. Účinek takto upravených CAR T lymfocytů spočívá ve vyvolání masivní antigen dependentní cytokinové reakce, která ničí nádorové buňky. Efektivita tohoto mechanismu byla velmi dobře prokázána na modelech imunosuprimovaných myši, kde podání takto upravených CAR T lymfocytů vedlo k úplné regresi H3 K27 mutovaného gliomu. (Mount et al. 2018) Podání anti-GD2 CAR T lymfocytů u pacientů ve fázi I klinické studie NCT04196413 prokázalo dočasný radiologický a klinický efekt. Anti-GD2 CAR T lymfocyty byly těmto pacientům aplikovány nejprve intravenózně a v případě příznivé léčebné odpovědi i intraventrikulárně. Vzhledem k lokalizaci těchto tumorů v oblasti mozkového kmene a bouřlivé cytokinové odpovědi, která může způsobit edém této oblasti, obstrukční hydrocefalus a přesun středových struktur, je nezbytný kritický management intenzivní podpůrné péče. (Majzner et al. 2022). Další recentně probíhající studie hledající odpověď na otázku léčby těchto onemocnění se soustředí na poznání tzv. tumorózního mikroprostředí (TME) a vzájemných interakcí např. neuronů s buňkami gliomů. Práce (Venkatesh et al. 2017, 2019) demonstrují, že neuronální aktivita podporuje proliferaci high-grade gliomů a reguluje růst gliomů prostřednictvím vylučovaných faktorů. Jedním z těchto klíčových faktorů je neuroligin-3 (NLGN3), který podporuje růst gliomů aktivací četných onkogenních signálních drah. Dále bylo zjištěno, že významným účinkem NLGN3 je regulace exprese synaptických genů v gliomech a že gliomové buňky se mohou zapojit do synaptické komunikace s neurony v TME např. prostřednictvím AMPA receptorů. Role TME je zkoumána také z imunitních aspektů a tyto práce (Lieberman et al. 2019; Quail and Joyce 2017) se shodují v hodnocení pediatrických HGG jako nádorů, které jsou charakteristické svým imunosupresivním mikroprostředím, které komplikuje využití imunoterapeutických postupů.

Diagnóza DIPG stále může být adekvátně stanovena na základě typického MRI obrazu a klinických příznaků a mnoho zahraničních pracovišť biopsii v těchto případech neindikuje. Nicméně je evidentní, že pokud je biopsie prováděna na neurochirurgickém pracovišti s expertizou v těchto případech, pro pacienta není zásadním způsobem riziková, a zejména pokud je prováděna stereotaktickou jehlovou biopsií, jedná se o šetrnou metodu. Na našem pracovišti jsme tímto způsobem bioptovali v posledních 3 letech 18 pacientů z 21 pontinních HGG bez zásadních klinických komplikací. Získání takového vzorku je jediným způsobem, jak pátrat u konkrétního pacienta po možných cílitelných alteracích a zároveň přispět ke kolektivnímu poznání biologie těchto nemocnění. Nález specifických histonových mutací a



souvisejících mutací v genech jako jsou *TP53*, *ATRX*, *ACVR1/ALK2* a *PI3KR1* a *PDGFRA*, poskytuje nové potenciální terapeutické cíle a prognostické biomarkery, které by nemohly být bez diagnostických biopsií rozpoznány.(Cohen et al. 2017)

Provedení biopsie a extenzivního molekulárně biologického vyšetření je však zcela nezbytné u případů DIPG, které vykazují atypický obraz – ať už je to neobvyklá věková skupina (děti mladší než 3 roky, nebo naopak adolescenti) či případy, které nenesou zcela jasný MRI obraz. To dokazuje námi publikovaný případ 14 měsíčního pacienta, který kromě nízkého věku nesl všechny charakteristiky DIPG.(Trkova et al. 2023) Nebyla však u něj nalezena mutace v Histonu 3, a proto zvolena léčba intenzivní chemoterapií namísto fokální radioterapie, která by v tomto věku byla z dlouhodobého hlediska zatížena závažnými nežádoucími účinky. Dokumentovali jsme vynikající léčebný efekt, který by byl velmi překvapivý u skutečného DIPG. Další vyšetření pak odhalila genovou fúzi *MYB::QKI*, která se typicky vyskytuje u low-grade angiocentrických gliomů, které bývají většinou případů lokalizovány hemisferálně, spojeny s klinickým obrazem epilepsie a velmi dobře řešitelné resekci.(Bandopadhyay 2016) Nádor našeho pacienta však nenesl histologické charakteristiky angiocentrického gliomu. V literatuře byly popsány vzácné případy pontinních angiocentrických gliomů nebo gliomů nesoucích *MYB::QKI* genovou fúzi nebo *MYB* alteraci. Tyto dokumentované případy byly léčeny radioterapií nebo chemoterapeutickými režimy nižší intenzity určené pro LGG a takto výborný klinický efekt dlouhodobé remise nebyl popsán.(Chan et al. 2017; Chiang et al. 2019; Ryall et al. 2020) Třebaže náš pacient představuje jednotlivý případ, dokladuje možnost efektivního využití intenzivního chemoterapeutického režimu pro podobné situace s kompletní molekulárně biologickou charakterizací.

Skupina nádorů H3wt, kterou jsme molekulárně biologicky charakterizovali, je velmi heterogenní a identifikujeme v ní pacienty s dlouhodobým přežitím, jak dokládá i výše popsáný případ pacienta, který může být nyní zařazen do skupiny „LGG-like“. V této skupině se nacházejí pacienti s histologickým obrazem HGG nesoucí alterace genu *BRAF* a methylačními profily klastrujícími s „Pilocytic astrocytoma“ a „Pleomorphic xantoastrocytoma“. V této skupině jsme dokumentovali medián přežití v době sledování 12 let a možnost efektivního terapeutického využití tyrosinkinázových inhibitorů. Takto definovaná skupina je popsána i v práci (Mackay et al. 2017), kde je dlouhodobé přežití této skupiny pacientů spojováno i s faktorem velmi nízkého věku v jejich skupině „LGG-like“ pacientů podobně jako u infantilních hemisférických HGG. U této skupiny pacientů jsme objevili genové fúze *NTRK*, umožňující využití *NTRK* inhibitorů jako je např. larotrectinib. V literatuře byly u těchto

hemisferálních gliomů velmi malých dětí popsány alterace v genech *ALK*, *ROS*, *NTRK*, *MET*.(Clarke et al. 2020; Guerreiro Stucklin et al. 2019)

Dalšími třemi významnými podskupinami H3wt HGG popsanými mimo jiné v práci (Korshunov et al. 2017) jsou skupiny pedHGG\_RTKI, pedHGG\_RTKII a pedHGG\_MYCN. Skupina pedHGG\_RTKI je nejpočetněji zastoupenou skupinou. Nacházíme v ní zástupce v podstatě dalších dvou jednotek, a těmi jsou HGG vzniklé na podkladě germinální mutace v genech zodpovědných za opravu DNA, jako je např. syndrom konstitutivního deficitu genů mismatch opravy (CMMRD) nebo Lynchův syndrom, a radioterapií indukované gliomy. Nádory vzniklé na základě poruchy opravy replikace DNA jsou charakteristické mikrosatelitní nestabilitou a vysokou mutační náloží, která je v tomto případě definována jako >10 mutací na megabázi. Tato vysoká somatická mutační nálož a neustálý vznik dalších neoantigenů vedou k zvýšené imunogenicitě, která je u nádorů CNS jinak velmi neobvyklá a otevírá dveře pro využití imunoterapie např. PD-1 inhibitory.(Das et al. 2022) V této práci bylo dokumentováno použití PD-1 inhibitorů (nivolumabu a pembrolizumabu), které patří mezi tzv. inhibitory kontrolního bodu u pacientů s hypermutantními HGG. Ve srovnání s podáním standardní léčby, kterou je RT a podání chemoterapie temozolomidu, byla zaznamenána u PD-1 inhibitorů velmi dobrá léčebná odpověď s pravděpodobností celkového přežití 39,3 % ve třech letech sledování. U HGG s hypermutantním fenotypem byl také dokumentován častý výskyt alterací v MAPK dráze, který ukazuje na možnost využití MEK inhibitorů u těchto velmi agresivních tumorů. U naší pacientky s hypermutantním HGG (386 mutací / Mb), somatickou mutací *POLE*, *MSH6* a *NFI* genu jsme po radioterapii zahájili iniciálně podávání PD-1 inhibitoru nivolumabu a při progresi onemocnění následně i MEK inhibitoru. Bohužel pacientka podlehlá progresi onemocnění 26 měsíců od diagnózy.

Významná část naší práce se věnovala molekulárně biologické charakteristice kohorty pacientů s radioterapií indukovanými gliomy.(Trkova et al. 2024) RIG představují závažné pozdní následky radioterapie krania, které byly diagnostikovány 3-45 let po předchozí radioterapii při léčbě primárního onemocnění (akutní lymfoblastické leukémie a nádory mozku). Bylo pro nás překvapením, že RIG představují více než 20 % všech intrakraniálních intraaxiálních pozdních událostí, které se vyskytly déle než 3 roky po stanovení primární diagnózy. RIG by proto měl být vyloučen ve všech případech s podezřením na recidivu nebo progresi primárního onemocnění po tomto časovém horizontu. Dále jsme představili model odhadující riziko vzniku RIG na základě homogenní konsektivní kohorty léčené v našem centru v průběhu 15 let. Podařilo se nám odhadnout, že kumulativní riziko RIG dosáhne po 15 letech 3 %. Vzhledem k

tomu, že v naší a i jiných publikovaných kohortách byl zaznamenán rozvoj RIG u pacientů i 35 až 45 let po radioterapii, je velmi pravděpodobné, že skutečné riziko rozvoje RIG po více než 15 letech od primární radioterapie 3 % přesahuje.(Leary et al. 2022) Radioterapeutické kumulativní dávky podávané při primární léčbě se pohybovaly v rozmezí 12 až 59,4 Gy, což dokazuje, že i děti s akutní lymfoblastickou leukémií, které obdržely pouze 12 Gy radioterapie na oblast neurokrania, byly ohroženy rozvojem RIG. To je v souladu s údaji z „The Childhood Cancer Survivor Study“ (CCSS), které prokázaly riziko vzniku sekundárního gliomu v případech, kterým byla aplikována radioterapeutická dávka mozku nad 10 Gy.(Neglia et al. 2006)

RIG představoval onemocnění s velmi špatnou prognózou s mediánem celkového přežití 7,3 měsíce. Tyto výsledky jsou podobně nepříznivé jako u primárních pediatrických H3 mutovaných HGG. V kontrastu s těmito údaji jsme identifikovali dva dlouhodobě přežívající pacienty s RIG. Jedním z nich byla pacientka s IDH1 wildtype gliomatosis cerebri, kterou nebylo možné blíže charakterizovat. Druhý pacient měl biologicky příznivější profil nádoru – PXA s mutací BRAF V600E. V literatuře je publikováno, že malá část nádorů RIG skutečně klastruje s PXA a jsou u nich zastiženy alterace MAPK dráhy zahrnující geny *RAF1*, *NTRK2*, ale také *BRAF*. Mutace BRAF V600E však nebyla v těchto předchozích studiích nikdy reportována.(Deng et al. 2021; DeSisto et al. 2021; Whitehouse et al. 2021)

Komplexní radiologická charakteristika RIG v současné době v literatuře chybí. Jedinečnost našeho souboru spočívá v tom, že všichni pacienti byli vyšetřeni na jednom oddělení jedním radiologickým týmem. Proto můžeme také poprvé poskytnout komplexní radiologickou analýzu souboru pacientů s RIG. MRI obraz pacientů s RIG nejčastěji splňoval charakteristiky léze sytící se v periférii po podání kontrastní látky a tvořící tak kruhový vzorec, hypointenzní v T1, hyperintenzní v T2 a vykazující perilesionální edém ve FLAIR sekvenci. Při takovém nálezu u pacienta s anamnézou radioterapie by měl být RIG součástí diferenciální diagnózy. Nicméně v našem souboru byly pozorovány i jiné vzory sycení, což naznačuje, že absence kruhovitěho sycení nevyklučuje diagnózu RIG. Také může být obtížné odlišit RIG od radiační nekrózy, k čemuž by měly v budoucnu přispět moderní perfúzní sekvence.

Komplexní molekulární charakterizace tkáně pacientů s RIG se ukázala jako klíčová pro stanovení správné diagnózy a identifikaci možných terapeutických cílů. Morfologická diagnóza se ukázala být nepřesná, jak dokumentujeme v našem souboru, kde několik nádorů bylo histopatologicky uzavřeno jako recidiva primární diagnózy. U těchto pacientů upřesnila diagnózu celogenomová metylační array DNA a Heidelbergský metylační klasifikátor. RIG

klastrovaly s methylačními třídami pedHGG\_RTK1, PXA nebo nemohla být methylační třída určena pro nízké kalibrační skóre. Proto byla pro některé případy přínosná další analýza (např. t-SNE klastrování), která potvrdila správnou methylační třídu. V naší studii analýza t-SNE dokázala spolehlivě zařadit nádory do podskupin pedHGG\_RTK1 nebo PXA, včetně případů s velmi nízkým kalibračním skóre. Spojení naší kohorty s dříve publikovaným souborem dat (Deng et al. 2021) ukázalo, že všechny vzorky klastrovali s pedHGG\_RTK1b, pedHGG\_RTK1c nebo PXA methylační třídou. Analýza CNV odvozená z údajů o metylaci DNA prokázala konzistentní nálezy s předchozími studiemi dokumentujícími vysokou prevalenci amplifikace *PDGFRA* a homozygotní delece *CDKN2A*. (Deng et al. 2021; DeSisto et al. 2021) Kromě těchto rekurentních CNV obsahovaly některé případy komplexní CNV změny s amplifikacemi genů *CDK4* nebo *MYCN*. DNA sekvenování odhalilo ve čtyřech případech somatické jednonukleotidové varianty (SNV), včetně BRAF V600E a patogenních somatických variant v genech *PIK3CA*, *PTEN* a *ROS1*. V práci (Deng et al. 2021) uvedli vysoce prioritní cíle získané ze sekvenování RNA vzorků RIG, včetně fúzí genů *MET*, *RAF1* nebo *NTRK2*. Bohužel výtěžnost RNA z naší archivní tkáně nebyla dostatečná pro provedení RNA sekvenování. Nicméně naše studie a dříve publikované údaje jasně naznačují, že komplexní molekulární hodnocení tkáně RIG je nesmírně důležité. Kombinace analýzy CNV (pro amplifikaci *PDGFRA*), sekvenování DNA (řídící SNV) a RNAseq (genové fúze) významně zvyšuje šanci na odhalení terapeutických cílů u tohoto onemocnění s velmi nepříznivou prognózou.

Klasifikace HGG a nádorů CNS jako takových zůstává i nadále velmi dynamickým oborem, kde neustále dochází k objevování a zpřesňování nových molekulárně biologických podskupin. Jejich zástupci se rekrutují z různých histopatologických skupin a poukazují na to, že morfologický obraz je k stanovení přesné diagnózy nedostatečný a často i zavádějící. Z HGG je to např. neuroepiteliální tumor s *PATZ*-fúzí s nejasnou linií původu, u kterého jsou zastoupeny imunohistochemické markery gliální, epiteliální i neuronální tkáně. Charakteristický je pro něj nálezy genové fúze *MNI::PATZ* nebo *EWSR1::PATZI* a je spjatý s intermediární prognózou. (Alhalabi et al. 2021) Další velmi recentně popsanou jednotkou je Embryonální tumor, *PLAG(L1/L2)* amplifikovaný, kterému byly přiřazovány různé histopatologické diagnózy, ať už HGG nebo meduloblastom či jiný embryonální tumor. Charakteristická je pro něj amplifikace na chromozomu 6 (gen *PLAGL1*), chromozomu 20 (gen *PLAGL2*), nebo chromozomu 8 (gen *PLAG1*), která často bývá doprovázena zvýšenou expresí

genu RET, který může být potenciálním terapeutickým cílem. U této vzácné jednotky tumorů je mužské pohlaví významný nepříznivý prognostický faktor.

Ačkoliv moderní genetické a epigenetické metody přinesly zejména v poslední dekádě revoluci v detailní klasifikaci nádorů CNS umožňující významný terapeutický pokrok u mnoha nádorových skupin, zůstává ještě mnoho práce a úsilí před námi, abychom dokázali takové nádory jako jsou pediatrické HGG uspokojivě léčit.

## 6 Závěr

Tato disertační práce se zabývala komplexním molekulárně biologickým zkoumáním pediatrických high-grade gliomů (HGG) s cílem hlouběji pochopit jejich biologii a identifikovat potenciální terapeutické cíle. Hlavní hypotéza práce předpokládala, že genetické a epigenetické alterace určují heterogenitu a biologické chování těchto nádorů.

Práce úspěšně potvrdila tuto hypotézu prostřednictvím detailní charakterizace kohorty pacientů s pediatrickými HGG, včetně identifikace řídicích mutací a epigenetických změn. Byla prokázána zásadní role mutací v genech pro histon H3, které jsou specifické pro pediatrické HGG, včetně jejich role v nádorové patogeneze v případě varianty histonové mutace H3 G34R/V.

V práci byl kladen důraz na molekulárně biologickou charakterizaci radioterapií indukovaných gliomů (RIG), která představuje významný přínos k pochopení pozdních následků radioterapie u pediatrických pacientů a biologie tohoto onemocnění

Dalším významným přínosem práce je poukázání na heterogenitu skupiny HGG H3 wildtype, kde byly identifikovány podskupiny s potenciálně příznivější prognózou, zejména ve podskupině „LGG-like“ a u infantilních HGG s nálezem NTRK fúzí.

Osobní přínos doktorandky spočívá v aplikaci kombinovaného přístupu zahrnujícího genetické a epigenetické výzkumné metody, což umožnilo komplexní charakterizaci pediatrických HGG. Tato práce přináší původní řešení v podobě nově identifikovaných biomarkerů a terapeutických cílů, které mohou významně přispět k dalšímu pokroku v léčbě této závažné skupiny onemocnění.

## 7 Souhrn

Výsledkem této disertační práce jsou celkem tři hlavní publikace. První z nich popisuje roli onkohistonu H3, konkrétně jeho mutace H3F3A G34R/V, a mutace genu *PDGFRA*, která je přítomna netypicky v extracelulární, a ne kinázové doméně. Prokázali jsme, že přítomnost mutace extracelulární části proteinu vede k dimerizaci receptoru a dále k jeho konstitutivní aktivaci a aktivaci MAPK dráhy. Díky single-cell RNA sekvenování bylo zjištěno, že prekurzorem tohoto nádoru není gliální ale interneuronový prekurzor s vysokou expresí genu *Gsx2*. To je významný objev pro pochopení biologie tohoto letálního onemocnění, identifikující možnosti jeho cílené terapie. Druhou publikací je kazuistika pacienta s obrazem nádoru DIPG-like, u kterého jsme zaznamenali vynikající dlouhodobou odpověď na intenzivní

léčbu chemoterapií a identifikovali fúzi *MYB::QKI*, která zařazuje pacienta do skupiny „LGG-like“, která je spojena s velmi dobrou prognózou a dokladuje důležitost biopsie pontinních lézí takových pacientů. Třetí publikací je komplexní molekulárně biologická a klinická analýza kohorty pacientů s radioterapií indukovanými gliomy. Přináší detailní genetickou a epigenetickou charakteristiku těchto lézí, které je umožňují spolehlivě rozlišit od recidivy primární diagnózy. Díky dlouhodobému sledování pacientů ukazuje model rizika rozvoje tohoto onemocnění v čase a dokládá důležitost dispenzarizace těchto pacientů. Kromě těchto publikací vedla praktická aplikace našich výsledků k rozvoji precizní diagnostiky mnoha pacientů s těmito devastujícími onemocněními a dalším může pomoci při hledání kurativní léčby.

## 8 Summary

This work resulted in three main publications. The first describes the role of oncohistone H3, specifically its H3F3A G34R/V mutation, and the *PDGFRA* gene mutation, which is present atypically in the extracellular rather than the kinase domain. We have shown that the presence of a mutation in the extracellular part of the protein leads to dimerization of the receptor and further to its constitutive activation and activation of the MAPK pathway. Single-cell RNA sequencing revealed that the precursor of this tumor is not a glial but an interneuronal precursor with high expression of the *GSX2* gene. This is a significant discovery for understanding the biology of this lethal disease, identifying opportunities for targeted therapy. The second publication is a case report of a patient with a DIPG-like tumor, in whom we observed an excellent long-term response to intensive chemotherapy treatment and identified a *MYB::QKI* fusion that classifies the patient as "LGG-like", which is associated with a very good prognosis and demonstrates the importance of biopsy of pontine lesions in such patients. The third publication is a comprehensive molecular biological and clinical analysis of a cohort of patients with radiotherapy-induced gliomas. It presents detailed genetic and epigenetic characterization of these lesions, which allows to reliably distinguish them from recurrence of the primary diagnosis. Through long-term follow-up of patients, it shows the pattern of risk of developing this disease over time and demonstrates the importance of dispensing these patients. In addition to these publications, the practical application of our results has led to the development of accurate diagnosis for many patients with these devastating diseases and may help others in their search for curative treatment.

## 9 Použitá literatura

- Alhalabi, Karam T., Damian Stichel, Philipp Sievers, Heike Peterziel, Alexander C. Sommerkamp, Dominik Sturm, Andrea Wittmann, Martin Sill, Natalie Jäger, Pengbo Beck, Kristian W. Pajtler, Matija Snuderl, George Jour, Michael Delorenzo, Allison M. Martin, Adam Levy, Nagma Dalvi, Jordan R. Hansford, Nicholas G. Gottardo, Emmanuelle Uro-Coste, Claude-Alain Maurage, Catherine Godfraind, Fanny Vandebos, Torsten Pietsch, Christof Kramm, Maria Filippidou, Antonis Kattamis, Chris Jones, Ingrid Øra, Torben Stamm Mikkelsen, Michal Zapotocky, David Sumerauer, David Scheie, Martin McCabe, Pieter Wesseling, Bastiaan B. J. Tops, Mariëtte E. G. Kranendonk, Matthias A. Karajannis, Nancy Bouvier, Elli Papaemmanuil, Hildegard Dohmen, Till Acker, Katja von Hoff, Simone Schmid, Evelina Miele, Katharina Filipiski, Lidija Kitanovski, Lenka Krskova, Johannes Gojo, Christine Haberler, Frank Alvaro, Jonas Ecker, Florian Selt, Till Milde, Olaf Witt, Ina Oehme, Marcel Kool, Andreas von Deimling, Andrey Korshunov, Stefan M. Pfister, Felix Sahm, and David T. W. Jones. 2021. “PATZ1 Fusions Define a Novel Molecularly Distinct Neuroepithelial Tumor Entity with a Broad Histological Spectrum.” *Acta Neuropathologica* 142(5):841–57.
- Amid, Ali, Daniel L. Keene, and Donna L. Johnston. 2015. “Presentation of Central Nervous System Tumors BT - Pediatric Neuro-Oncology.” Pp. 3–7 in, edited by K. Scheinemann and E. Bouffet. New York, NY: Springer New York.
- Armstrong, Gregory T., Qi Liu, Yutaka Yasui, Sujuan Huang, Kirsten K. Ness, Wendy Leisenring, Melissa M. Hudson, Sarah S. Donaldson, Allison A. King, Marilyn Stovall, Kevin R. Krull, Leslie L. Robison, and Roger J. Packer. 2009. “Long-Term Outcomes among Adult Survivors of Childhood Central Nervous System Malignancies in the Childhood Cancer Survivor Study.” *Journal of the National Cancer Institute* 101(13):946–58.
- Bandopadhyay, Pratiti. 2016. “MYB-QKI Rearrangements in Angiocentric Glioma Drive Tumorigenicity through a Tripartite Mechanism.” *Nature Genetics* 176(1):139–48.
- Bandopadhyay, Pratiti, Guillaume Berghold, Wendy B. London, Liliana C. Goumnerova, Andres Morales La Madrid, Karen J. Marcus, Dongjing Guo, Nicole J. Ullrich, Nathan J. Robison, Susan N. Chi, Rameen Beroukham, Mark W. Kieran, and Peter E. Manley. 2014. “Long-Term Outcome of 4,040 Children Diagnosed with Pediatric Low-Grade Gliomas: An Analysis of the Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) Database.” *Pediatric Blood & Cancer* 61(7):1173–79.
- Bender, Sebastian, Yujie Tang, Anders M. Lindroth, Volker Hovestadt, David T. W. Jones, Marcel Kool, Marc Zapatka, Paul A. Northcott, Dominik Sturm, Wei Wang, Bernhard Radlwimmer, Jonas W. Højfeldt, Nathalie Truffaux, David Castel, Simone Schubert, Marina Ryzhova, Huriye Seker-Cin, Jan Gronych, Pascal David Johann, Sebastian Stark, Jochen Meyer, Till Milde, Martin



- Schuhmann, Martin Ebinger, Camelia-Maria Monoranu, Anitha Ponnuswami, Spenser Chen, Chris Jones, Olaf Witt, V. Peter Collins, Andreas von Deimling, Nada Jabado, Stephanie Puget, Jacques Grill, Kristian Helin, Andrey Korshunov, Peter Lichter, Michelle Monje, Christoph Plass, Yoon-Jae Cho, and Stefan M. Pfister. 2013. “Reduced H3K27me3 and DNA Hypomethylation Are Major Drivers of Gene Expression in K27M Mutant Pediatric High-Grade Gliomas.” *Cancer Cell* 24(5):660–72.
- Bouffet, Eric, Jordan Hansford, Maria Luisa Garré, Junichi Hara, Ashley Plant-Fox, Isabelle Aerts, Franco Locatelli, Jasper der Lugt, Ludmila Papusha, Felix Sahm, Uri Tabori, Kenneth J. Cohen, Roger J. Packer, Olaf Witt, Lali Sandalic, Ana da Silva, Mark W. Russo, and Darren R. Hargrave. 2022. “Primary Analysis of a Phase II Trial of Dabrafenib plus Trametinib (Dab + Tram) in BRAF V600-Mutant Pediatric Low-Grade Glioma (PLGG).” *Journal of Clinical Oncology* 40(17\suppl):LBA2002–LBA2002.
- Braunstein, Steve, David Raleigh, Ranjit Bindra, Sabine Mueller, and Daphne Haas-Kogan. 2017. “Pediatric High-Grade Glioma: Current Molecular Landscape and Therapeutic Approaches.” *Journal of Neuro-Oncology* 134(3):541–49.
- Broniscer, Alberto, and Kim Nichols. 2018. “Predisposition Syndromes to Central Nervous System Cancers BT - Brain Tumors in Children.” Pp. 91–116 in, edited by A. Gajjar, G. H. Reaman, J. M. Racadio, and F. O. Smith. Cham: Springer International Publishing.
- Buczkwicz, Pawel, Ute Bartels, Eric Bouffet, Oren Becher, and Cynthia Hawkins. 2014. “Histopathological Spectrum of Paediatric Diffuse Intrinsic Pontine Glioma: Diagnostic and Therapeutic Implications.” *Acta Neuropathologica* 128(4):573–81.
- Buczkwicz, Pawel, Christine Hoeman, Patricia Rakopoulos, Sanja Pajovic, Louis Letourneau, Misko Dzamba, Andrew Morrison, Peter Lewis, Eric Bouffet, Ute Bartels, Jennifer Zuccaro, Sameer Agnihotri, Scott Ryall, Mark Barszczyk, Yevgen Chornenkyy, Mathieu Bourgey, Guillaume Bourque, Alexandre Montpetit, Francisco Cordero, Pedro Castelo-Branco, Joshua Mangerel, Uri Tabori, King Ching Ho, Annie Huang, Kathryn R. Taylor, Alan Mackay, Anne E. Bendel, Javad Nazarian, Jason R. Fangusaro, Matthias A. Karajannis, David Zagzag, Nicholas K. Foreman, Andrew Donson, Julia V Hegert, Amy Smith, Jennifer Chan, Lucy Lafay-Cousin, Sandra Dunn, Juliette Hukin, Chris Dunham, Katrin Scheinemann, Jean Michaud, Shayna Zelcer, David Ramsay, Jason Cain, Cameron Brennan, Mark M. Souweidane, Chris Jones, C. David Allis, Michael Brudno, Oren Becher, and Cynthia Hawkins. 2014. “Genomic Analysis of Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas Identifies Three Molecular Subgroups and Recurrent Activating ACVR1 Mutations.” *Nature Genetics* 46(5):451–56.
- Capper, David, David T. W. Jones, Martin Sill, Volker Hovestadt, Daniel Schrimpf, Dominik Sturm,

Christian Koelsche, Felix Sahn, Lukas Chavez, David E. Reuss, Annkathrin Kratz, Annika K. Wefers, Kristin Huang, Kristian W. Pajtler, 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, Roland Coras, Annett Hölsken, Ekkehard Hewer, Melanie Bewerunge-Hudler, Matthias Schick, Roger Fischer, Rudi Beschorner, Jens Schittenhelm, Ori Staszewski, Khalida Wani, Pascale Varlet, Melanie Pages, Petra Temming, Dietmar Lohmann, Florian Selt, Hendrik Witt, Till Milde, Olaf Witt, Eleonora Aronica, Felice Giangaspero, Elisabeth Rushing, Wolfram Scheurlen, Christoph Geisenberger, Fausto J. Rodriguez, Albert Becker, Matthias Preusser, Christine Haberler, Rolf Bjerkvig, Jane Cryan, Michael Farrell, Martina Deckert, Jürgen Hench, Stephan Frank, Jonathan Serrano, Kasthuri Kannan, Aristotelis Tsirogos, Wolfgang Brück, Silvia Hofer, Stefanie Brehmer, Marcel Seiz-Rosenhagen, Daniel Hänggi, Volkmar Hans, Stephanie Rozsnoki, Jordan R. Hansford, Patricia Kohlhof, Bjarne W. Kristensen, Matt Lechner, Beatriz Lopes, Christian Mawrin, Ralf Ketter, Andreas Kulozik, Ziad Khatib, Frank Heppner, Arend Koch, Anne Jouvét, Catherine Keohane, Helmut Mühleisen, Wolf Mueller, Ute Pohl, Marco Prinz, Axel Benner, Marc Zapatka, Nicholas G. Gottardo, Pablo Hernáiz Driever, Christof M. Kramm, Hermann L. Müller, Stefan Rutkowski, Katja Von Hoff, Michael C. Frühwald, Astrid Gnekow, Gudrun Fleischhack, Stephan Tippelt, Gabriele Calaminus, Camelia Maria Monoranu, Arie Perry, Chris Jones, Thomas S. Jacques, Bernhard Radlwimmer, Marco Gessi, Torsten Pietsch, Johannes Schramm, Gabriele Schackert, Manfred Westphal, Guido Reifenberger, Pieter Wesseling, Michael Weller, Vincent Peter Collins, Ingmar Blümcke, Martin Bendszus, Jürgen Debus, Annie Huang, Nada Jabado, Paul A. Northcott, Werner Paulus, Amar Gajjar, Giles W. Robinson, Michael D. Taylor, Zane Jaunmuktane, Marina Ryzhova, Michael Platten, Andreas Unterberg, Wolfgang Wick, Matthias A. Karajannis, Michel Mittelbronn, Till Acker, Christian Hartmann, Kenneth Aldape, Ulrich Schüller, Rolf Buslei, Peter Lichter, Marcel Kool, Christel Herold-Mende, David W. Ellison, Martin Hasselblatt, Matija Snuderl, Sebastian Brandner, Andrey Korshunov, Andreas Von Deimling, and Stefan M. Pfister. 2018. “DNA Methylation-Based Classification of Central Nervous System Tumours.” *Nature*.

Castel, David, Thomas Kergrohen, Arnault Tauziède-Espariat, Alan Mackay, Samia Ghermaoui, Emmanuèle Lechapt, Stefan M. Pfister, Christof M. Kramm, Nathalie Boddaert, Thomas Blauwblomme, Stéphanie Puget, Kévin Beccaria, Chris Jones, David T. W. Jones, Pascale Varlet, Jacques Grill, and Marie-Anne Debily. 2020. “Histone H3 Wild-Type DIPG/DMG Overexpressing EZHIP Extend the Spectrum Diffuse Midline Gliomas with PRC2 Inhibition beyond H3-K27M Mutation.” *Acta Neuropathologica* 139(6):1109–13.

Castel, David, Cathy Philippe, Thomas Kergrohen, Martin Sill, Jane Merlevede, Emilie Barret, Stéphanie Puget, Christian Sainte-Rose, Christof M. Kramm, Chris Jones, Pascale Varlet, Stefan M. Pfister, Jacques Grill, David T. W. Jones, and Marie-Anne Debily. 2018. “Transcriptomic and

Epigenetic Profiling of ‘diffuse Midline Gliomas, H3 K27M-Mutant’ Discriminate Two Subgroups Based on the Type of Histone H3 Mutated and Not Supratentorial or Infratentorial Location.” *Acta Neuropathologica Communications* 6(1):117.

Chan, Emily, Andrew W. Bollen, Deepika Sirohi, Jessica Van Ziffle, James P. Grenert, Cassie N. Kline, Tarik Tihan, Arie Perry, Nalin Gupta, and David A. Solomon. 2017. “Angiocentric Glioma with MYB-QKI Fusion Located in the Brainstem, Rather than Cerebral Cortex.” *Acta Neuropathologica* 134(4):671–73.

Chen, Carol C. L., Shriya Deshmukh, Selin Jessa, Djihad Hadjadj, Véronique Lisi, Augusto Faria Andrade, Damien Faury, Wajih Jawhar, Rola Dali, Hiromichi Suzuki, Manav Pathania, Deli A, Frank Dubois, Eleanor Woodward, Steven Hébert, Marie Coutelier, Jason Karamchandani, Steffen Albrecht, Sebastian Brandner, Nicolas De Jay, Tenzin Gayden, Andrea Bajic, Ashot S. Harutyunyan, Dylan M. Marchione, Leonie G. Mikael, Nikoleta Juretic, Michele Zeinieh, Caterina Russo, Nicola Maestro, Angelia V Bassenden, Peter Hauser, József Virga, Laszlo Bognar, Almos Klekner, Michal Zapotocky, Ales Vicha, Lenka Krskova, Katerina Vanova, Josef Zamecnik, David Sumerauer, Paul G. Ekert, David S. Ziegler, Benjamin Ellezam, Mariella G. Filbin, Mathieu Blanchette, Jordan R. Hansford, Dong-Anh Khuong-Quang, Albert M. Berghuis, Alexander G. Weil, Benjamin A. Garcia, Livia Garzia, Stephen C. Mack, Rameen Beroukhim, Keith L. Ligon, Michael D. Taylor, Pratiti Bandopadhyay, Christoph Kramm, Stefan M. Pfister, Andrey Korshunov, Dominik Sturm, David T. W. Jones, Paolo Salomoni, Claudia L. Kleinman, and Nada Jabado. 2020. “Histone H3.3G34-Mutant Interneuron Progenitors Co-Opt PDGFRA for Gliomagenesis.” *Cell* 183(6):1617-1633.e22.

Chiang, Jason, Julie H. Harreld, Christopher L. Tinkle, Daniel C. Moreira, Xiaoyu Li, Sahaja Acharya, Ibrahim Qaddoumi, and David W. Ellison. 2019. “A Single-Center Study of the Clinicopathologic Correlates of Gliomas with a MYB or MYBL1 Alteration.” *Acta Neuropathologica* 138(6):1091–92.

Clarke, Matthew, Alan Mackay, Britta Ismer, Jessica C. Pickles, Ruth G. Tatevossian, Scott Newman, Tejus A. Bale, Iris Stoler, Elisa Izquierdo, Sara Temelso, Diana M. Carvalho, Valeria Molinari, Anna Burford, Louise Howell, Alex Virasami, Amy R. Fairchild, Aimee Avery, Jane Chalker, Mark Kristiansen, Kelly Haupfear, James D. Dalton, Wilda Orisme, Ji Wen, Michael Hubank, Kathreena M. Kurian, Catherine Rowe, Mellissa Maybury, Stephen Crosier, Jeffrey Knipstein, Ulrich Schüller, Uwe Kordes, David E. Kram, Matija Snuderl, Leslie Bridges, Andrew J. Martin, Lawrence J. Doey, Safa Al-Sarraj, Christopher Chandler, Bassel Zebian, Claire Cairns, Rachael Natrajan, Jessica K. R. Boulton, Simon P. Robinson, Martin Sill, Ira J. Dunkel, Stephen W. Gilheaney, Marc K. Rosenblum, Debbie Hughes, Paula Z. Proszek, Tobey J. Macdonald, Matthias Preusser, Christine Haberler, Irene Slavic, Roger Packer, Ho-Keung Ng, Shani Caspi, Mara

Popović, Barbara Faganel Kotnik, Matthew D. Wood, Lissa Baird, Monika Ashok Davare, David A. Solomon, Thale Kristin Olsen, Petter Brandal, Michael Farrell, Jane B. Cryan, Michael Capra, Michael Karremann, Jens Schittenhelm, Martin U. Schuhmann, Martin Ebinger, Winand N. M. Dinjens, Kornelius Kerl, Simone Hettmer, Torsten Pietsch, Felipe Andreiuolo, Pablo Hernáiz Driever, Andrey Korshunov, Lotte Hiddingh, Barbara C. Worst, Dominik Sturm, Marc Zuckermann, Olaf Witt, Tabitha Bloom, Clare Mitchell, Evelina Miele, Giovanna Stefania Colafati, Francesca Diemedi-Camassei, Simon Bailey, Andrew S. Moore, Timothy E. G. Hassall, Stephen P. Lowis, Maria Tsoli, Mark J. Cowley, David S. Ziegler, Matthias A. Karajannis, Kristian Aquilina, Darren R. Hargrave, Fernando Carceller, Lynley V Marshall, Andreas von Deimling, Christof M. Kramm, Stefan M. Pfister, Felix Sahm, Suzanne J. Baker, Angela Mastronuzzi, Andrea Carai, Maria Vinci, David Capper, Sergey Popov, David W. Ellison, Thomas S. Jacques, David T. W. Jones, and Chris Jones. 2020. “Infant High-Grade Gliomas Comprise Multiple Subgroups Characterized by Novel Targetable Gene Fusions and Favorable Outcomes.” *Cancer Discovery* 10(7):942–63.

Cohen, Kenneth J., Nada Jabado, and Jacques Grill. 2017. “Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas—Current Management and New Biologic Insights. Is There a Glimmer of Hope?” *Neuro-Oncology* 19(8):1025–34.

Das, Anirban, Sumedha Sudhaman, Daniel Morgenstern, Ailish Coblenz, Jiil Chung, Simone C. Stone, Noor Alsafwani, Zihui Amy Liu, Ola Abu Al Karsaneh, Shirin Soleimani, Hagay Ladany, David Chen, Matthew Zatzman, Vanja Cabric, Liana Nobre, Vanessa Bianchi, Melissa Edwards, Lauren C. Sambira Nahum, Ayse B. Ercan, Arash Nabbi, Shlomi Constantini, Rina Dvir, Michal Yalon-Oren, Gadi Abebe Campino, Shani Caspi, Valerie Larouche, Alyssa Reddy, Michael Osborn, Gary Mason, Scott Lindhorst, Annika Bronsema, Vanan Magimairajan, Enrico Opocher, Rebecca Loret De Mola, Magnus Sabel, Charlotta Frojd, David Sumerauer, David Samuel, Kristina Cole, Stefano Chiaravalli, Maura Massimino, Patrick Tomboc, David S. Ziegler, Ben George, An Van Damme, Nobuko Hijiya, David Gass, Rose B. McGee, Oz Mordechai, Daniel C. Bowers, Theodore W. Laetsch, Alexander Lossos, Deborah T. Blumenthal, Tomasz Sarosiek, Lee Yi Yen, Jeffrey Knipstein, Anne Bendel, Lindsey M. Hoffman, Sandra Luna-Fineman, Stefanie Zimmermann, Isabelle Scheers, Kim E. Nichols, Michal Zapotocky, Jordan R. Hansford, John M. Maris, Peter Dirks, Michael D. Taylor, Abhaya V Kulkarni, Manohar Shroff, Derek S. Tsang, Anita Villani, Wei Xu, Melyssa Aronson, Carol Durno, Adam Shlien, David Malkin, Gad Getz, Yosef E. Maruvka, Pamela S. Ohashi, Cynthia Hawkins, Trevor J. Pugh, Eric Bouffet, and Uri Tabori. 2022. “Genomic Predictors of Response to PD-1 Inhibition in Children with Germline DNA Replication Repair Deficiency.” *Nature Medicine* 28(1):125–35.

Deng, Maximilian Y., Dominik Sturm, Elke Pfaff, Martin Sill, Damian Stichel, Gnana Prakash

- Balasubramanian, Stephan Tippelt, Christof Kramm, Andrew M. Donson, Adam L. Green, Chris Jones, Jens Schittenhelm, Martin Ebinger, Martin U. Schuhmann, Barbara C. Jones, Cornelis M. van Tilburg, Andrea Wittmann, Andrey Golanov, Marina Ryzhova, Jonas Ecker, Till Milde, Olaf Witt, Felix Sahn, David Reuss, David Sumerauer, Josef Zamecnik, Andrey Korshunov, Andreas von Deimling, Stefan M. Pfister, and David T. W. Jones. 2021. “Radiation-Induced Gliomas Represent H3-/IDH-Wild Type Pediatric Gliomas with Recurrent PDGFRA Amplification and Loss of CDKN2A/B.” *Nature Communications* 12(1):5530.
- DeSisto, John, John T. Jr Lucas, Ke Xu, Andrew Donson, Tong Lin, Bridget Sanford, Gang Wu, Quynh T. Tran, Dale Hedges, Chih-Yang Hsu, Gregory T. Armstrong, Michael Arnold, Smita Bhatia, Patrick Flannery, Rakeb Lemma, Lakotah Hardie, Ulrich Schüller, Sujatha Venkataraman, Lindsey M. Hoffman, Kathleen Dorris, Jean M. Mulcahy Levy, Todd C. Hankinson, Michael Handler, Arthur K. Liu, Nicholas Foreman, Rajeev Vibhakar, Kenneth Jones, Sariah Allen, Jinghui Zhang, Suzanne J. Baker, Thomas E. Merchant, Brent A. Orr, and Adam L. Green. 2021. “Comprehensive Molecular Characterization of Pediatric Radiation-Induced High-Grade Glioma.” *Nature Communications* 12(1):5531.
- Diamandis, Phedias, Alaa Alkhotani, Jennifer A. Chan, and Cynthia E. Hawkins. 2015. “Histopathological Features of Common Pediatric Brain Tumors BT - Pediatric Neuro-Oncology.” Pp. 41–57 in, edited by K. Scheinemann and E. Bouffet. New York, NY: Springer New York.
- Fangusaro, Jason, Arzu Onar-Thomas, Tina Young Poussaint, Shengjie Wu, Azra H. Ligon, Neal Lindeman, Olivia Campagne, Anu Banerjee, Sridharan Gururangan, Lindsay B. Kilburn, Stewart Goldman, Ibrahim Qaddoumi, Patricia Baxter, Gilbert Vezina, Corey Bregman, Zoltan Patay, Jeremy Y. Jones, Clinton F. Stewart, Michael J. Fisher, Laurence Austin Doyle, Malcolm Smith, Ira J. Dunkel, and Maryam Fouladi. 2021. “A Phase II Trial of Selumetinib in Children with Recurrent Optic Pathway and Hypothalamic Low-Grade Glioma without NF1: A Pediatric Brain Tumor Consortium Study.” *Neuro-Oncology* 23(10):1777–88.
- Fleming, Adam J., and Susan N. Chi. 2012. “Brain Tumors in Children.” *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care* 42(4):80–103.
- Fontebasso, Adam M., Simon Papillon-Cavanagh, Jeremy Schwartzentruber, Hamid Nikbakht, Noha Gerges, Pierre-Olivier Fiset, Denise Bechet, Damien Faury, Nicolas De Jay, Lori A. Ramkissoon, Aoife Corcoran, David T. W. Jones, Dominik Sturm, Pascal Johann, Tadanori Tomita, Stewart Goldman, Mahmoud Nagib, Anne Bendel, Liliana Goumnerova, Daniel C. Bowers, Jeffrey R. Leonard, Joshua B. Rubin, Tord Alden, Samuel Browd, J. Russell Geyer, Sarah Leary, George Jallo, Kenneth Cohen, Nalin Gupta, Michael D. Prados, Anne-Sophie Carret, Benjamin Ellezam, Louis Crevier, Almos Klekner, Laszlo Bogнар, Peter Hauser, Miklos Garami, John Myseros,

- Zhifeng Dong, Peter M. Siegel, Hayley Malkin, Azra H. Ligon, Steffen Albrecht, Stefan M. Pfister, Keith L. Ligon, Jacek Majewski, Nada Jabado, and Mark W. Kieran. 2014. "Recurrent Somatic Mutations in ACVR1 in Pediatric Midline High-Grade Astrocytoma." *Nature Genetics* 46(5):462–66.
- Groves, Andrew, Pratiti Bandopadhyay, and Tabitha M. Cooney. 2023. "Diffuse Intrinsic Pontine Glioma: Insights into Oncogenesis and Opportunities for Targeted Therapy." *Pediatric Hematology Oncology Journal* 8(2):73–79.
- Guerreiro Stucklin, Ana S., Scott Ryall, Kohei Fukuoka, Michal Zapotocky, Alvaro Lassaletta, Christopher Li, Taylor Bridge, Byungjin Kim, Anthony Arnoldo, Paul E. Kowalski, Yvonne Zhong, Monique Johnson, Claire Li, Arun K. Ramani, Robert Siddaway, Liana Figueiredo Nobre, Pasqualino de Antonellis, Christopher Dunham, Sylvia Cheng, Daniel R. Boué, Jonathan L. Finlay, Scott L. Coven, Inmaculada de Prada, Marta Perez-Somarriba, Claudia C. Faria, Michael A. Grotzer, Elisabeth Rushing, David Sumerauer, Josef Zamecnik, Lenka Krskova, Miguel Garcia Ariza, Ofelia Cruz, Andres Morales La Madrid, Palma Solano, Keita Terashima, Yoshiko Nakano, Koichi Ichimura, Motoo Nagane, Hiroaki Sakamoto, Maria Joao Gil-da-Costa, Roberto Silva, Donna L. Johnston, Jean Michaud, Bev Wilson, Frank K. H. van Landeghem, Angelica Oviedo, P. Daniel McNeely, Bruce Crooks, Iris Fried, Nataliya Zhukova, Jordan R. Hansford, Amulya Nageswararao, Livia Garzia, Mary Shago, Michael Brudno, Meredith S. Irwin, Ute Bartels, Vijay Ramaswamy, Eric Bouffet, Michael D. Taylor, Uri Tabori, and Cynthia Hawkins. 2019. "Alterations in ALK/ROS1/NTRK/MET Drive a Group of Infantile Hemispheric Gliomas." *Nature Communications* 10(1).
- Hoffman, Lindsey M., Mariko DeWire, Scott Ryall, Pawel Buczkowicz, James Leach, Lili Miles, Arun Ramani, Michael Brudno, Shiva Senthil Kumar, Rachid Drissi, Phillip Dexheimer, Ralph Salloum, Lionel Chow, Trent Hummel, Charles Stevenson, Q. Richard Lu, Blaise Jones, David Witte, Bruce Aronow, Cynthia E. Hawkins, and Maryam Fouladi. 2016. "Spatial Genomic Heterogeneity in Diffuse Intrinsic Pontine and Midline High-Grade Glioma: Implications for Diagnostic Biopsy and Targeted Therapeutics." *Acta Neuropathologica Communications* 4:1.
- Hoffman, Lindsey M., Sophie E. M. Veldhuijzen van Zanten, Niclas Colditz, Joshua Baugh, Brooklyn Chaney, Marion Hoffmann, Adam Lane, Christine Fuller, Lili Miles, Cynthia Hawkins, Ute Bartels, Eric Bouffet, Stewart Goldman, Sarah Leary, Nicholas K. Foreman, Roger Packer, Katherine E. Warren, Alberto Broniscer, Mark W. Kieran, Jane Minturn, Melanie Comito, Emmett Broxson, Chie-Schin Shih, Soumen Khatua, Murali Chintagumpala, Anne Sophie Carret, Nancy Yanez Escorza, Timothy Hassall, David S. Ziegler, Nicholas Gottardo, Hetal Dholaria, Renee Doughman, Martin Benesch, Rachid Drissi, Javad Nazarian, Nada Jabado, Nathalie Boddart, Pascale Varlet, Géraldine Giraud, David Castel, Stephanie Puget, Chris Jones, Esther Hulleman,

- Piergiorgio Modena, Marzia Giagnacovo, Manila Antonelli, Torsten Pietsch, Gerrit H. Gielen, David T. W. Jones, Dominik Sturm, Stefan M. Pfister, Nicolas U. Gerber, Michael A. Grotzer, Elke Pfaff, André O. von Bueren, Darren Hargrave, Guirish A. Solanki, Filip Jadrijevic Cvrlje, Gertjan J. L. Kaspers, William P. Vandertop, Jacques Grill, Simon Bailey, Veronica Biassoni, Maura Massimino, Raphaël Calmon, Esther Sanchez, Brigitte Bison, Monika Warmuth-Metz, James Leach, Blaise Jones, Dannis G. van Vuurden, Christof M. Kramm, and Maryam Fouladi. 2018. “Clinical, Radiologic, Pathologic, and Molecular Characteristics of Long-Term Survivors of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma (DIPG): A Collaborative Report From the International and European Society for Pediatric Oncology DIPG Registries.” *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 36(19):1963–72.
- Ida, Cristiane M., Fausto J. Rodriguez, Peter C. Burger, Alissa A. Caron, Sarah M. Jenkins, Grant M. Spears, Dawn L. Aranguren, Daniel H. Lachance, and Caterina Giannini. 2015. “Pleomorphic Xanthoastrocytoma: Natural History and Long-Term Follow-Up.” *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 25(5):575–86.
- Jones, David T. W., Barbara Hutter, Natalie Jäger, Andrey Korshunov, Marcel Kool, Hans-Jörg Warnatz, Thomas Zichner, Sally R. Lambert, Marina Ryzhova, Dong Anh Khuong Quang, Adam M. Fontebasso, Adrian M. Stütz, Sonja Hutter, Marc Zuckermann, Dominik Sturm, Jan Gronych, Bärbel Lasitschka, Sabine Schmidt, Huriye Seker-Cin, Hendrik Witt, Marc Sultan, Meryem Ralser, Paul A. Northcott, Volker Hovestadt, Sebastian Bender, Elke Pfaff, Sebastian Stark, Damien Faury, Jeremy Schwartzentruber, Jacek Majewski, Ursula D. Weber, Marc Zapatka, Benjamin Raeder, Matthias Schlesner, Catherine L. Worth, Cynthia C. Bartholomae, Christof von Kalle, Charles D. Imbusch, Sylwester Radomski, Chris Lawerenz, Peter van Sluis, Jan Koster, Richard Volckmann, Rogier Versteeg, Hans Lehrach, Camelia Monoranu, Beate Winkler, Andreas Unterberg, Christel Herold-Mende, Till Milde, Andreas E. Kulozik, Martin Ebinger, Martin U. Schuhmann, Yoon-Jae Cho, Scott L. Pomeroy, Andreas von Deimling, Olaf Witt, Michael D. Taylor, Stephan Wolf, Matthias A. Karajannis, Charles G. Eberhart, Wolfram Scheurlen, Martin Hasselblatt, Keith L. Ligon, Mark W. Kieran, Jan O. Korb, Marie-Laure Yaspo, Benedikt Brors, Jörg Felsberg, Guido Reifenberger, V. Peter Collins, Nada Jabado, Roland Eils, Peter Lichter, and Stefan M. Pfister. 2013. “Recurrent Somatic Alterations of FGFR1 and NTRK2 in Pilocytic Astrocytoma.” *Nature Genetics* 45(8):927–32.
- Kasper, L. H., and S. J. Baker. 2020. “Invited Review: Emerging Functions of Histone H3 Mutations in Paediatric Diffuse High-Grade Gliomas.” *Neuropathology and Applied Neurobiology* 46(1):73–85.
- Khater, Fida, Sylvie Langlois, Pauline Cassart, Anne-Marie Roy, Mathieu Lajoie, Jasmine Healy, Chantal Richer, Pascal St-Onge, Nelson Piché, Sebastien Perreault, Sonia Cellot, Monia Marzouki,

- Nada Jabado, and Daniel Sinnett. 2019. "Recurrent Somatic BRAF Insertion (p.V504\_R506dup): A Tumor Marker and a Potential Therapeutic Target in Pilocytic Astrocytoma." *Oncogene* 38(16):2994–3002.
- Kleinerman, Ruth A. 2006. "Cancer Risks Following Diagnostic and Therapeutic Radiation Exposure in Children." *Pediatric Radiology* 36 Suppl 2(Suppl 2):121–25.
- Korshunov, Andrey, David Capper, David Reuss, Daniel Schrimpf, Marina Ryzhova, Volker Hovestadt, Dominik Sturm, Jochen Meyer, Chris Jones, Olga Zheludkova, Ella Kumirova, Andrey Golanov, Marcel Kool, Ulrich Schüller, Michel Mittelbronn, Martin Hasselblatt, Jens Schittenhelm, Guido Reifenberger, Christel Herold-Mende, Peter Lichter, Andreas von Deimling, Stefan M. Pfister, and David T. W. Jones. 2016. "Histologically Distinct Neuroepithelial Tumors with Histone 3 G34 Mutation Are Molecularly Similar and Comprise a Single Nosologic Entity." *Acta Neuropathologica* 131(1):137–46.
- Korshunov, Andrey, Marina Ryzhova, Volker Hovestadt, Sebastian Bender, Dominik Sturm, David Capper, Jochen Meyer, Daniel Schrimpf, Marcel Kool, Paul A. Northcott, Olga Zheludkova, Till Milde, Olaf Witt, Andreas E. Kulozik, Guido Reifenberger, Nada Jabado, Arie Perry, Peter Lichter, Andreas von Deimling, Stefan M. Pfister, and David T. W. Jones. 2015. "Integrated Analysis of Pediatric Glioblastoma Reveals a Subset of Biologically Favorable Tumors with Associated Molecular Prognostic Markers." *Acta Neuropathologica* 129(5):669–78.
- Korshunov, Andrey, Daniel Schrimpf, Marina Ryzhova, Dominik Sturm, Lukas Chavez, Volker Hovestadt, Tanvi Sharma, Antje Habel, Anna Burford, Chris Jones, Olga Zheludkova, Ella Kumirova, Christof M. Kramm, Andrey Golanov, David Capper, Andreas von Deimling, Stefan M. Pfister, and David T. W. Jones. 2017. "H3-/IDH-Wild Type Pediatric Glioblastoma Is Comprised of Molecularly and Prognostically Distinct Subtypes with Associated Oncogenic Drivers." *Acta Neuropathologica* 134(3):507–16.
- Krishnatry, Rahul, Nataliya Zhukova, Ana S. Guerreiro Stucklin, Jason D. Pole, Matthew Mistry, Iris Fried, Vijay Ramaswamy, Ute Bartels, Annie Huang, Normand Laperriere, Peter Dirks, Paul C. Nathan, Mark Greenberg, David Malkin, Cynthia Hawkins, Pratiti Bandopadhyay, Mark W. Kieran, Peter E. Manley, Eric Bouffet, and Uri Tabori. 2016. "Clinical and Treatment Factors Determining Long-Term Outcomes for Adult Survivors of Childhood Low-Grade Glioma: A Population-Based Study." *Cancer* 122(8):1261–69.
- Lassaletta, Alvaro, Douglas Strother, Normand Laperriere, Juliette Hukin, Magimairajan Issai Vanan, Karen Goddard, Lucie Lafay-Cousin, Donna L. Johnston, Shayna Zelcer, Michal Zapotocky, Revathi Rajagopal, Vijay Ramaswamy, Cynthia Hawkins, Uri Tabori, Annie Huang, Ute Bartels, and Eric Bouffet. 2018. "Reirradiation in Patients with Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas: The



Canadian Experience.” *Pediatric Blood & Cancer* 65(6):e26988.

Lassaletta, Alvaro, Michal Zapotocky, Matthew Mistry, Vijay Ramaswamy, Marion Honnorat, Rahul Krishnatry, Ana Guerreiro Stucklin, Nataliya Zhukova, Anthony Arnoldo, Scott Ryall, Catriona Ling, Tara McKeown, Jim Loukides, Ofelia Cruz, Carmen de Torres, Cheng-Ying Ho, Roger J. Packer, Ruth Tatevossian, Ibrahim Qaddoumi, Julie H. Harreld, James D. Dalton, Jean Mulcahy-Levy, Nicholas Foreman, Matthias A. Karajannis, Shiyang Wang, Matija Snuderl, Amulya Nageswara Rao, Caterina Giannini, Mark Kieran, Keith L. Ligon, Maria Luisa Garre, Paolo Nozza, Samantha Mascelli, Alessandro Raso, Sabine Mueller, Theodore Nicolaides, Karen Silva, Romain Perbet, Alexandre Vasiljevic, Cécile Faure Conter, Didier Frappaz, Sarah Leary, Courtney Crane, Aden Chan, Ho-Keung Ng, Zhi-Feng Shi, Ying Mao, Elizabeth Finch, David Eisenstat, Bev Wilson, Anne Sophie Carret, Peter Hauser, David Sumerauer, Lenka Krskova, Valerie Larouche, Adam Fleming, Shayna Zelcer, Nada Jabado, James T. Rutka, Peter Dirks, Michael D. Taylor, Shiyi Chen, Ute Bartels, Annie Huang, David W. Ellison, Eric Bouffet, Cynthia Hawkins, and Uri Tabori. 2017. “Therapeutic and Prognostic Implications of BRAF V600E in Pediatric Low-Grade Gliomas.” *Journal of Clinical Oncology* 35(25):2934–41.

Leary, Jacob B., Amy Anderson-Mellies, and Adam L. Green. 2022. “Population-Based Analysis of Radiation-Induced Gliomas after Cranial Radiotherapy for Childhood Cancers.” *Neuro-Oncology Advances* 4(1):vdac159.

Lewis, Peter W., Manuel M. Müller, Matthew S. Koletsky, Francisco Cordero, Shu Lin, Laura A. Banaszynski, Benjamin A. Garcia, Tom W. Muir, Oren J. Becher, and C. David Allis. 2013. “Inhibition of PRC2 Activity by a Gain-of-Function H3 Mutation Found in Pediatric Glioblastoma.” *Science (New York, N.Y.)* 340(6134):857–61.

Lieberman, Nicole A. P., Kole DeGolier, Heather M. Kovar, Amira Davis, Virginia Hoglund, Jeffrey Stevens, Conrad Winter, Gail Deutsch, Scott N. Furlan, Nicholas A. Vitanza, Sarah E. S. Leary, and Courtney A. Crane. 2019. “Characterization of the Immune Microenvironment of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma: Implications for Development of Immunotherapy.” *Neuro-Oncology* 21(1):83–94.

Louis, David N., Arie Perry, Pieter Wesseling, Daniel J. Brat, Ian A. Cree, Dominique Figarella-Branger, Cynthia Hawkins, H. K. Ng, Stefan M. Pfister, Guido Reifenberger, Riccardo Soffietti, Andreas von Deimling, and David W. Ellison. 2021. “The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary.” *Neuro-Oncology* 23(8):1231–51.

Mackay, Alan, Anna Burford, Diana Carvalho, Elisa Izquierdo, Janat Fazal-Salom, Kathryn R. Taylor, Lynn Bjerke, Matthew Clarke, Mara Vinci, Meera Nandhabalan, Sara Temelso, Sergey Popov, Valeria Molinari, Pichai Raman, Angela J. Waanders, Harry J. Han, Saumya Gupta, Lynley

- Marshall, Stergios Zacharoulis, Sucheta Vaidya, Henry C. Mandeville, Leslie R. Bridges, Andrew J. Martin, Safa Al-Sarraj, Christopher Chandler, Ho-Keung Ng, Xingang Li, Kun Mu, Saoussen Trabelsi, Dorra H'mida-Ben Brahim, Alexei N. Kisljakov, Dmitry M. Konovalov, Andrew S. Moore, Angel Montero Carcaboso, Mariona Sunol, Carmen de Torres, Ofelia Cruz, Jaume Mora, Ludmila I. Shats, João N. Stavale, Lucas T. Bidinotto, Rui M. Reis, Natacha Entz-Werle, Michael Farrell, Jane Cryan, Darach Crimmins, John Caird, Jane Pears, Michelle Monje, Marie-Anne Debily, David Castel, Jacques Grill, Cynthia Hawkins, Hamid Nikbakht, Nada Jabado, Suzanne J. Baker, Stefan M. Pfister, David T. W. Jones, Maryam Fouladi, André O. von Bueren, Michael Baudis, Adam Resnick, and Chris Jones. 2017. "Integrated Molecular Meta-Analysis of 1,000 Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma." *Cancer Cell* 32(4):520-537.e5.
- Mackay, Alan, Anna Burford, Valeria Molinari, David T. W. Jones, Elisa Izquierdo, Jurriaan Brouwer-Visser, Felice Giangaspero, Christine Haberler, Torsten Pietsch, Thomas S. Jacques, Dominique Figarella-Branger, Daniel Rodriguez, Paul S. Morgan, Pichai Raman, Angela J. Waanders, Adam C. Resnick, Maura Massimino, Maria Luisa Garrè, Helen Smith, David Capper, Stefan M. Pfister, Thomas Würdinger, Rachel Tam, Josep Garcia, Meghna Das Thakur, Gilles Vassal, Jacques Grill, Tim Jaspan, Pascale Varlet, and Chris Jones. 2018. "Molecular, Pathological, Radiological, and Immune Profiling of Non-Brainstem Pediatric High-Grade Glioma from the HERBY Phase II Randomized Trial." *Cancer Cell* 33(5):829-842.e5.
- Majzner, Robbie G., Sneha Ramakrishna, Kristen W. Yeom, Shabnum Patel, Harshini Chinnasamy, Liora M. Schultz, Rebecca M. Richards, Li Jiang, Valentin Barsan, Rebecca Mancusi, Anna C. Geraghty, Zinaida Good, Aaron Y. Mochizuki, Shawn M. Gillespie, Angus Martin Shaw Toland, Jasia Mahdi, Agnes Reschke, Esther H. Nie, Isabelle J. Chau, Maria Caterina Rotiroti, Christopher W. Mount, Christina Baggott, Sharon Mavroukakis, Emily Egeler, Jennifer Moon, Courtney Erickson, Sean Green, Michael Kunicki, Michelle Fujimoto, Zach Ehlinger, Warren Reynolds, Sreevidya Kurra, Katherine E. Warren, Snehit Prabhu, Hannes Vogel, Lindsey Rasmussen, Timothy T. Cornell, Sonia Partap, Paul G. Fisher, Cynthia J. Campen, Mariella G. Filbin, Gerald Grant, Bitu Sahaf, Kara L. Davis, Steven A. Feldman, Crystal L. Mackall, and Michelle Monje. 2022. "GD2-CAR T Cell Therapy for H3K27M-Mutated Diffuse Midline Gliomas." *Nature* 603(7903):934–41.
- Manoharan, Neevika, Kevin X. Liu, Sabine Mueller, Daphne A. Haas-Kogan, and Pratiti Bandopadhyay. 2023. "Pediatric Low-Grade Glioma: Targeted Therapeutics and Clinical Trials in the Molecular Era." *Neoplasia (New York, N.Y.)* 36:100857.
- Mayr, Lisa, Sibylle Madlener, Liesa Weiler-Wichtl, Verena Rosenmayr, Julia Furtner-Srajer, Armin Guntner, Natalia Stepien, Alicia-Christina Baumgartner, Christian Dorfer, Christine Haberler, Leonhard Müllauer, Hana Palova, Petra Pokorna, Jaroslav Sterba, Karin Dieckmann, Amedeo

- Azizi, Andreas Peyrl, Sean Kim, Antony Hsieh, Sasa Dimitrijevic, and Johannes Gojo. 2022. "DIPG-60. Avapritinib for Targeting PDGFRA in H3K27M – Mutated Diffuse Midline Glioma." *Neuro-Oncology* 24(Supplement\_1):i32–i32.
- Merchant, Thomas E., Larry E. Kun, Shengjie Wu, Xiaoping Xiong, Robert A. Sanford, and Frederick A. Boop. 2009. "Phase II Trial of Conformal Radiation Therapy for Pediatric Low-Grade Glioma." *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27(22):3598–3604.
- Mistry, Matthew, Nataliya Zhukova, Daniele Merico, Patricia Rakopoulos, Rahul Krishnatry, Mary Shago, James Stavropoulos, Noa Alon, Jason D. Pole, Peter N. Ray, Vilma Navickiene, Joshua Mangerel, Marc Remke, Pawel Buczkowicz, Vijay Ramaswamy, Ana Guerreiro Stucklin, Martin Li, Edwin J. Young, Cindy Zhang, Pedro Castelo-Branco, Doua Bakry, Suzanne Laughlin, Adam Shlien, Jennifer Chan, Keith L. Ligon, James T. Rutka, Peter B. Dirks, Michael D. Taylor, Mark Greenberg, David Malkin, Annie Huang, Eric Bouffet, Cynthia E. Hawkins, and Uri Tabori. 2015. "BRAF Mutation and CDKN2A Deletion Define a Clinically Distinct Subgroup of Childhood Secondary High-Grade Glioma." *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 33(9):1015–22.
- Mount, Christopher W., Robbie G. Majzner, Shree Sundaresh, Evan P. Arnold, Meena Kadapakkam, Samuel Haile, Louai Labanieh, Esther Hulleman, Pamelyn J. Woo, Skyler P. Rietberg, Hannes Vogel, Michelle Monje, and Crystal L. Mackall. 2018. "Potent Antitumor Efficacy of Anti-GD2 CAR T Cells in H3-K27M+ Diffuse Midline Gliomas Letter." *Nature Medicine* 24(5):572–79.
- Neglia, Joseph P., Leslie L. Robison, Marilyn Stovall, Yan Liu, Roger J. Packer, Sue Hammond, Yutaka Yasui, Catherine E. Kasper, Ann C. Mertens, Sarah S. Donaldson, Anna T. Meadows, and Peter D. Inskip. 2006. "New Primary Neoplasms of the Central Nervous System in Survivors of Childhood Cancer: A Report from the Childhood Cancer Survivor Study." *Journal of the National Cancer Institute* 98(21):1528–37.
- Nicolaidis, Theodore, Kellie J. Nazemi, John Crawford, Lindsay Kilburn, Jane Minturn, Amar Gajjar, Karen Gauvain, Sarah Leary, Girish Dhall, Mariam Aboian, Giles Robinson, Janel Long-Boyle, Hechuan Wang, Annette M. Molinaro, Sabine Mueller, and Michael Prados. 2020. "Phase I Study of Vemurafenib in Children with Recurrent or Progressive BRAF(V600E) Mutant Brain Tumors: Pacific Pediatric Neuro-Oncology Consortium Study (PNOC-002)." *Oncotarget* 11(21):1942–52.
- Nikbakht, Hamid, Eshini Panditharatna, Leonie G. Mikael, Rui Li, Tenzin Gayden, Matthew Osmond, Cheng-Ying Ho, Madhuri Kambhampati, Eugene I. Hwang, Damien Faury, Alan Siu, Simon Papillon-Cavanagh, Denise Bechet, Keith L. Ligon, Benjamin Ellezam, Wendy J. Ingram, Caedyn Stinson, Andrew S. Moore, Katherine E. Warren, Jason Karamchandani, Roger J. Packer, Nada

- Jabado, Jacek Majewski, and Javad Nazarian. 2016. "Spatial and Temporal Homogeneity of Driver Mutations in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma." *Nature Communications* 7:11185.
- Ostrom, Quinn T., Maral Adel Fahmideh, David J. Cote, Ivo S. Muskens, Jeremy M. Schraw, Michael E. Scheurer, and Melissa L. Bondy. 2019. "Risk Factors for Childhood and Adult Primary Brain Tumors." *Neuro-Oncology* 21(11):1357–75.
- Ostrom, Quinn T., Peter M. de Blank, Carol Kruchko, Claire M. Petersen, Peter Liao, Jonathan L. Finlay, Duncan S. Stearns, Johannes E. Wolff, Yingli Wolinsky, John J. Letterio, and Jill S. Barnholtz-Sloan. 2015. "Alex's Lemonade Stand Foundation Infant and Childhood Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007–2011." *Neuro-Oncology* 16(suppl\_10):x1–36.
- Ostrom, Quinn T., Stephen S. Francis, and Jill S. Barnholtz-Sloan. 2021. "Epidemiology of Brain and Other CNS Tumors." *Current Neurology and Neuroscience Reports* 21(12):68.
- Ostrom, Quinn T., Nirav Patil, Gino Cioffi, Kristin Waite, Carol Kruchko, and Jill S. Barnholtz-Sloan. 2020. "CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013-2017." *Neuro-Oncology* 22(12 Suppl 2):iv1–96.
- Paulsson, Anna K., Michael A. Garcia, David A. Solomon, and Daphne A. Haas-Kogan. 2018. "Low-Grade Gliomas." Pp. 223–50 in *Brain Tumors in Children*, edited by A. Gajjar, G. H. Reaman, J. M. Racadio, and F. O. Smith. Cham: Springer International Publishing.
- Pfister, Stefan M., David Capper, and David T. W. Jones. 2018. "Modern Principles of CNS Tumor Classification BT - Brain Tumors in Children." Pp. 117–29 in, edited by A. Gajjar, G. H. Reaman, J. M. Racadio, and F. O. Smith. Cham: Springer International Publishing.
- Phillips, Joanna J., Henry Gong, Katharine Chen, Nancy M. Joseph, Jessica van Ziffle, Boris C. Bastian, James P. Grenert, Cassie N. Kline, Sabine Mueller, Anuradha Banerjee, Theodore Nicolaides, Nalin Gupta, Mitchel S. Berger, Han S. Lee, Melike Pekmezci, Tarik Tihan, Andrew W. Bollen, Arie Perry, Joseph T. C. Shieh, and David A. Solomon. 2019. "The Genetic Landscape of Anaplastic Pleomorphic Xanthoastrocytoma." *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 29(1):85–96.
- Quail, Daniela F., and Johanna A. Joyce. 2017. "The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors." *Cancer Cell* 31(3):326–41.
- Ryall, Scott, Michal Zapotocky, Kohei Fukuoka, Liana Nobre, Ana Guerreiro Stucklin, Julie Bennett, Robert Siddaway, Christopher Li, Sanja Pajovic, Anthony Arnoldo, Paul E. Kowalski, Monique Johnson, Javal Sheth, Alvaro Lassaletta, Ruth G. Tatevossian, Wilda Orisme, Ibrahim Qaddoumi, Lea F. Surrey, Marilyn M. Li, Angela J. Waanders, Stephen Gilheeny, Marc Rosenblum, Tejus

Bale, Derek S. Tsang, Normand Laperriere, Abhaya Kulkarni, George M. Ibrahim, James Drake, Peter Dirks, Michael D. Taylor, James T. Rutka, Suzanne Laughlin, Manohar Shroff, Mary Shago, Lili-Naz Hazrati, Colleen D'Arcy, Vijay Ramaswamy, Ute Bartels, Annie Huang, Eric Bouffet, Matthias A. Karajannis, Mariarita Santi, David W. Ellison, Uri Tabori, and Cynthia Hawkins. 2020. "Integrated Molecular and Clinical Analysis of 1,000 Pediatric Low-Grade Gliomas." *Cancer Cell* 37(4):569-583.e5.

Schwartzentruber, Jeremy, Andrey Korshunov, Xiao Yang Liu, David T. W. Jones, Elke Pfaff, Karine Jacob, Dominik Sturm, Adam M. Fontebasso, Dong Anh Khuong Quang, Martje Tönjes, Volker Hovestadt, Steffen Albrecht, Marcel Kool, Andre Nantel, Carolin Konermann, Anders Lindroth, Natalie Jäger, Tobias Rausch, Marina Ryzhova, Jan O. Korbel, Thomas Hielscher, Peter Hauser, Miklos Garami, Almos Klekner, Laszlo Bogner, Martin Ebinger, Martin U. Schuhmann, Wolfram Scheurlen, Arnulf Pekrun, Michael C. Frühwald, Wolfgang Roggendorf, Christoph Kramm, Matthias Dürken, Jeffrey Atkinson, Pierre Lepage, Alexandre Montpetit, Magdalena Zakrzewska, Krzysztof Zakrzewski, Pawel P. Liberski, Zhifeng Dong, Peter Siegel, Andreas E. Kulozik, Marc Zapatka, Abhijit Guha, David Malkin, Jörg Felsberg, Guido Reifenberger, Andreas Von Deimling, Koichi Ichimura, V. Peter Collins, Hendrik Witt, Till Milde, Olaf Witt, Cindy Zhang, Pedro Castelo-Branco, Peter Lichter, Damien Faury, Uri Tabori, Christoph Plass, Jacek Majewski, Stefan M. Pfister, and Nada Jabado. 2012. "Driver Mutations in Histone H3.3 and Chromatin Remodelling Genes in Paediatric Glioblastoma." *Nature* 482(7384):226–31.

Sievers, Philipp, Martin Sill, Daniel Schrimpf, Damian Stichel, David E. Reuss, Dominik Sturm, Jürgen Hench, Stephan Frank, Lenka Krskova, Ales Vicha, Michal Zapotocky, Brigitte Bison, David Castel, Jacques Grill, Marie-Anne Debily, Patrick N. Harter, Matija Snuderl, Christof M. Kramm, Guido Reifenberger, Andrey Korshunov, Nada Jabado, Pieter Wesseling, Wolfgang Wick, David A. Solomon, Arie Perry, Thomas S. Jacques, Chris Jones, Olaf Witt, Stefan M. Pfister, Andreas von Deimling, David T. W. Jones, and Felix Sahm. 2021. "A Subset of Pediatric-Type Thalamic Gliomas Share a Distinct DNA Methylation Profile, H3K27me3 Loss and Frequent Alteration of EGFR." *Neuro-Oncology* 23(1):34–43.

Solomon, David A., Matthew D. Wood, Tarik Tihan, Andrew W. Bollen, Nalin Gupta, Joanna J. J. Phillips, and Arie Perry. 2016. "Diffuse Midline Gliomas with Histone H3-K27M Mutation: A Series of 47 Cases Assessing the Spectrum of Morphologic Variation and Associated Genetic Alterations." *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 26(5):569–80.

Stein, Nina Rodrigues, and Luciana Torres Ribeiro. 2015. "Pediatric Neuroimaging BT - Pediatric Neuro-Oncology." Pp. 13–30 in, edited by K. Scheinemann and E. Bouffet. New York, NY: Springer New York.

Steinbok, Paul, Chittur Viswanathan Gopalakrishnan, Alexander R. Hengel, Aleksander M. Vitali, Ken

- Poskitt, Cynthia Hawkins, James Drake, Maria Lamberti-Pasculli, Olufemi Ajani, Walter Hader, Vivek Mehta, P. Daniel McNeely, Patrick J. McDonald, Adrianna Ranger, Michael Vassilyadi, Jeff Atkinson, Scott Ryall, David D. Eisenstat, and Juliette Hukin. 2016. “Pediatric Thalamic Tumors in the MRI Era: A Canadian Perspective.” *Child’s Nervous System : ChNS : Official Journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery* 32(2):269–80.
- Sturm, Dominik, Sebastian Bender, David T. W. Jones, Peter Lichter, Jacques Grill, Oren Becher, Cynthia Hawkins, Jacek Majewski, Chris Jones, Joseph F. Costello, Antonio Iavarone, Kenneth Aldape, Cameron W. Brennan, Nada Jabado, and Stefan M. Pfister. 2014. “Paediatric and Adult Glioblastoma: Multiform (Epi)Genomic Culprits Emerge.” *Nature Reviews Cancer* 14(2):92–107.
- Sturm, Dominik, David Capper, Felipe Andreiuolo, Marco Gessi, Christian Kölsche, Annkathrin Reinhardt, Philipp Sievers, Annika K. Wefers, Azadeh Ebrahimi, Abigail K. Suwala, Gerrit H. Gielen, Martin Sill, Daniel Schrimpf, Damian Stichel, Volker Hovestadt, Bjarne Daenikas, Agata Rode, Stefan Hamelmann, Christopher Previti, Natalie Jäger, Ivo Buchhalter, Mirjam Blattner-Johnson, Barbara C. Jones, Monika Warmuth-Metz, Brigitte Bison, Kerstin Grund, Christian Sutter, Steffen Hirsch, Nicola Dikow, Martin Hasselblatt, Ulrich Schüller, Arend Koch, Nicolas U. Gerber, Christine L. White, Molly K. Buntine, Kathryn Kinross, Elizabeth M. Algar, Jordan R. Hansford, Nicholas G. Gottardo, Martin U. Schuhmann, Ulrich W. Thomale, Pablo Hernáiz Driever, Astrid Gnekow, Olaf Witt, Hermann L. Müller, Gabriele Calaminus, Gudrun Fleischhack, Uwe Kordes, Martin Mynarek, Stefan Rutkowski, Michael C. Frühwald, Christof M. Kramm, Andreas von Deimling, Torsten Pietsch, Felix Sahm, Stefan M. Pfister, and David T. W. Jones. 2023. “Multiomic Neuropathology Improves Diagnostic Accuracy in Pediatric Neuro-Oncology.” *Nature Medicine* 29(4):917–26.
- Sturm, Dominik, Hendrik Witt, Volker Hovestadt, Dong-Anh Khuong-Quang, David T. W. Jones, Carolin Konermann, Elke Pfaff, Martje Tönjes, Martin Sill, Sebastian Bender, Marcel Kool, Marc Zapatka, Natalia Becker, Manuela Zucknick, Thomas Hielscher, Xiao-Yang Liu, Adam M. Fontebasso, Marina Ryzhova, Steffen Albrecht, Karine Jacob, Marietta Wolter, Martin Ebinger, Martin U. Schuhmann, Timothy van Meter, Michael C. Frühwald, Holger Hauch, Arnulf Pekrun, Bernhard Radlwimmer, Tim Niehues, Gregor von Komorowski, Matthias Dürken, Andreas E. Kulozik, Jenny Madden, Andrew Donson, Nicholas K. Foreman, Rachid Drissi, Maryam Fouladi, Wolfram Scheurlen, Andreas von Deimling, Camelia Monoranu, Wolfgang Roggendorf, Christel Herold-Mende, Andreas Unterberg, Christof M. Kramm, Jörg Felsberg, Christian Hartmann, Benedikt Wiestler, Wolfgang Wick, Till Milde, Olaf Witt, Anders M. Lindroth, Jeremy Schwartzentruber, Damien Fauray, Adam Fleming, Magdalena Zakrzewska, Pawel P. Liberski, Krzysztof Zakrzewski, Peter Hauser, Miklos Garami, Almos Klekner, Laszlo Bognar, Sorana Morrissy, Florence Cavalli, Michael D. Taylor, Peter van Sluis, Jan Koster, Rogier Versteeg,

- Richard Volckmann, Tom Mikkelsen, Kenneth Aldape, Guido Reifenberger, V. Peter Collins, Jacek Majewski, Andrey Korshunov, Peter Lichter, Christoph Plass, Nada Jabado, and Stefan M. Pfister. 2012. “Hotspot Mutations in H3F3A and IDH1 Define Distinct Epigenetic and Biological Subgroups of Glioblastoma.” *Cancer Cell* 22(4):425–37.
- Tauziède-Espariat, A., M. A. Debily, D. Castel, J. Grill, S. Puget, A. Roux, R. Saffroy, M. Pagès, A. Gareton, F. Chrétien, E. Lechapt, V. Dangouloff-Ros, N. Boddaert, and P. Varlet. 2020. “The Pediatric Supratentorial MYCN-Amplified High-Grade Gliomas Methylation Class Presents the Same Radiological, Histopathological and Molecular Features as Their Pontine Counterparts.” *Acta Neuropathologica Communications* 8(1):104.
- Trkova, Katerina, David Sumerauer, Adela Bubenikova, Lenka Krskova, Ales Vicha, Miroslav Koblizek, Josef Zamecnik, Bruno Jurasek, Martin Kyncl, Bela Malinova, Barbora Ondrova, David T. W. Jones, Martin Sill, Martina Strnadova, Lucie Stolova, Adela Misove, Vladimir Benes, and Michal Zapotocky. 2024. “Clinical and Molecular Study of Radiation-Induced Gliomas.” *Scientific Reports* 14(1):3118.
- Trkova, Katerina, David Sumerauer, Lenka Krskova, Ales Vicha, Miroslav Koblizek, Tomas Votava, Vladimir Priban, and Michal Zapotocky. 2023. “DIPG-like MYB-Altered Diffuse Astrocytoma with Durable Response to Intensive Chemotherapy.” *Child’s Nervous System : ChNS : Official Journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery* 39(9):2509–13.
- Venkatesh, Humsa S., Wade Morishita, Anna C. Geraghty, Dana Silverbush, Shawn M. Gillespie, Marlene Arzt, Lydia T. Tam, Cedric Espenel, Anitha Ponnuswami, Lijun Ni, Pamelyn J. Woo, Kathryn R. Taylor, Amit Agarwal, Aviv Regev, David Brang, Hannes Vogel, Shawn Hervey-Jumper, Dwight E. Bergles, Mario L. Suvà, Robert C. Malenka, and Michelle Monje. 2019. “Electrical and Synaptic Integration of Glioma into Neural Circuits.” *Nature* 573(7775):539–45.
- Venkatesh, Humsa S., Lydia T. Tam, Pamelyn J. Woo, James Lennon, Surya Nagaraja, Shawn M. Gillespie, Jing Ni, Damien Y. Dubeau, Patrick J. Morris, Jean J. Zhao, Craig J. Thomas, and Michelle Monje. 2017. “Targeting Neuronal Activity-Regulated Neuroigin-3 Dependency in High-Grade Glioma.” *Nature* 549(7673):533–37.
- Venneti, Sriram, Abed Rahman Kawakibi, Sunjong Ji, Sebastian M. Waszak, Stefan R. Sweha, Mateus Mota, Matthew Pun, Akash Deogharkar, Chan Chung, Rohinton S. Tarapore, Samuel Ramage, Andrew Chi, Patrick Y. Wen, Isabel Arrillaga-Romany, Tracy T. Batchelor, Nicholas A. Butowski, Ashley Sumrall, Nicole Shonka, Rebecca A. Harrison, John de Groot, Minesh Mehta, Matthew D. Hall, Doured Daghastani, Timothy F. Cloughesy, Benjamin M. Ellingson, Kevin Beccaria, Pascale Varlet, Michelle M. Kim, Yoshie Umemura, Hugh Garton, Andrea Franson, Jonathan Schwartz, Rajan Jain, Maureen Kachman, Heidi Baum, Charles F. Burant, Sophie L. Mottl, Rodrigo T.

- Cartaxo, Vishal John, Dana Messinger, Tingting Qin, Erik Peterson, Peter Sajjakulnukit, Karthik Ravi, Alyssa Waugh, Dustin Walling, Yujie Ding, Ziyun Xia, Anna Schwendeman, Debra Hawes, Fusheng Yang, Alexander R. Judkins, Daniel Wahl, Costas A. Lyssiotis, Daniel de la Nava, Marta M. Alonso, Augustine Eze, Jasper Spitzer, Susanne V Schmidt, Ryan J. Duchatel, Matthew D. Dun, Jason E. Cain, Li Jiang, Sylwia A. Stopka, Gerard Baquer, Michael S. Regan, Mariella G. Filbin, Nathalie Y. R. Agar, Lili Zhao, Chandan Kumar-Sinha, Rajen Mody, Arul Chinnaiyan, Ryo Kurokawa, Drew Pratt, Viveka N. Yadav, Jacques Grill, Cassie Kline, Sabine Mueller, Adam Resnick, Javad Nazarian, Joshua E. Allen, Yazmin Odia, Sharon L. Gardner, and Carl Koschmann. 2023. “Clinical Efficacy of ONC201 in H3K27M-Mutant Diffuse Midline Gliomas Is Driven by Disruption of Integrated Metabolic and Epigenetic Pathways.” *Cancer Discovery* 13(11):2370–93.
- Vinci, Mara, Anna Burford, Valeria Molinari, Ketty Kessler, Sergey Popov, Matthew Clarke, Kathryn R. Taylor, Helen N. Pemberton, Christopher J. Lord, Alice Gutteridge, Tim Forshe, Diana Carvalho, Lynley V Marshall, Elizabeth Y. Qin, Wendy J. Ingram, Andrew S. Moore, Ho-Keung Ng, Saoussen Trabelsi, Dorra H'mida-Ben Brahim, Natacha Entz-Werle, Stergios Zacharoulis, Sucheta Vaidya, Henry C. Mandeville, Leslie R. Bridges, Andrew J. Martin, Safa Al-Sarraj, Christopher Chandler, Mariona Sunol, Jaume Mora, Carmen de Torres, Ofelia Cruz, Angel M. Carcaboso, Michelle Monje, Alan Mackay, and Chris Jones. 2018. “Functional Diversity and Cooperativity between Subclonal Populations of Pediatric Glioblastoma and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Cells.” *Nature Medicine* 24(8):1204–15.
- Werbrouck, Coralie, Cláudia C. S. Evangelista, María-Jesús Lobón-Iglesias, Emilie Barret, Gwénaél Le Teuff, Jane Merlevede, Romain Brusini, Thomas Kergrohen, Michele Mondini, Stéphanie Bolle, Pascale Varlet, Kevin Beccaria, Nathalie Boddaert, Stéphanie Puget, Jacques Grill, Marie-Anne Debily, and David Castel. 2019. “TP53 Pathway Alterations Drive Radioresistance in Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas (DIPG).” *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 25(22):6788–6800.
- Whitehouse, Jacqueline P., Meegan Howlett, Aniello Federico, Marcel Kool, Raelene Endersby, and Nicholas G. Gottardo. 2021. “Defining the Molecular Features of Radiation-Induced Glioma: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *Neuro-Oncology Advances* 3(1):vdab109.
- Wilne, Sophie, Jacqueline Collier, Colin Kennedy, Karin Koller, Richard Grundy, and David Walker. 2007. “Presentation of Childhood CNS Tumours: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *The Lancet. Oncology* 8(8):685–95.
- Wisoff, Jeffrey H., Robert A. Sanford, Linda A. Heier, Richard Sposto, Peter C. Burger, Allan J. Yates, Emiko J. Holmes, and Larry E. Kun. 2011. “Primary Neurosurgery for Pediatric Low-Grade Gliomas: A Prospective Multi-Institutional Study from the Children’s Oncology Group.” *Neurosurgery* 68(6):1548—54; discussion 1554—5.



- Wright, Karen, Emily Krzykwa, Lianne Greenspan, Susan Chi, Kee Kiat Yeo, Michael Prados, Sabine Mueller, and Daphne Haas-Kogan. 2020. "CTNI-19. PHASE I TRIAL OF DAY101 IN PEDIATRIC PATIENTS WITH RADIOGRAPHICALLY RECURRENT OR PROGRESSIVE LOW-GRADE GLIOMA (LGG)." *Neuro-Oncology* 22(Supplement\_2):ii46–ii46.
- Wu, Gang, Alexander K. Diaz, Barbara S. Paugh, Sherri L. Rankin, Bensheng Ju, Yongjin Li, Xiaoyan Zhu, Chunxu Qu, Xiang Chen, Junyuan Zhang, John Easton, Michael Edmonson, Xiaotu Ma, Charles Lu, Panduka Nagahawatte, Erin Hedlund, Michael Rusch, Stanley Pounds, Tong Lin, Arzu Onar-Thomas, Robert Huether, Richard Kriwacki, Matthew Parker, Pankaj Gupta, Jared Becksfort, Lei Wei, Heather L. Mulder, Kristy Boggs, Bhavin Vadodaria, Donald Yergeau, Jake C. Russell, Kerri Ochoa, Robert S. Fulton, Lucinda L. Fulton, Chris Jones, Frederick A. Boop, Alberto Broniscer, Cynthia Wetmore, Amar Gajjar, Li Ding, Elaine R. Mardis, Richard K. Wilson, Michael R. Taylor, James R. Downing, David W. Ellison, Jinghui Zhang, Suzanne J. Baker, and the St. Jude Children's Research Hospital–Washington University Pediatric Cancer Genome Project. 2014. "The Genomic Landscape of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma and Pediatric Non-Brainstem High-Grade Glioma." *Nature Genetics* 46(5):444–50.
- Zhang, Jinghui, Gang Wu, Claudia P. Miller, Ruth G. Tatevossian, James D. Dalton, Bo Tang, Wilda Orisme, Chandanamali Punchihewa, Matthew Parker, Ibrahim Qaddoumi, Fredrick A. Boop, Charles Lu, Cyriac Kandath, Li Ding, Ryan Lee, Robert Huether, Xiang Chen, Erin Hedlund, Panduka Nagahawatte, Michael Rusch, Kristy Boggs, Jinjun Cheng, Jared Becksfort, Jing Ma, Guangchun Song, Yongjin Li, Lei Wei, Jianmin Wang, Sheila Shurtleff, John Easton, David Zhao, Robert S. Fulton, Lucinda L. Fulton, David J. Dooling, Bhavin Vadodaria, Heather L. Mulder, Chunlao Tang, Kerri Ochoa, Charles G. Mullighan, Amar Gajjar, Richard Kriwacki, Denise Sheer, Richard J. Gilbertson, Elaine R. Mardis, Richard K. Wilson, James R. Downing, Suzanne J. Baker, and David W. Ellison. 2013. "Whole-Genome Sequencing Identifies Genetic Alterations in Pediatric Low-Grade Gliomas." *Nature Genetics* 45(6):602–12.

## 10 Přílohy

### Příloha 1

Chen, C. C. L., Deshmukh, S., Jessa, S., Hadjadj, D., Lisi, V., Andrade, A. F., **Vanova, K.**... Jabado, N. (2020). Histone H3.3G34-Mutant Interneuron Progenitors Co-opt PDGFRA for Gliomagenesis. *Cell*, 183(6), 1617-1633.e22 [IF 41.58]

*Autorský podíl: Genetická a epigenetická testování – Sangerovo sekvenování, methylační array, identifikace patogenní mutace, zpracování příslušných klinických dat*

### Příloha 2

**Trkova K**, Sumerauer D, Krskova L, Vicha A, Koblizek M, Votava T, Priban V, Zapotocky M. DIPG-like MYB-altered diffuse astrocytoma with durable response to intensive chemotherapy. *Childs Nerv Syst.* 2023 Sep;39(9):2509-2513. doi: 10.1007/s00381-023-05976-3. Epub 2023 May 11. PMID: 37165121; PMCID: PMC10432314 [IF 1.39]

*Autorský podíl: Genetické a epigenetické testování – Sangerovo sekvenování, methylační array, NGS, analýza molekulárních a klinických dat, příprava publikace a revizí publikace.*

### Příloha 3

**Trkova K**, Sumerauer D, Bubenikova A, Krskova L, Vicha A, Koblizek M, Zamecnik J, Jurasek B, Kyncl M, Malinova B, Ondrova B, Jones DTW, Sill M, Strnadova M, Stolova L, Misove A, Benes V 3rd, Zapotocky M. Clinical and molecular study of radiation-induced gliomas. *Sci Rep.* 2024 Feb 7;14(1):3118. doi: 10.1038/s41598-024-53434-0. PMID: 38326438; PMCID: PMC10850080. [IF 4.6]

*Autorský podíl: Genetické a epigenetické testování – Sangerovo sekvenování, methylační array, analýza molekulárních a klinických dat, příprava publikace a revizí publikace.*

## 11 Další publikace autorky

### Publikace, které s tématem práce souvisí pouze okrajově nebo částečně

D.Sumerauer, L. Krskova, A. Vicha , A. Misove, Y. Mamatjan, P. Jencova, M. Vlckova, L. Slamova, **K. Vanova**, P. Liby, J. Taborsky , M. Koblizek , R. Klubal, M. Kyncl, G. Zadeh, J. Stary, J. Zamecnik, V. Ramaswamy , M. Zapotocky. Rare IDH1 Variants Are Common in Pediatric Hemispheric Diffuse Astrocytomas and Frequently Associated With Li-Fraumeni Syndrome. *Acta Neuropathol.* 2020;139(4):795-797. doi:10.1007/s00401-019-02118-5 **[IF 17.08]**

Misove A, Vicha A, Broz P, **Vanova K**, Sumerauer D, Stolova L, Sramkova L, Koblizek M, Zamecnik J, Kyncl M, Holubova Z, Liby P, Taborsky J, Benes V 3rd, Pernikova I, Jones DTW, Sill M, Stancokova T, Krskova L, Zapotocky M. Correction to: Integrated genomic analysis reveals actionable targets in pediatric spinal cord low-grade gliomas. *Acta Neuropathol Commun.* 2022 Nov 11;10(1):162. doi: 10.1186/s40478-022-01467-9. Erratum for: *Acta Neuropathol Commun.* 2022 Sep 26;10(1):143. PMID: 36369165; PMCID: PMC9652824. **[IF 6.48]**

Entenmann CJ, Bubeníková A, Blažková J Jr, Zápotocký M, Kruseová J, Sumerauer D, **Trková K**, Sochová V, Koblížek M, Kynčl M, Malinová B, Bradáč O, Beneš V 3rd. Evaluation of the growth rates and related prognostic factors in radiation-induced meningiomas. *J Neurooncol.* 2023 Jan;161(1):155-163. doi: 10.1007/s11060-022-04209-y. Epub 2022 Dec 24. PMID: 36565363. **[IF 3.9]**