



FUNDACIÓN H. A.
BARCELÓ
FACULTAD DE MEDICINA



TÍTULO:

DETECCIÓN INTEGRADA DE ALTERACIONES MOLECULARES EN TUMORES DE SISTEMA NERVIOSO CENTRAL PEDIÁTRICOS ORIENTADA A LOGRAR UN ABORDAJE MULTIDISCIPLINARIO PERSONALIZADO DEL PACIENTE.

DIRECTOR: PRECIADO, MARIA VICTORIA

CO DIRECTOR: BERTOT GUSTAVO MIGUEL

INVESTIGADORES COLABORADORES Y FILIACIÓN:

Lorenzetti Mario Alejandro, IMIPP CONICET-GCBA

Colli Sandra, División Patología, Hospital de Niños R. Gutiérrez, CABA

Elena De Matteo, División Patología, Hospital de Niños R. Gutiérrez e IMIPP CONICET-GCBA, CABA

García Lombardi Mercedes, Unidad de Oncología, Hospital de Niños R. Gutiérrez, CABA

Cardoso Nazarena, División Patología, Hospital de Niños R. Gutiérrez, CABA

SEDE-LUGAR: Las Heras

FECHA: 22 de marzo 2024

CONTACTO DEL DIRECTOR: mvpreciado67@gmail.com

Índice

I.	Resumen	4
II.	Palabras clave	4
III.	Resumen en inglés	5
IV.	Palabras clave en inglés	5
V.	Introducción	6
VI.	Metodología	7
VII.	Resultados	9
VIII.	Discusión y Conclusión	12
IX.	Agradecimientos	13
X.	Bibliografía	13

XI. Resumen

Introducción: Los tumores sólidos de sistema nervioso central (SNC) representan el 19% de los tumores pediátricos según el Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino (ROHA). A partir de la clasificación OMS 2016 de estos tumores contempla caracterización genómica, que incluye más de 100 entidades y subclases. En pediatría los tumores de estirpe glial son los más frecuentes (astrocitomas, ependimomas y oligodendroglioma).

Objetivo: estandarizar e implementar una estrategia molecular de detección de alteraciones moleculares en tumores de SNC pediátricos para diagnóstico, pronóstico y/o tratamiento.

Métodos: i) inmunohistoquímica con marcadores de linaje tumoral y con valor predictivo ii) FISH para traslocaciones y alteraciones cromosómicas estructurales desbalanceadas. iii) secuenciación Sanger de mutaciones puntuales y de inserciones/delecciones (InDels) y iv) correlación con los datos clínicos e histológicos

Resultados: se estudiaron 82 gliomas de bajo grado (GBG) y 20 de alto grado (GAG) pediátricos. La fusión KIAA1549-BRAF se detectó en 44/82 GBG, de ellos 43/44 astrocitomas pilocíticos. Localización: 27/44 cerebelo, 13/44 línea media, 3/44 hemisferios; χ^2 prueba; $p= 0,04$. KIAA1549-BRAF no se relacionó con la sobrevida libre de progresión (SLP) ni con la sobrevida global (SG). La mutación p.V600E BRAF se detectó en 10/82 GBG y 1/10 GAG. Localización GBG: hemisferios cerebrales 7/10 y 3/10 línea media (Prueba exacta Fisher; $p = 0,004$). Se asoció con menor SG ($p = 0,0082$); pero en astrocitomas pilocíticos se asoció con menor SG y SLP ($p < 0,0001$ y $p = 0,0135$, respectivamente). La mutación en H3 se detectó por IHQ en GAG 9/18. La secuenciación mostró en 8/9 la isoforma H3.3 y 1/9 isoforma H3.1 y 2/4 casos de GAG hemisféricos la mutación HG34. Los GAG mostraron peor SLP y SG, $p = 0,0124$ y $p = 0,006$, respectivamente.

Conclusión: se estableció un algoritmo diagnóstico molecular en tumores de SNC pediátricos

XII. Palabras clave

Tumores de sistema nervioso central; marcadores moleculares; tratamiento personalizado; pediatría

XIII. Resumen en inglés

Introduction: Solid central nervous system (CNS) tumors represent 19% of pediatric tumors according to the Argentine Hospital Pediatric Oncology Registry (ROHA). The 2016 WHO classification of these tumors includes genomic characterization, which encompasses over 100 entities and subclasses. In pediatrics, tumors of glial lineage are the most common (astrocytomas, ependymomas, and oligodendroglioma).

Objective: To standardize and implement a molecular strategy for detecting molecular alterations in pediatric CNS tumors for diagnosis, prognosis, and/or treatment.

Methods: i) Immunohistochemistry with markers of tumor lineage and predictive value ii) FISH for translocations and unbalanced structural chromosomal alterations. iii) Sanger sequencing of point mutations and insertions/deletions (InDels), and iv) correlation with clinical and histological data.

Results: 82 pediatric low-grade gliomas (LGG) and 20 high-grade gliomas (HGG) were enrolled. KIAA1549-BRAF fusion was detected in 44/82 LGG, of which 43/44 were pilocytic astrocytomas. Location: 27/44 cerebellum, 13/44 midline, 3/44 hemispheres; χ^2 test $P = 0.04$. KIAA1549-BRAF was not associated with progression-free survival (PFS) or overall survival (OS). The BRAF p.V600E mutation was detected in 10/82 LGG and 1/10 HGG. LGG location: cerebral hemispheres 7/10 and midline 3/10 (Fisher's exact test; $p = 0.004$). It was associated with lower OS ($p = 0.0082$); but in pilocytic astrocytomas, it was associated with lower OS and PFS ($p < 0.0001$ and $p = 0.0135$, respectively). H3 mutation was detected by IHQ in 9/18 HGG. Sequencing showed H3.3 isoform in 8/9 and H3.1 isoform in 1/9, and in 2/4 cases of hemispheric HGG, HG34 mutation. HGG showed worse PFS and OS, $p = 0.0124$ and $p = 0.006$, respectively.

Conclusion: A molecular diagnostic algorithm was established in pediatric CNS tumors.

XIV. Palabras clave en inglés.

Central nervous system tumors; molecular markers; tailor-made therapy; pediatrics

XV. Introducción:

Según Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino se diagnostican en nuestro país ~1320 nuevos casos de cáncer en menores de 15 años por año. Los tumores de sistema nervioso central (SNC) son los tumores sólidos más frecuentes en niños, de hecho se diagnostican aproximadamente 239 nuevos casos por año en niños menores de 15 años. La sobrevivida a tres años es de 46,3% para los tumores SNC, y junto con las leucemias mieloblásticas, son los dos grupos con mayor mortalidad temprana (1).

En pediatría, entre los tumores de SNC, los de estirpe glial (gliomas) son los más frecuentes y comprenden a los astrocitomas, ependimomas y oligodendroglioma. Los Gliomas de bajo grado pediátricos (GBGp), Grado I y II de la OMS incluyen: astrocitoma pilocítico, astrocitoma pilomixoide, xantoastrocitoma pleomórfico, astrocitoma difuso y ganglioglioma. El astrocitoma pilocítico (grado I de la OMS) representa el 85% de todos los GBGp (2). La evaluación molecular es fundamental en la etapa inicial del diagnóstico histopatológico de los GBGp. La proteína BRAF, mediador de la vía RAS-RAF-MEKERK, presenta la mutación V600E que es un blanco molecular terapéutico y se describe en casi 60% de los xantoastrocitoma pleomórfico, 50% de los gangliogliomas, 9% de los astrocitomas pilocíticos y 2-12% glioblastomas (3). La duplicación del gen BRAF, a partir de la fusión KIAA1549:BRAF, se describió en los astrocitomas pilocíticos y está casi siempre ausente en los demás tipos de tumores de SNC (4,5). Entre los gliomas de alto grado (OMS grado III y IV) una nueva entidad es el "Glioma difuso de línea media con mutación H3 K27M", definido por la mutación K27M en los genes que codifican para H3.3 (H3F3A) o H3.1 (HIST1H3B/C), fenotipo glial y ubicación en la línea media con un patrón de crecimiento difuso y grado IV (6).

En los últimos años se evidenció una evolución en el paradigma del tratamiento del cáncer en general que cambió su enfoque desde "tipo de tumor" a "alteración genética presente" para decidir el abordaje terapéutico, lo que llevó a un diseño innovador del tratamiento pensado acorde al perfil de biomarcadores del individuo (7). Por otra parte, tal cómo surge de la literatura y de la experiencia, en la actualidad se maneja el concepto del "diagnóstico integral" que combina los hallazgos histopatológicos con los datos moleculares y genómicos.

XVI. Metodología

Diseño

Estudio observacional, analítico, de cohorte con seguimiento prospectivo de los pacientes.

Población en estudio

Se estudiaron 102 niños con diagnóstico confirmado de glioma 82 de bajo grado (GBG) y 20 de alto grado (GAG) ingresados y en seguimiento en los servicios de oncología de los centros participantes: Hospital de Niños Dr. R. Gutiérrez, CABA, Hospital Materno Infantil San Roque Entre Ríos y Hospital del Niño San Justo, Pcia. Bs As

Criterios de inclusión: a) Sospecha o diagnóstico confirmado de tumor sólido. b) Menores de 18 años. c) A quien se le realice alguna intervención quirúrgica (Ej: biopsia, extirpación total o parcial) que nos permita tomar muestra del tejido tumoral (lesión primaria o metastásica)

Criterios de exclusión: a) No se tenga acceso a la muestra de tejido tumoral. b) No se obtenga el consentimiento/asentimiento firmado.

El estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética en Investigación (CEI) del HNRG (protocolo CEI 20.59). Todos los datos de secuencia referentes a aquellos genes que no estén vinculados a patologías estudiadas serán descartados según la recomendación del CEI. Finalmente se deja constancia de que se cumplirá con la ley de Habeas Data 25.326..

Muestras en estudio

De cada caso obtuvo biopsia fijada en formol-buffer en incluida en parafina y en aquellos casos en los que el tamaño de la biopsia lo permitió, se conservó además un fragmento a -70°C hasta su procesamiento. Para la obtención de datos clínicos y de laboratorio se utilizaron fuentes secundarias: historias clínicas de los pacientes ingresados y seguidos ambulatoriamente a los servicios de oncología de los centros participantes.

Caracterización histológica e Inmunotipificación por Inmunohistoquímica (IHQ)

Sobre los cortes de biopsias fijadas en formol e incluidas en parafina (BFFIP) se analizó por inmunohistoquímica la presencia de marcadores de linajes celulares complementados con marcadores de mayor especificidad tumoral y otros de valor predictivo, con anticuerpos (Ac) primarios. Se utilizó el equipo automatizado Ventana BenchMark GX System de Roche Diagnostics y se siguieron las instrucciones del fabricante.

En todos los casos como control positivo se utilizaron cortes de diferentes tejidos que marcaban positivo obtenidos del archivo del servicio de patología HNRG y como control negativo se reemplazó al anticuerpo primario por un anticuerpo de igual isotipo, pero contra otra proteína no relacionada.

FISH

En la implementación de FISH sobre BFFIP se realizó el estudio de translocación cromosómica BRAF-KIAA1549 con la estrategia de diseño de sonda de fusión. Brevemente, los cortes BFFIP se desparafinizaron e hidrataron, luego se realizó la recuperación antigénica con citrato de sodio pH 6.4 10mM y buffer 2XSSC, seguido de digestión enzimática con pepsina. Se preparó la sonda según las instrucciones del fabricante y se desnaturizó e incubó en hibridador por 16 hs. Se lavó con soluciones a base de 2XSSC, se coloreó con DAPI, se montó y visualizó al microscopio de fluorescencia. Se utilizaron casos controles para la puesta a punto y calibración de los ensayos.

Análisis de mutaciones puntuales

Se realizó el aislamiento de ADN a partir de: I) biopsia fresco El ADN total se extrajo con el High Pure PCR template preparation Kit (Roche) según las instrucciones del fabricante, el cual se guardó a -20°C para el posterior análisis. II) BFFIP se extrajo con el reactivo RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (Ambion™), específico para parafinas según instrucciones del fabricante.

Se realizó control de integridad del ADN extraído mediante la amplificación del gen de la b-globina con cebadores específicos.

A partir del ADN total se amplificó por PCR la región de interés del gen que contiene la mutación BRAF V600E, Histona 3.3 e Histona 3.1 Los productos de amplificación se corrieron en un gel de agarosa al 2% y se purificaron con QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol (Qiagen). Luego se secuenciaron de manera automatizada utilizando el reactivo comercial ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, USA) en un equipo Applied Biosystems 3500 según instrucciones del fabricante. Las secuencias obtenidas se procesaron utilizando el software BioEdit y bases de datos de referencia.

Análisis estadístico

Se utilizó la prueba exacta de Fisher o prueba χ^2 para evaluar la asociación entre variables categóricas y se consideró significativo valores de $p < 0,05$. Se analizó la sobrevida global y libre de eventos de los pacientes usando el análisis de sobrevida de Kaplan Meier, y la comparación de curvas con el test de log-rank.

XVII. Resultados

Se analizó mediante inmunohistoquímica (IHQ) una serie de 20 gliomas de alto grado (9 GIV difusos de la línea media, 4 GIV glioblastomas, 4 GIII astrocitoma anaplásico difuso y 1 GIII oligodendroglioma anaplásico, 1 GIII xantastrocitoma pleomórfico anaplásico y 1 GIII ganglioglioma anaplásico). La localización de estos casos fueron 9 en la línea media, 10 en los hemisferios cerebrales y 1 en el cerebelo. Los 9 casos de gliomas difusos de la línea media resultaron por IHQ positivos para la mutación cuando se detectaron con el anticuerpo anti-H3K27M y perdieron la señal positiva cuando fueron ensayados con el anticuerpo para detectar Histona Lys 27 trimetilada (H3K27me3). Las determinaciones de Histona se analizaron en conjunto y se observó congruencia de resultados entre la presencia de mutación H3K27M y la pérdida de expresión de H3K27me3. Los 11 casos restantes fueron negativos pro IHQ. Cuando se realizó el análisis por secuenciación sanger y se integró con el estudio por IHQ, de los 18 gliomas de alto grado con ADN de calidad, los 9 gliomas de alto grado de la línea media fueron positivos para la mutación H3K27M (8 en las isoformas H3.3 y 1 en H3.1), 2 glioblastomas tuvieron la mutación H3G34R y los restantes 2 glioblastomas, 4 astrocitomas difusos y 1 oligodendroglioma anaplásico resultaron de wild type para los genes de histonas. Cabe señalar que los dos casos con mutación H3G34R tuvieron localización en hemisferios. El análisis de Kaplan-Meier en los gliomas de alto grado demostró que la mutación H3K27M se asoció con una disminución de la SLP (prueba de rango logarítmico (Mantel-Cox), $P = 0,0124$) y de la SG (prueba de rango logarítmico (Mantel-Cox), $P = 0,006$). Finalmente, se investigó la presencia de mutación en Histona 3 mediante IHQ en una serie de 24 gliomas de bajo grado de localización anatómica línea media (3 GII astrocitoma difuso, 1 ganglioglioma y 20 astrocitoma pilocítico). Ninguno de los gliomas de bajo grado analizados presentó mutación para histona 3 determinada con los dos anticuerpos anti-H3K27M y anti-H3K27me3; lo cual refuerza su clasificación como glioma de bajo grado. La determinación de histona mutada en los gliomas de la línea media caracteriza una entidad particular definida

por la OMS como “Glioma difuso de la línea media H3 K27M mutado” que presenta una menor respuesta al tratamiento y una menor supervivencia global.

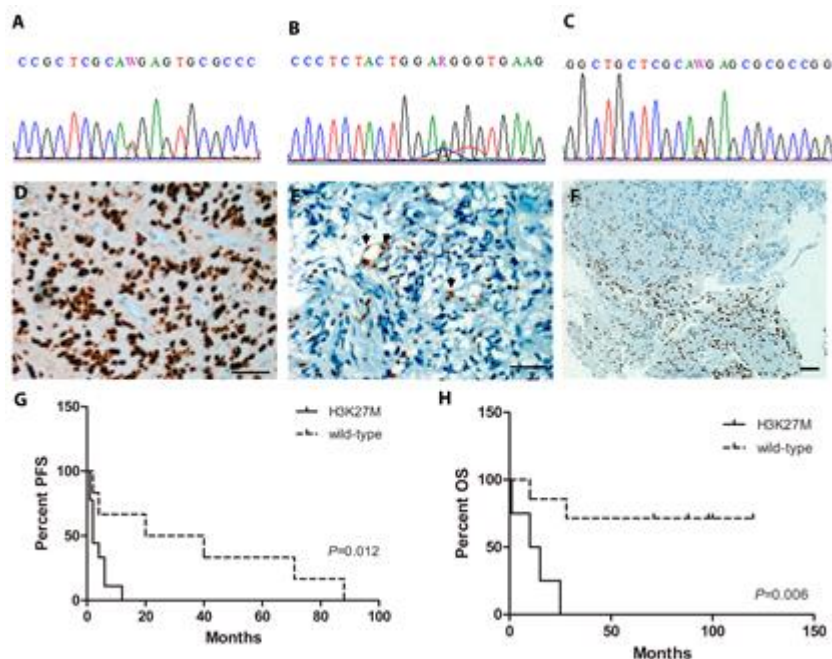


Figura 1: Análisis mutacional del gen de Histona 3. **A)** Cromatograma representativo de una secuenciación Sanger donde se observa un pico doble en c.83A>T (p.K27M), indicativo de la mutación H3K27M en heterocigosis en la isoforma H3.3. **B)** Cromatograma representativo de una secuenciación Sanger donde se observa un pico doble en c.103A>G (p.G34R), indicativo de la mutación H3G34R en heterocigosis en la isoforma H3.3. **C)** Cromatograma representativo de una secuenciación Sanger donde se observa un pico doble A>T (p.K27M), indicativo de la mutación H3K27M en heterocigosis en la isoforma H3.1. **D)** Inmunohistoquímica representativa para H3K27M en un caso de Linfoma difuso de la línea media H3K27M mutante. **E)** Inmunohistoquímica representativa para H3K27me3 en un GDLM H3K27M demuestra la completa pérdida de expresión de la histona trimetilada en las células tumorales, mientras que la señal positiva es retenida en las células endoteliales (flecha). La escala representa 50 μ m a 400x. **F)** Inmunohistoquímica representativa para H3K27me3 en un caso con mutación en la isoforma 3.1 y que demostró un patrón heterogéneo de pérdida de la marcación. La escala representa 50 μ m a 200x. **G)** Análisis de Kaplan-Meier de supervivencia libre de progresión en GAG. **H)** Análisis de Kaplan-Meier de supervivencia global en GAG.

Se analizó la fusión KIA-BRAF por FISH y la mutación BRAF V600E por IHQ en los gliomas de bajo grado. Se estudiaron 82 casos: 64 astrocitomas pilocíticos; 9 gangliogliomas, 4 Xantoastrocitomas pleomórficos y 5 astrocitomas difusos. La fusión del gen KIAA1549-BRAF se detectó en 44/82 gliomas de bajo grado y en particular fue relevante como herramienta diagnóstica para los astrocitomas pilocíticos, donde resultó positiva en 43/44 casos. Los gliomas de bajo grado positivos se localizaron 27/44 (61,3%) en el cerebelo, 13/44 (29,5%) en la línea media y los 4/44 restantes (9,2%) en los hemisferios cerebrales. En

particular, en los astrocitomas pilocíticos y astrocitomas difusos, hubo una asociación entre la fusión y su ubicación anatómica en el cerebelo (prueba de Chi cuadrado; $P = 0,04$). El análisis de sobrevida por Kaplan-Meier demostró que la fusión KIAA1549-BRAF no se asoció con sobrevida libre de progresión (SLP) ni con sobrevida global (SG)

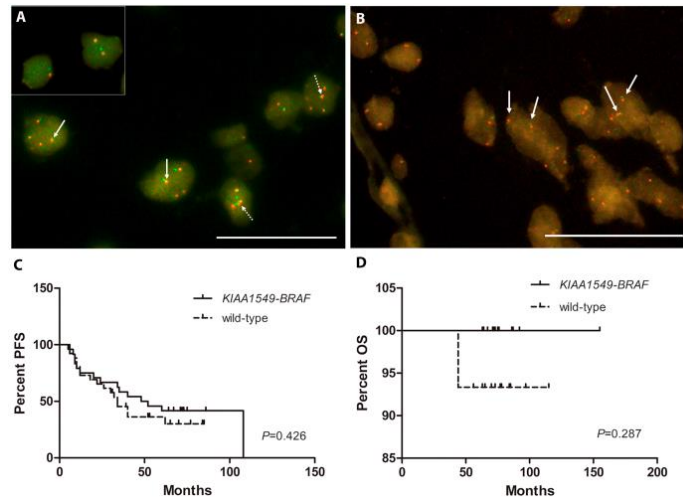


Figura 2: Análisis de la fusión KIAA1549-BRAF. A) Caso representativo de Astrocitoma pilocítico mostrando una fusión positiva en un núcleo interfásico por FISH. Sonda para BRAF en rojo, sonda para KIAA1549 en verde y sondas solapadas en amarillo (flechas continuas). La duplicación del gen BRAF es marcada por la flecha punteada. B) Imagen representativa de un caso con fusión negativa, donde las flechas indican la señal roja y verde, en cercanía, pero no superpuestas. La escala representa 50 μm a 1000x. C) Análisis de Kaplan-Meier para la sobrevida libre de progresión y D) para la sobrevida global en GBG

Por su parte la mutación BRAFV600E se detectó en 10/82 gliomas de bajo grado y en cuanto a la localización anatómica del tumor en estos, se observó en los hemisferios cerebrales en 7/10 y en línea media 3/10, mientras que no se presentaron casos mutados en el cerebelo, (prueba exacta de Fisher; $P = 0,0041$). Con respecto al resultado de supervivencia en gliomas de bajo grado, el análisis de Kaplan-Meier demostró que la mutación BRAF V600E se asoció con una SG más corta (prueba de rango logarítmico (Mantel-Cox), $P = 0,0082$), pero no con una SLP (Log-rank (Mantel-Cox) Test, $P = 0,14$). Cuando solo se consideraron los astrocitomas pilocíticos, la mutación BRAF V600E se asoció con una disminución de la SG (prueba de rango logarítmico (Mantel-Cox), $P < 0,0001$) y de la SLP (prueba de rango logarítmico (Mantel-Cox), $P = 0,0135$). Entre los gliomas de alto grado, solo 1 glioblastoma ubicado en el hemisferio cerebral fue positivo para la mutación BRAF V600E.

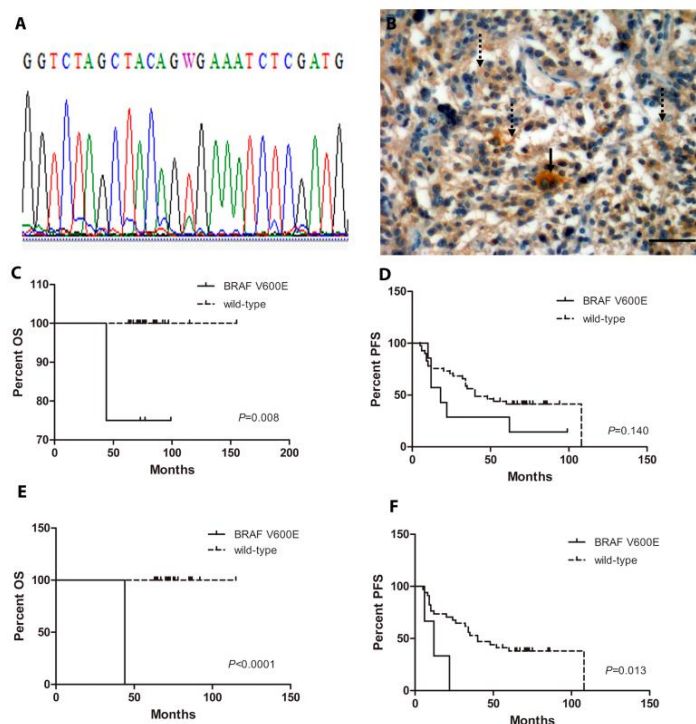


Figura 3: Análisis mutacional de BRAF V600E. A) Cromatograma representativo de una secuenciación Sanger donde se observa un pico doble en c.1799A>T (p.V600E), indicativo de la mutación BRAF V600E en heterocigosis. B) Detección por inmunohistoquímica para BRAF V600E en un Ganglioglioma donde se observa señal positiva en el proceso glial (flecha punteada) y en la célula ganglionar tumoral (flecha continua). La escala representa 50 μ m a 400x. C) Análisis de Kaplan-Meier de supervida global en LGB. D) Análisis de Kaplan-Meier de supervida libre de progresión en LGB. E) Análisis de Kaplan-Meier de supervida global en Astrocitoma pilocítico. F) Análisis de Kaplan-Meier de supervida libre de progresión en Astrocitoma pilocítico

XVIII. Discusión y conclusión

En este trabajo observamos una congruencia absoluta entre la secuenciación de Sanger y los resultados de la IHQ en todos los casos estudiados para H3K27M. Una concordancia similar fue reportada por Huang et al. al evaluar comparativamente mediante secuenciación algunos casos de su serie de estudio (8). Además, la congruencia en los resultados también se observó al evaluar la pérdida del estado de trimetilación de la Lys27 (H3K27me3) en la isoforma H3.3 y H3.1 mediante IHQ. Esto resulta ventajoso dado que abre diferentes posibilidades de estudio de un caso según las herramientas disponibles en el laboratorio.

Aunque se han descrito muchas otras fusiones génicas como eventos *driver* críticos en GBG pediátricos, la fusión KIAA1549-BRAF es el marcador molecular clave que se ha,

detectado con mayor frecuencia y que contribuye al diagnóstico del astrocitoma pilocítico (9). De manera similar a lo observado en otros estudios, independientemente de la clasificación histológica del tumor, demostramos una asociación significativa entre la fusión génica KIAA1549-BRAF y su ubicación anatómica en el cerebelo para GBG (10).

En referencia a la mutación BRAF V600E ha demostrado ser un marcador molecular útil para estimar la evolución y el pronóstico. En este sentido, un estudio reciente describió la regresión de los tumores con mutación BRAF en respuesta al inhibidor de BRAF dabrafenib (11). En particular, la evaluación de marcadores moleculares farmacológicos es particularmente importante en aquellos casos donde la resección completa o la terapia de radiación adicional no son posibles.

Asimismo, es importante destacar que estos hallazgos amplían el conocimiento sobre las alteraciones de BRAF e Histona 3 en niños con tumores del sistema nervioso central en regiones geográficas, generalmente sub-estudiadas, distintas a Estados Unidos y Europa. Finalmente, cabe señalar que este nuevo enfoque de clasificación molecular tiene como objetivo reflejar el inmunofenotipo biológico del tumor en lugar de su morfología, con el objetivo final de lograr un marco de trabajo adaptado al riesgo y terapias dirigidas molecularmente que complementen o, en algunos casos, reemplacen la terapia convencional. Especialmente en países en desarrollo donde el acceso a la secuenciación de alto rendimiento aún es limitado, la evaluación de estos biomarcadores mediante técnicas de biología molecular convencionales es de suma importancia, para contribuir al manejo de los niños con tumores del SNC.

XIX. Agradecimientos

Este proyecto contó con el financiamiento parcial del Instituto Nacional del Cáncer, programa Asistencia Financiera a Proyectos de Investigación en Cáncer de Origen Nacional VI, Res 83/2020.

XX. Bibliografía

1. Registro oncopediátrico hospitalario argentino / F Moreno; M A Chaplin. - 6a ed. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires : Instituto Nacional del Cáncer, 2018

2. Baker SJ, Ellison DW, Gutmann DH. Pediatric gliomas as neurodevelopmental disorders. *Glia*, 2016, 64(6):879–895.
3. Kieran MW. Targeting BRAF in pediatric brain tumors. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2014; 34: e436–e440.
4. Collins VP, Jones DT, Giannini C. Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol.* 2015;129(6):775–88.
5. Sommerkamp AC, Uhrig S, Stichel D, St-Onge P, Sun P, Jäger N, von Deimling A, Sahm F, Pfister SM, Korshunov A, Sinnott D, Jabado N, Wefers AK, Jones DTW. An optimized workflow to improve reliability of detection of KIAA1549:BRAF fusions from RNA sequencing data. *Acta Neuropathol.* 2020;140(2):237-239.
6. Louis DN, Giannini C, Capper D, Paulus W, Figarella-Branger D, Lopes MB, et al. cIMPACT-NOW update 2: diagnostic clarifications for diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant and diffuse astrocytoma/anaplastic astrocytoma. IDH-mutant. *Acta Neuropathol.* 2018;135(4):639–42.
7. Yan L, Zhang W Precision medicine becomes reality-tumor type-agnostic therapy *Cancer Commun (Lond)* . 2018 Mar 31;38 (1):6.
8. Huang, T. et al. Detection of histone H3 K27M mutation and post-translational modifications in pediatric diffuse midline glioma via tissue immunohistochemistry informs diagnosis and clinical outcomes. *Oncotarget* 2018; 9, 37112-37124.
9. Kurani, H. et al. Pilocytic astrocytomas: BRAFV600E and BRAF fusion expression patterns in pediatric and adult age groups. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery* 2019, 35, 1525-1536,.
10. Horbinski, C., Hamilton, R. L., Nikiforov, Y. & Pollack, I. F. Association of molecular alterations, including BRAF, with biology and outcome in pilocytic astrocytomas. *Acta neuropathologica* 2010; 119, 641-649,.
11. Schindler, G. et al. Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta neuropathologica* 2011; 21, 397-405,