

# **UNIVERSITÄTKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie

Univ. Prof. Dr. med. Jens Gempt

**Erkenntnisse einer multizentrischen Studie zu erwachsenen H3 K27M-  
mutierten Gliomen:**

**Begrenzter Einfluss der chirurgischen Resektion auf das Gesamtüberleben,  
ATRX als molekularer prognostischer Marker**

## **Dissertation**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

An der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Vorgelegt von:

Alice Senta Ryba

Hamburg 2024

**(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)**

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 30.01.2025**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:** Prof. Dr. Ulrich Schüller

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:** PD Dr. Malte Mohme

# Inhaltsverzeichnis

|                                               |           |
|-----------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Einleitung .....</b>                    | <b>4</b>  |
| <b>2. Methoden.....</b>                       | <b>6</b>  |
| 1. Studienkohorte .....                       | 6         |
| 2. Patientenmerkmale.....                     | 6         |
| 3. Chirurgische Parameter .....               | 7         |
| 4. Radiographische Analyse .....              | 8         |
| 5. Neuropathologische Analyse .....           | 8         |
| 6. Statistische Analyse.....                  | 8         |
| <b>3. Ergebnisse .....</b>                    | <b>9</b>  |
| <b>4. Diskussion.....</b>                     | <b>25</b> |
| <b>5. Zusammenfassung .....</b>               | <b>32</b> |
| <b>6. Summary .....</b>                       | <b>33</b> |
| <b>7. Abkürzungsverzeichnis.....</b>          | <b>34</b> |
| <b>8. Literaturverzeichnis.....</b>           | <b>35</b> |
| <b>9. Originalarbeit .....</b>                | <b>45</b> |
| <b>10. Erklärung des Eigenanteils.....</b>    | <b>60</b> |
| <b>11. Danksagung .....</b>                   | <b>61</b> |
| <b>12. Curriculum vitae .....</b>             | <b>62</b> |
| <b>13. Eidesstattliche Versicherung .....</b> | <b>63</b> |

## 1. Einleitung

Gliome mit einer H3 K27M-Mutation zählen zu den malignen, primären Hirntumoren und wurden erst kürzlich als eigene Tumorsubgruppe klassifiziert, die sich durch ihre einzigartige molekulare Signatur von den ZNS-WHO<sup>4</sup> Glioblastomen unterscheidet. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) nahm in ihrer offiziellen Klassifikation von 2016 aufgrund dessen diese Gliome als separate Tumorentität auf. Sie zeichnen sich durch zwei Hauptmerkmale auf: 1) eine infiltrierende Läsion, die vorwiegend in den Strukturen der Mittellinien des Gehirns auftritt, und 2) das Vorhandensein einer H3 K27M-Mutation (Louis et al., 2016)

In 70 % der Fälle mit einer "H3 K27M-veränderten" Mutation tritt diese in dem H3F3A-Gen oder, weniger häufig in den HIST1H3B/C2-Genen (Buczkwicz et al., 2014; Taylor et al., 2014; Castel et al., 2018). Diese somatische heterozygote Mutation führt zu einer Substitution von Lysin zu Methionin (K>M), die einen globalen Verlust der H3 K27-Trimethylierung und eine Zunahme der H3-K27-Acetylierung zur Folge hat (Bender et al., 2013). In gesunden Zellen wird das Lysin auf Histon H3 hauptsächlich durch den Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) di- oder trimethyliert, sowie insbesondere durch seine enzymatische, katalytische Untereinheit enhancer of zeste 1/2 (EZH1 and 2) und seinen weiteren Untereinheiten, dem embryonic ectoderm transcription (EED), suppressor of zeste 12 (SUZ12), retinoblastoma-binding protein p48 (Margueron and Reinberg, 2011). *In vitro* Studien deuten darauf hin, dass H3 K27M-mutierte Proteine mit EZH2 interagieren und den PRC2-Komplex hemmen können, obwohl der genaue Pathomechanismus bisher noch ungeklärt bleibt (Lewis et al., 2013; Jiao and Liu, 2015; Harutyunyan et al., 2019). Der Verlust der H3K27-Trimethylierung führt letztendlich zu einer erhöhten Chromatinzugänglichkeit und Transkription, was eine Hochregulierung verschiedener Proto-Onkogene und Unterdrückung zellulärer Differenzierung zur Folge hat (Khuong-Quang et al., 2012; Gessi et al., 2015).

Seit der Aktualisierung der WHO-Klassifikation von 2021 wurde der Begriff H3 K27M-mutierte Tumoren zu „H3 K27M-altered Tumoren“ erweitert. Innerhalb dieser Kategorie weisen bis zu 15% der Fälle von diffusen Mittelliniengliomen (DMG) einen H3F3A-Wildtyp auf. Diese Fälle zeichnen sich jedoch durch eine Überexpression des enhancer of zeste homologs inhibitory protein (EZH1P) aus, was zu einem Verlust der H3 K27M-Trimethylierung führt und somit gleiche biologische Auswirkungen und

Tumoreigenschaften aufweist (Antin et al., 2020; Jain et al., 2020; Findlay et al., 2022).

H3 K27M-mutierte Gliome treten vorwiegend bei Kindern und jungen Erwachsenen auf und stellen hier fast 20% aller kindlichen Hirntumoren dar. Diese Tumore sind durchweg mit einer schlechten Prognose behaftet und erreichen ein medianes Gesamtüberleben von nur 10-14 Monaten (Mackay et al., 2017; Schreck et al., 2019). Da diese Tumoren typischerweise in Mittellinienstrukturen mit einem diffusen, infiltrativen Wachstumsmuster vorkommen, ist eine totale Resektion in der Regel nicht zu erreichen. Frühere Studien deuten darauf hin, dass diffuse Mittelliniengliome aus Oligodendrozyten-Vorläuferzellen, auch bekannt als oligodendrocyte precursor cells (OPCs), entstehen, die ebenfalls während des postnatalen Wachstums der Pons im mittleren Kindesalter am häufigsten vorhanden sind (Monje et al., 2011; Tate et al., 2015). Des Weiteren weisen H3 K27M-mutierte Gliome ein spezifisches Transkriptionsprofil auf, das dem der neuronalen Entwicklung im mittleren Kindesalter ähnelt. Dieses Profil zeichnet sich besonders dadurch aus, dass es die Zelldifferenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OPCs) zu reifen, post-mitotischen Oligodendrozyten (OLs) stoppt (Monje et al., 2011).

In der adjuvanten Therapie spielt besonders die Strahlentherapie eine wesentliche Rolle nach der operativen Behandlung, wobei eine empfohlene Dosis von 54 bis 60 Gy über einen Zeitraum von sechs Wochen in 30 Fraktionen verabreicht wird (Gallitto Ba et al., 2019). Häufig wird sie in Kombination mit einem Chemotherapeutikum eingesetzt. Bislang haben jedoch auch Kombinationen von Radio- und verschiedenen Chemotherapien nicht zu besseren Ergebnissen geführt.

Durch die Zunahme der molekularpathologischen Diagnostik in der täglichen Routine und die Integration der H3 K27M-Färbung hat sich gezeigt, dass diese Tumorentität auch bei Erwachsenen auftreten kann. Nach vielen großen Studien, die sich ausschließlich auf pädiatrische Fälle dieser Tumorentität konzentrierten, bleibt das klinische Verhalten bei Erwachsenen jedoch unklar, insbesondere im Vergleich zu ihrem pädiatrischen Gegenspieler und anderen H3-Wildtyp-Gliomen. Bislang wurden erwachsene H3 K27M-mutierte Gliome genauso aggressiv behandelt wie pädiatrische Gliome, nämlich durch eine ausgedehnte Resektion, gefolgt von einer kombinierten Radio-Chemotherapie.

Ziel der vorliegenden Studie war es, prognostische Faktoren und potenzielle klinische Untergruppen aller H3 K27M-mutierten zerebralen Gliome bei Erwachsenen zu identifizieren.

## **2. Methoden**

### **1. Studienkohorte**

Wir haben retrospektiv alle erwachsenen intrakraniellen Gliome mit einer H3 K27M-Mutation (n=70) untersucht, die zwischen 2016 und 2022 an insgesamt acht verschiedenen neurochirurgischen Zentren in Deutschland und Österreich histologisch und molekularpathologisch gesichert wurden. Die Patienten und Patientinnen wurden mittels Immunhistochemie mit monoklonalen Anti-Histon H3 (K27M-Mutation)-Antikörpern (monoklonaler Kaninchenklon RM192, RevMAB Biosciences, San Francisco) unabhängig von seiner Beteiligung der Mittellinie anhand der Positivität der H3 K27M-Antikörperfärbung identifiziert. Das Mindestalter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose wurde auf über 18 Jahre begrenzt. Zusätzlich wurden alle verfügbaren pädiatrischen Patient:innen (unter 18 Jahren) (n=17) als repräsentative Vergleichsgruppe zu unserer Erwachsenenkohorte eingeschlossen (siehe Tabelle 1). Die Studie wurde von der Medizinischen Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt (2023-300382-WF) und in Übereinstimmung mit der Hamburger Krankenhausordnung sowie der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Von allen Patient:innen wurde eine Einverständniserklärung eingeholt.

### **2. Patientenmerkmale**

Die demografischen Daten und Merkmale der Patient:innen wurden retrospektiv aus den Krankenhausakten extrahiert. Die analysierten klinischen Merkmale wurden in präoperative und postoperative Parameter unterteilt. Für die präoperativen Merkmale wurden der Karnofsky Performance Score (KPS), das Alter, das Geschlecht sowie das Auftreten verschiedener klinischer Symptome wie Übelkeit/Erbrechen, Kopfschmerzen, Hemiparese und epileptische Krampfanfälle analysiert. Zusätzlich zu den präoperativen Merkmalen wurden für die

postoperativen Merkmale ebenfalls der KPS, die Dauer des Aufenthalts auf der Intensivstation und das Auftreten klinisch-neurologischer Defizite analysiert. Darüber hinaus haben wir die verwendeten adjuvanten Therapien berücksichtigt, welche entweder in eine kombinierte Radio-Chemotherapie oder jeweils eine alleinige Strahlentherapie oder Chemotherapie mit Temozolomid unterteilt wurden. Die Nachbeobachtungszeit betrug im Mittelwert 9,8 Monate (Bereich: 0-63,8). Insgesamt fünfzehn (21,4%) Patient:innen konnten nach der Operation nicht weiterverfolgt werden. Darüber hinaus waren neun Patient:innen (12,8%) zum Zeitpunkt der Auswertung noch am Leben, und ihre mittlere Nachbeobachtungszeit betrug 23,1 Monate (Bereich: 7-40).

### 3. Chirurgische Parameter

Als chirurgische Parameter wurden folgende Merkmale erhoben und analysiert: das Resektionsausmaß, die Wahl des jeweiligen chirurgische Zugangswegs einschließlich der OP-Positionierung, das histopathologische Ergebnis des intraoperativen Schnellschnitts sowie die Anwendung intraoperativer Hilfsmittel, einschließlich Neuronavigation, intraoperatives Neuromonitoring (IONM) und die Verwendung von Fluoreszenz. Die OP-Positionierung konnte unterteilt werden in Bauch-, Rücken- oder Seitenlage. Die chirurgischen Zugänge wurden in fünf Gruppen unterteilt: (1) subokzipital, (2) retrosigmoidal, (3) paramedian, (4) Konvexität und (5) Biopsie, einschließlich rahmengestützter stereotaktischer und neuronavigationsgesteuerter Nadelbiopsien. Der Umfang der Resektion wurde anhand der postoperativen Bildgebung beurteilt, um das Volumen des verbleibenden Tumors zu messen, und dann in vollständige Resektion (<5% Rest), Teilresektion (>5% Rest) und Biopsie unterteilt. Die Ergebnisse der intraoperativen Kryoschnitte wurden in hochgradige Gliome (HGG), niedrig-gradige Gliome (LGG) und keinen Tumor eingeteilt. Das intraoperative Neuromonitoring (IONM) wurde in kortikales Mapping, motorisch evozierte Potenziale (MEP) und somatosensorisch evozierte Potenziale (SEP) unterteilt. Als Fluoreszenzmittel wurde 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) verwendet.

#### 4. Radiografische Analyse

Mittels Magnetresonanztomographie (MRT) wurden verschiedene Parameter des Tumors analysiert, darunter die Lage, das Volumen, die Verschiebung der Mittellinie, die Ausdehnung des Ödems, die ventrikuläre Infiltration sowie das Vorhandensein einer Kontrastmittelanreicherungen. Die Tumorlokalisation wurde in fünf Hauptgruppen unterteilt: (1) Telenzephalon (einschließlich Frontal-, Parietal-, Temporal- und Okzipitallappen), (2) Diencephalon (Thalamus, Basalganglien), (3) Mesencephalon, (4) Metencephalon (Pons und Kleinhirn) und (5) Myelencephalon. Ein einheitliches Studienprotokoll wurde entwickelt, das klare Definitionen für die volumetrischen Messungen enthielt. So wurde das Tumolvolumen anhand der Näherungsformel ( $a \times b \times c/2$ ) berechnet, wobei a, b und c die Länge, Breite und Höhe des Tumors repräsentieren. Das Ausmaß des peritumoralen Ödems wurde anhand von T2-gewichteten MRT-Sequenzen quantifiziert, von der Tumorausdehnung subtrahiert und anschließend mit der oben genannten Formel berechnet. Das verbleibende Tumolvolumen wurde anhand von MRT-Aufnahmen, die innerhalb von 72 Stunden nach der Resektion durchgeführt wurden, ermittelt, indem T1-gewichtete Bilder mit und ohne Kontrastmittelaufnahme verglichen wurden.

#### 5. Neuropathologische Analyse

In die aktuelle Studie wurden ausschließlich Patient:innen mit nachgewiesener H3 K27M-Mutation und Isocitratdehydrogenase (IDH)-Wildtyp-Status in der Immunhistochemie aufgenommen. Darüber hinaus wurden die folgenden histopathologischen und molekularen Tumormerkmale analysiert: O6-Methylguanin-Methyltransferase (MGMT)-Status, Alpha-Thalassämie/mental retardation syndrome X-linked (ATRX)-Status und DNA-Methylierungsanalyse (450k oder 850k) mit ihrer molekularen Subklasse und Klassifizierungsscore, sofern verfügbar.

#### 6. Statistische Analyse

Um prognostische Faktoren zu ermitteln, wurden univariate und multivariate Analysen durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgte mithilfe der Software



GraphPad Prism 9. Für die Analyse kontinuierlicher, skaliertter Daten wurde ein ungepaarter zweiseitiger Student's t-Test angewendet, während der Vergleich zwischen zwei Gruppen mit dem zweiseitigen exakten Fisher-Test durchgeführt wurde. Die multivariate Analyse der signifikanten Faktoren wurde mittels multivariater Cox-Proportional-Hazards-Modelle und Signifikanztests ( $\alpha = 0,05$ ) durchgeführt. Das Gesamtüberleben wurde unter Verwendung der Kaplan-Meier-Methode analysiert. Der Log-Rank-Test wurde für die univariate Auswertung der Kaplan-Meier-Diagramme verwendet. Das progressionsfreie Überleben (PFS) wurde ab dem Zeitpunkt der ersten Intervention berechnet. P-Werte wurden als signifikant betrachtet, wenn sie  $<0,05$  waren.

### 3. Ergebnisse

In der vorliegenden Studie untersuchten wir insgesamt 70 erwachsene Patient:innen mit einem H3 K27M-mutierten Gliom, die zwischen dem Februar 2016 und dem Oktober 2022 operiert wurden und haben deren Merkmale in Tabelle 1 zusammengefasst. Die klinische Präsentation umfasste Übelkeit und Erbrechen (30%, n=21), Kopfschmerzen (43,5%, n=30), Hemiparese (30%, n=21), epileptische Krampfanfälle (4,3%, n=3) und Hirnnervenlähmungen (37,2%, n=26) (siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1**

|                                 |              |
|---------------------------------|--------------|
| <u>Klinische Parameter</u>      | -            |
| <b>Präoperativ</b>              |              |
| Alter [Jahre]- Median (Bereich) | 33 (18 - 64) |
| Geschlecht - n (%)              |              |
| Weiblich                        | 29 (41.4)    |
| Männlich                        | 41 (58.6)    |
| Übelkeit/Erbrechen - n (%)      | 21 (30)      |
| Kopfschmerzen - n (%)           | 30 (43.5)    |
| Hemiparese - n (%)              | 21 (30)      |
| Epilepsie - n (%)               | 3 (4.3)      |
| Hirnnervenlähmung - n (%)       | 26 (37.2)    |

|                                             |                   |
|---------------------------------------------|-------------------|
| Präoperative KPS - MW (SD)                  | 80.43 $\pm$ 19.59 |
| <b>Postoperativ</b>                         |                   |
| Neurologische Defizite - n (%)              | 26 (37.1)         |
| Neue Defizite - n (%)                       | 8 (11.4)          |
| Hemiparese - n (%)                          | 23 (32.9)         |
| ITS-Aufenthalt [t] - MW (SD)                | 4.367 $\pm$ 8.622 |
| Postoperativer KPS - Median (SD)            | 79.09 $\pm$ 22.22 |
| <b>Follow-up</b>                            |                   |
| Follow-up [M.] - Median (range)             | 9.8 (0 - 63.8)    |
| Rezidiv - n (%)                             | 53 (75.7)         |
| Progressions-freies Überleben - Median (SD) | 7.557 $\pm$ 8.004 |
| Tod - n (%)                                 | 44 (62.8)         |
| Gesamtüberleben - Median (SD)               | 13.62 $\pm$ 14.23 |
| <u>Radiografische Parameter</u>             | -                 |
| <b>Lokalisation- n (%)</b>                  |                   |
| Telenzephalon                               | 4 (5.7)           |
| Frontallappen                               | 3 (4.3)           |
| Parietallappen                              | 1 (1.4)           |
| Temporallappen                              | 0 (0)             |
| Dienzephalon                                | 38 (54.3)         |
| Thalamus                                    | 36 (51.4)         |
| Basalganglien                               | 2 (2.9)           |
| Mesenzephalon                               | 10 (14.3)         |
| Metenzephalon                               | 12 (17.1)         |
| Pons                                        | 8 (11.4)          |
| Zerebellum                                  | 4 (5.7)           |
| Myelenzephalon                              | 6 (8.6)           |
| <b>Kontrastmittelaufnahme - n (%)</b>       |                   |
| Ja                                          | 54 (77.2)         |
| Nein                                        | 11 (15.7)         |
| Unbekannt                                   | 5 (7.1)           |
| <b>Seite - n (%)</b>                        |                   |
| Links                                       | 34 (48.6)         |
| Rechts                                      | 21 (30)           |
| Beides                                      | 10 (7.1)          |
| Mittellinienbeteiligung - n (%)             | 59 (84.3)         |
| Zystisch - n (%)                            | 16 (22.8)         |
| Ventrikuläre Beteiligung - n (%)            | 25 (42.4)         |
| Hydrozephalus - n (%)                       | 31 (44.3)         |

|                                        |             |
|----------------------------------------|-------------|
| Mittellinienverlagerung [cm] – MW (SD) | 0.35 ± 0.46 |
| Ödem [cm³] - MW (SD)                   | 10.4 ± 13.7 |
| Volumen [cm³] - MW (SD)                | 12.2 ± 13.1 |
| Restvolumen [cm³] - MW (SD)            | 6.4 ± 6.4   |
| <u>Chirurgische Parameter</u>          |             |
| <b>OP-Positionierung - n (%)</b>       |             |
| Rücken                                 | 41 (58.6)   |
| Bauch                                  | 18 (25.7)   |
| Seite                                  | 3 (4.3)     |
| <b>Operatives Prozedere - n (%)</b>    |             |
| Biopsie                                | 38 (55.7)   |
| Resektion                              | 26 (37.1)   |
| Beides                                 | 5 (7.1)     |
| <b>Operativer Zugang- n (%)</b>        |             |
| Subokzipital                           | 11 (15.7)   |
| Retrosigmoidal                         | 3 (4.3)     |
| Paramedian                             | 6 (8.6)     |
| Konvexität                             | 35 (50)     |
| Stereotaxie/Varioguide                 | 14 (20)     |
| <b>Resektionsausmaß - n (%)</b>        |             |
| Vollständige Resektion                 | 10 (14.3)   |
| Teilresektion                          | 21 (30)     |
| Biopsie                                | 38 (54.3)   |
| <b>IONM - n (%)</b>                    |             |
| Gesamt                                 | 24 (34.3)   |
| Kortikales Mapping                     | 7 (10)      |
| MEP                                    | 23 (32.8)   |
| SEP                                    | 18 (25.7)   |
| Navigation - n (%)                     | 44 (62.8)   |
| Fluoreszenz - n (%)                    | 15 (21.4)   |
| Wachoperation - n (%)                  | 0 (0)       |
| <u>Histologische Parameter</u>         |             |
| <b>Schnellschnittergebnis - n (%)</b>  |             |
| Höher-gradiges Gliom                   | 23 (32.9)   |
| Niedrig-gradiges Gliom                 | 9 (12.8)    |
| Kein Tumor                             | 3 (4.3)     |
| Unbekannt                              | 35 (50)     |
| <b>MGMT - n (%)</b>                    |             |
| methyliert                             | 9 (12.8)    |
| <b>ATRX - n (%)</b>                    |             |

|                             |                   |
|-----------------------------|-------------------|
| Verlust                     | 18 (25.7)         |
| Ki67 [%] - MW (SD)          | 23.20 $\pm$ 7.06  |
| p53 - MW (SD)               | 24.41 $\pm$ 30.73 |
| <b>Molekulare Parameter</b> |                   |
| 450K - n (%)                | 1 (1.4)           |
| 850k - n (%)                | 31 (44.3)         |
| Nicht verfügbar - n (%)     | 38 (54.3)         |
| <b>Subklasse - n (%)</b>    |                   |
| H3K27M                      | 24 (34.3)         |
| Glioblastom                 | 1 (1.4)           |
| Kein match                  | 4 (5.7)           |
| Classifier – MW (SD)        | 0.86 $\pm$ 0.21   |
| <b>Adjuvante Therapie</b>   |                   |
| <b>Chemotherapie</b>        |                   |
| Chemotherapie (CT) - n (%)  | 3 (4.3)           |
| Kombinierte RT/CT - n (%)   | 53 (75.7)         |
| CT [Zyklen] - MW (SD)       | 4.3 ( $\pm$ 2.9)  |
| <b>Radiatio - n (%)</b>     |                   |
| Radiotherapie (RT) - n (%)  | 5 (7.1)           |
| Kombinierte RT/CT - n (%)   | 53 (75.7)         |
| <b>RT-Dosierung - n (%)</b> |                   |
| >54 Gy                      | 47 (81.0%)        |
| <54 Gy                      | 3 (5.2%)          |
| Unbekannt                   | 8 (13.8%)         |

**Tabelle 1:** Patient:innen- und Tumoreigenschaften; n – Anzahl; MW - Mittelwert, SD – Standarddeviation; KPS – Karnofsky Performance Score; ITS – Intensivstation, IONM – Intraoperatives Neuromonitoring; MEP - Motorisch evozierte Potenziale; SEP – Somatosensorisch evozierte Potenziale, CT – Chemotherapie, RT - Radiotherapie

Das mediane Gesamtüberleben betrug 13,6  $\pm$  14,2 Monate. Insgesamt verstarben 44 (62,8%) Patient:innen während der Nachbeobachtungszeit aufgrund des Voranschreitens ihrer onkologischen Grunderkrankung. Die statistische Analyse der Überlebenszeit ist in Tabelle 2 zusammengefasst.

**Tabelle 2**

|                            | Medianes<br>Überleben (M.) | p-Wert | Sig. | Medianes<br>PFS (M.) | p-Wert | Sig. |
|----------------------------|----------------------------|--------|------|----------------------|--------|------|
| <b>Klinische Parameter</b> |                            |        |      |                      |        |      |
| <b>Alter [Jahre]</b>       |                            |        |      |                      |        |      |
| ≥33                        | 14.4                       | 0.5756 | ns   | 6                    | 0.2407 | ns   |
| <33                        | 9.9                        |        |      | 7.3                  |        |      |
| <24                        | 9.5                        | 0.5700 | ns   | 7.5                  | 0.4574 | ns   |
| 24-33                      | 9.87                       |        |      | 5.5                  |        |      |
| 33-50                      | 23.1                       |        |      | 5                    |        |      |
| >50                        | 11                         |        |      | 6                    |        |      |
| <b>Gender</b>              |                            |        |      |                      |        |      |
| Männlich                   | 13                         | 0.6767 | ns   | 6.5                  | 0.5140 | ns   |
| Weiblich                   | 8.7                        |        |      | 5.1                  |        |      |
| <b>Symptome</b>            |                            |        |      |                      |        |      |
| Hemiparese                 | 19                         | 0.1604 | ns   | 5.8                  | 0.9845 | ns   |
| Keine Hemiparese           | 9.9                        |        |      | 6                    |        |      |
| Übelkeit/Erbrechen         | 12                         | 0.4816 | ns   | 6.5                  | 0.7194 | ns   |
| Keine Übelkeit/Erbrechen   | 9.9                        |        |      | 5                    |        |      |
| Hirnnervenlähmung          | 13                         | 0.8103 | ns   | 4.5                  | 0.7215 | ns   |
| Keine Hirnnervenlähmung    | 12                         |        |      | 6                    |        |      |
| Kopfschmerzen              | 13                         | 0.1474 | ns   | 6                    | 0.3597 | ns   |
| Keine Kopfschmerzen        | 10.5                       |        |      | 4.9                  |        |      |
| Epilepsie                  | 12                         | 0.5241 | ns   | 4.6                  | 0.0829 | ns   |
| Keine Epilepsie            | 12                         |        |      | 6.5                  |        |      |
| <b>Präoperativer KPS</b>   |                            |        |      |                      |        |      |
| >80                        | 23.1                       | 0.0042 | *    | 6                    | 0.0761 | ns   |
| ≤80                        | 6.5                        |        |      | 5.7                  |        |      |
| ≥80                        | 18                         | 0.02   | *    | 6                    | 0.5981 | ns   |
| <80                        | 4.2                        |        |      | 6.5                  |        |      |
| <b>Postoperativer KPS</b>  |                            |        |      |                      |        |      |
| >80                        | 23.1                       | 0.0002 | ***  | 7.1                  | 0.1168 | ns   |
| ≤80                        | 5.8                        |        |      | 5.5                  |        |      |

|                                  |        |        |    |      |        |    |
|----------------------------------|--------|--------|----|------|--------|----|
| <b><u>Radiografisch</u></b>      |        |        |    |      |        |    |
| Hydrozephalus                    | 12     | 0.7768 | ns | 6    | 0.8191 | ns |
| Kein Hydrozephalus               | 13     |        |    | 6.1  |        |    |
| Mittellinienbeteiligung          | 9.5    | 0.1526 | ns | 6    | 0.9516 | ns |
| Keine<br>Mittellinienbeteiligung | 23.1   |        |    | 8.3  |        |    |
| Kontrastmittelaufnahme           | 9.8    | 0.2529 | ns | 5.05 | 0.2395 | ns |
| Keine<br>Kontrastmittelaufnahme  | 23.1   |        |    | 11.5 |        |    |
| Zystisch                         | 13.85  | 0.6488 | ns | 23   | 0.0046 | *  |
| Nicht zystisch                   | 11     |        |    | 5    |        |    |
| <b>Seite</b>                     |        |        |    |      |        |    |
| Links                            | 14     | 0.4525 | ns | 7.4  | 0.0652 | ns |
| Rechts                           | 8.7    |        |    | 4    |        |    |
| Beides                           | 7.1    |        |    | 4.5  |        |    |
| Einseitig (Links/Rechts)         | 12     | 0.5759 | ns | 6    | 0.6043 | ns |
| Beide Hemisphären                | 7.1    |        |    | 4.5  |        |    |
| <b>Ödem [cm³]</b>                |        |        |    |      |        |    |
| <4,5                             | 8.4    | 0.9929 | ns | 4.4  | 0.1731 | ns |
| >4,5                             | 15     |        |    | 7    |        |    |
| 0-0.5 cm³                        | 3      | 0.1805 | ns | 7.5  | 0.0905 | ns |
| 0.5-4.5 cm³                      | 44.949 |        |    | 7    |        |    |
| 4.5-12.5 cm³                     | 8.4    |        |    | 4    |        |    |
| >12.5 cm³                        | 8.3    |        |    | 7.3  |        |    |
| <b>Restvolumen [cm³]</b>         |        |        |    |      |        |    |
| >8 cm³                           | 8.4    | 0.8831 | ns | 6.5  | 0.8584 | ns |
| <8 cm³                           | 11     |        |    | 5.5  |        |    |
| <3cm³                            | 15     | 0.3482 | ns | 9.65 | 0.3339 | ns |
| 3-8cm³                           | 6.1    |        |    | 4.5  |        |    |
| 8-20cm³                          | 14.4   |        |    | 7    |        |    |
| >20cm³                           | 8      |        |    | 5    |        |    |

|                                 |       |        |    |       |        |    |
|---------------------------------|-------|--------|----|-------|--------|----|
| >20cm <sup>3</sup>              | 8     | 0.2538 | ns | 5     | 0.6721 | ns |
| <20cm <sup>3</sup>              | 14.4  |        |    | 6     |        |    |
| <b>Volumen [cm<sup>3</sup>]</b> |       |        |    |       |        |    |
| > 8.5                           | 9.5   | 0.6906 | ns | 5.1   | 0.8714 | ns |
| < 8.5                           | 14.4  |        |    | 6     |        |    |
| <3                              | 18    | 0.1044 | ns | 9     | 0.2139 | ns |
| 3 - 8.5                         | 5.8   |        |    | 4.6   |        |    |
| 8.5- 16                         | 8.4   |        |    | 5     |        |    |
| > 16                            | 12    |        |    | 7.3   |        |    |
| <b>Lokalisation</b>             |       |        |    |       |        |    |
| Mesenzephalon                   | 25.0  | 0.0111 | *  | 9.9   | 0.5308 | ns |
| Dienzephalon                    | 9.5   |        |    | 5     |        |    |
| Metenzephalon                   | 36.5  |        |    | 11.5  |        |    |
| Myelenzephalon                  | 10.5  |        |    | 4     |        |    |
| Telenzephalon                   | 2.82  |        |    | 7.7   |        |    |
| Met-/Mesenzephalon              | 25.04 | 0.007  | ** | 10.7  | 0.0310 | *  |
| Tel-/Di-/Myelenzephalon         | 8.7   |        |    | 5     |        |    |
| <u>Histopathologisch</u>        |       |        |    |       |        |    |
| <b>MGMT</b>                     |       |        |    |       |        |    |
| Methyliert                      | 13    | 0.8742 | ns | 5     | 0.2076 | ns |
| Nicht methyliert                | 14    |        |    | 7     |        |    |
| <b>Classifier score</b>         |       |        |    |       |        |    |
| ≥0.9                            | 9.5   | 0.008  | ** | 5     | 0.0661 | ns |
| <0.9                            | 40.2  |        |    | 15.05 |        |    |
| <b>ATRX</b>                     |       |        |    |       |        |    |
| Verlust                         | 31    | 0.0029 | ** | 12.3  | 0.0280 | *  |
| Erhalt                          | 8.3   |        |    | 5.5   |        |    |
| <b>Schnellschnitt</b>           |       |        |    |       |        |    |
| Maligne                         | 9.87  | 0.1023 | ns | 6     | 0.0260 | *  |
| Benigne                         | 44    |        |    | 21.8  |        |    |
| Kein Tumor                      | 16.8  |        |    | 5.1   |        |    |

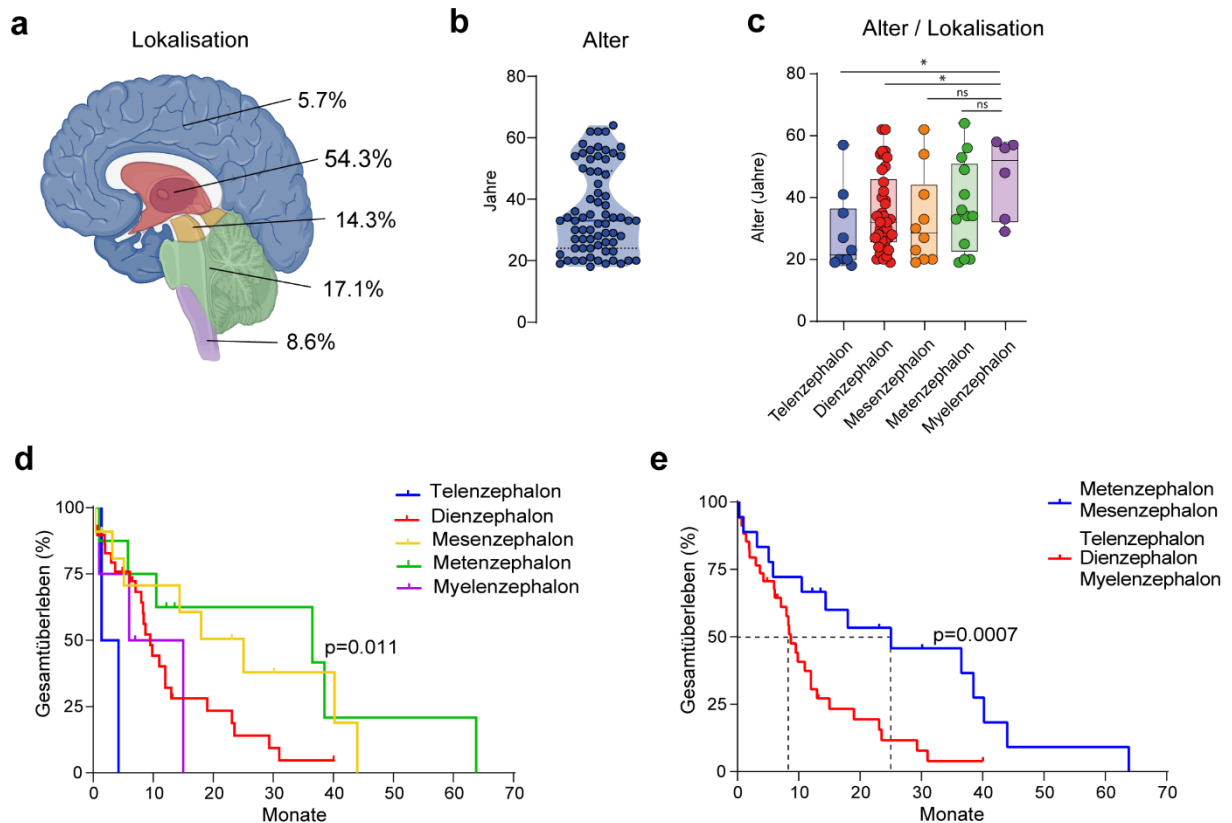
|                                 |       |           |       |           |
|---------------------------------|-------|-----------|-------|-----------|
| Maligne                         | 9.9   | 0.0457 *  | 6     | 0.0069 ** |
| Benigne/Kein Tumor              | 29.3  |           | 21.8  |           |
| <u>Chirurgisch</u>              |       |           |       |           |
| <b>Zugang</b>                   |       |           |       |           |
| Subokzipital                    | 15    | 0.3822 ns | 9     | 0.7972 ns |
| Retrosigmoidal                  | 38.35 |           | 5.75  |           |
| Paramedian                      | 6.1   |           | 6     |           |
| Stereotaxie/Varioguide          | 8.4   |           | 6.5   |           |
| Konvexität                      | 9.9   |           | 5     |           |
| <b>IONM</b>                     |       |           |       |           |
| Ja                              | 9.5   | 0.9704 ns | 6     | 0.7915 ns |
| Nein                            | 14    |           | 6     |           |
| <b>Resektionsausmaß</b>         |       |           |       |           |
| Vollständige Resektion          | 9.5   | 0.8845 ns | 6.1   | 0.9666 ns |
| Teilresektion                   | 12    |           | 7.1   |           |
| Biopsie                         | 11    |           | 5     |           |
| Resektion                       | 12    | 0.4006 ns | 7.074 | 0.8041 ns |
| Biopsie                         | 11    |           | 5     |           |
| <u>Therapie</u>                 |       |           |       |           |
| RT                              | 14.4  | 0.2730 ns | 6     | 0.9666 ns |
| CT                              | 8.7   |           | 4     |           |
| RT/CT                           | 8.1   |           | 8.215 |           |
| Kombinationstherapie<br>(RT/CT) | 14.4  | 0.1072 ns | 6     | 0.9857 ns |
| Monotherapie (RT o. CT)         | 8.7   |           | 4     |           |

**Tabelle 2:** Gesamtüberleben und Progressionsfreiesüberleben. M – Monate; PFS – Progressions-freies Überleben; ns – nicht signifikant; KPS – Karnofsky Performance Score; IONM – intraoperatives Neuromonitoring; MEP - motorisch evozierte Potenziale; SEP – somatosensorisch evozierte Potenziale



Die häufigste Lokalisation der erwachsenen H3 K27M-mutierten Gliome war das Diencephalon (n=38, 54,3%), einschließlich Thalamus und Basalganglien, gefolgt vom Metencephalon (n=12, 17,1%), welches den Pons und das Kleinhirn umfasst (siehe Abbildung 1a). Weitere Lokalisationen umfassten das Mesencephalon (n=10, 14,3%), das Myelencephalon (n=6, 8,6%) und das Telencephalon (n=4, 5,7%). Im Vergleich zu der pädiatrischen Kohorte, zeigten sich die H3 K27M-mutierten Gliome des Kindesalters jedoch am häufigsten im Mesencephalon lokalisiert, mit einer Häufigkeit von 68,8% (n=11) (supplementäre Tabelle 1). Die meisten H3 K27M-mutierten Gliome befanden sich in der Mittellinie (84,3%, n=59). Das mediane Alter bei der Erstdiagnose betrug 33 Jahre (Range: 18 - 64), und das Verhältnis von Frauen zu Männern lag bei 1:1,4 (Frauen 41,4%; Männer 58,6%) (siehe Abbildung 1b). Die Lage des Tumors variierte in den unterschiedlichen Altersgruppen, sodass wir feststellten, dass Tumore im Telencephalon ( $28,0 \pm 12,7$  Jahre,  $p=0,0127$ ) oder Diencephalon ( $35,42 \pm 12,7$  Jahre,  $p=0,0477$ ) im Durchschnitt ein signifikant niedrigeres Alter aufwiesen als Tumore im Myelencephalon ( $46,83 \pm 12,8$  Jahre) (siehe Abbildung 1c). Tumore im Telencephalon/Diencephalon/Myelencephalon waren mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert, während Tumore im Mes-/Metencephalon ein signifikant besseres Gesamtüberleben aufwiesen (8,7 vs. 25 Monate,  $p=0,007$ ) (siehe Abbildung 1d und 1e).

## Abbildung 1

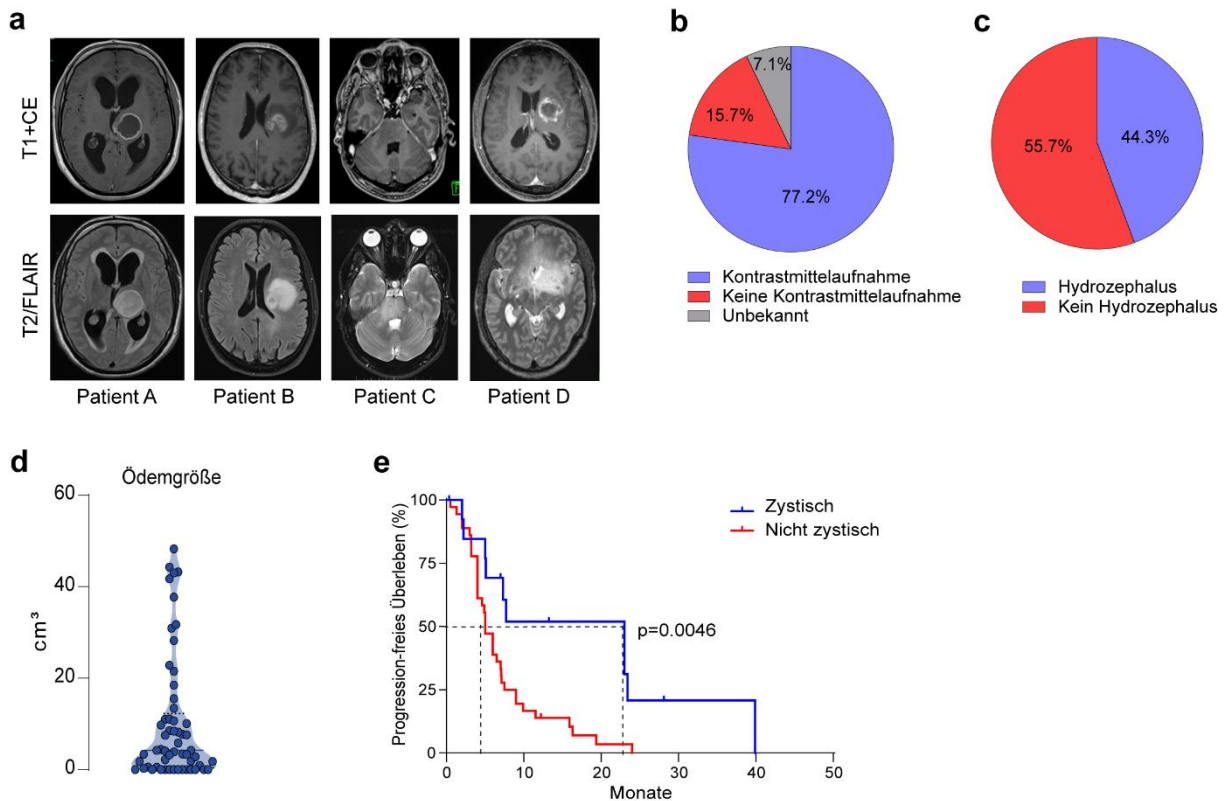


**Abbildung 1:** Radiografische Parameter **a)** Schematische Darstellung der verschiedenen Lokalisationen des Tumors im Gehirn **b)** Altersverteilung der analysierten Kohorte **c)** Altersverteilung in Abhängigkeit von der jeweiligen Tumorkompartimentierung. Tumore im Bereich des Telenzephalons ( $28,0 \pm 12,7$  Jahre,  $p=0,0127$ ) oder Dienezephalons ( $35,42 \pm 12,7$  Jahre,  $p=0,0477$ ) zeigten ein signifikant niedrigeres Durchschnittsalter im Vergleich zu Tumoren im Bereich des Myelencephalons ( $46,83 \pm 12,8$  Jahre) **d)** Kaplan-Meier Kurve der Tumorkompartimentierung, in der sich ein verlängertes mittleres Gesamtüberleben für Lokalisationen im Bereich des Metencephalons oder Mesencephalons markiert (36,5 und 25 Monate;  $p=0,011$ ) **e)** Kaplan-Meier Kurve: Tumore im Bereich des Metencephalons und Mesencephalons zeigten ein verlängertes Gesamtüberleben im Vergleich zu Tumoren im Bereich des Telenzephalons, Dienezephalons und Myelencephalons (25,04 vs. 8,7 Monaten,  $p=0,007$ ).

In den MRT-Analysen zeigten die H3 K27M-mutierten Gliome ein heterogenes Erscheinungsbild, exemplarisch in Abbildung 2a dargestellt. In den meisten Fällen (77,1%,  $n=54$ ) wurde eine Kontrastmittelanreicherung im MRT festgestellt (siehe Abbildung 2b). Ein obstruktiver Hydrozephalus wurde bei fast der Hälfte der Patient:innen ( $n=31$ , 44,3%) beobachtet (siehe Abbildung 2c). Die meisten H3 K27M-mutierten Gliome befanden sich in der Mittellinie ( $n=59$ , 84,3%). Das mittlere geschätzte Tumolvolumen betrug  $12,2 \pm 13,1 \text{ cm}^3$ , und das mittlere Ödemvolumen erreichte  $10,4 \pm 13,1 \text{ cm}^3$ . Dieses Messprotokoll wurde einheitlich in allen teilnehmenden Zentren angewendet. Des Weiteren zeigte sich, dass Tumoren mit einer zystischen Komponente im Vergleich zu nicht zystischen Läsionen

unabhängig von Alter und Lokalisation mit einem Überlebensvorteil assoziiert waren (23 vs. 5 Monate,  $p=0,0046$ ).

**Abbildung 2**



**Abbildung 2:** Radiografische Parameter **a)** MRT Aufnahmen von unterschiedlichen Patient:innen mit einem H3 K27M-mutated Gliom mit verschiedenen radiografischen Eigenschaften. Patient A zeigt eine Tumorlokalisation in der Mittellinie mit Kontrastmittelaufnahme und keinem peritumoralen Ödem. Patient B repräsentiert ein H3 K27M-mutated Gliom mit Kontrastmittelaufnahme sowie peritumoralem Ödem ohne begleitenden Hydrozephalus. Patient C zeigt einen Tumor im Bereich der Pons mit ausbleibender Kontrastmittelaufnahme in der T1-gewichteten MRT-Sequenz. Patient D repräsentiert einen soliden Tumor mit Kontrastmittelaufnahme im Bereich der Basalganglien. **b)** Kontrastmittelaufnahme in T1-gewichteten MRT-Aufnahmen zeigte sich in 77,2% aller Fälle **c)** Ein Hydrozephalus zeigte sich in 44,3% aller Fälle **d)** Verteilung des Ödemvolumens in der Gesamtkohorte **e)** Kaplan-Meier Kurve: Zystische Läsionen sind mit einem höheren mittleren Rezidivfreien-Überleben assoziiert im Vergleich zu nicht-zystischen Läsionen (23 vs. 5 Monaten,  $p=0,0046$ )

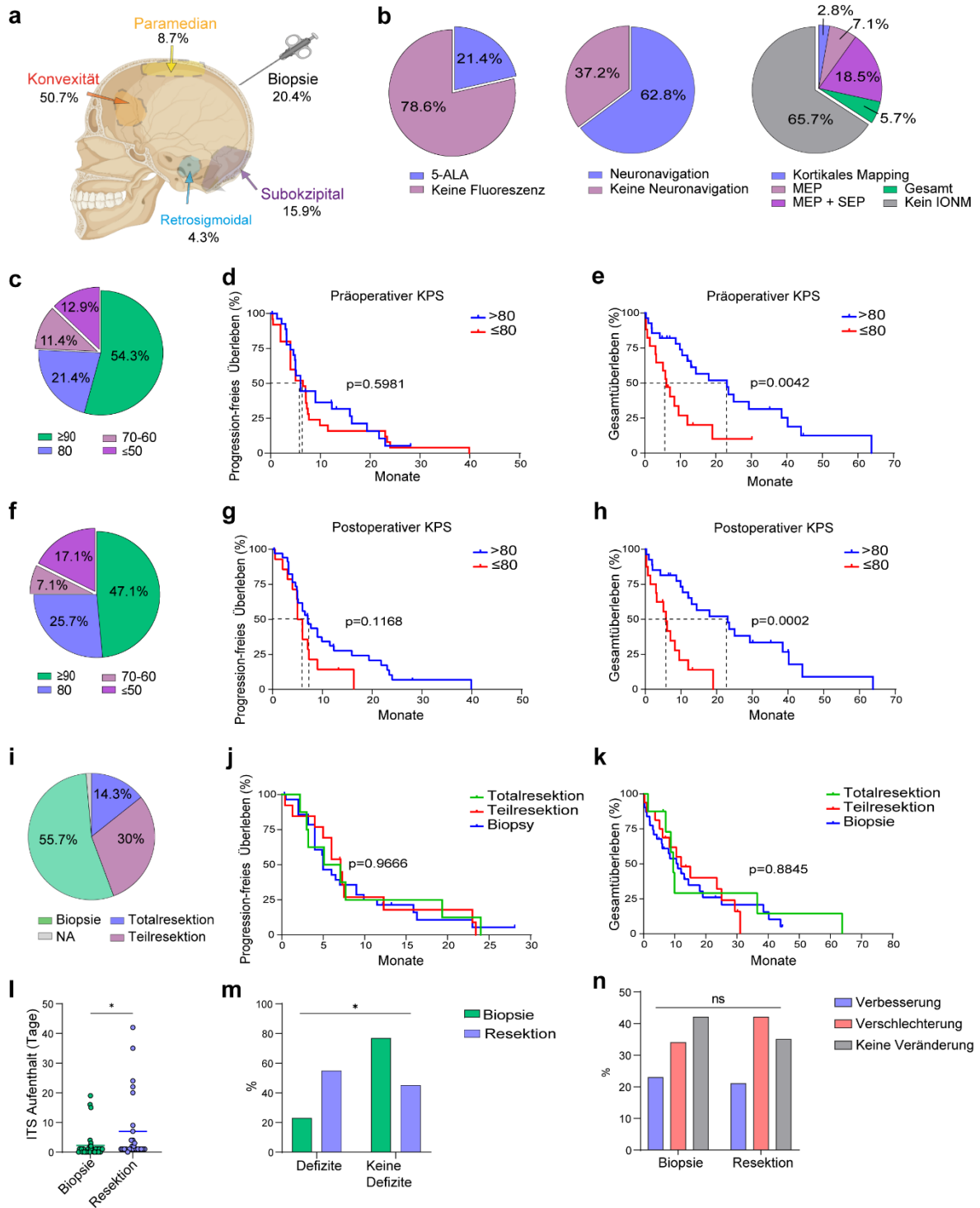
Die Hälfte aller Fälle wurde über einen supratentoriellen transkortikalen Zugang operiert (50%,  $n=35$ ), gefolgt von 20% rahmengestützter stereotaktischer oder neuronavigationsgeführter Biopsien ( $n=14$ ), 15,7% subokzipitaler Zugänge ( $n=11$ ), 8,6% interhemisphärischer Zugänge ( $n=6$ ) und 4,3% retrosigmoidaler Zugänge ( $n=3$ ) (Abbildung 3a). Die am häufigsten verwendete OP-Positionierung für diese Tumorentität war die Rückenlage (58,6%,  $n=41$ ), gefolgt von der Bauchlage (25,7%,  $n=18$ ) und der Seitenlage (4,3%,  $n=3$ ). Neuronavigation wurde in 62,8% ( $n=44$ ) aller

Fälle eingesetzt, während die Verwendung von Fluoreszenz in 21,4% (n=15) der Fälle zum Einsatz kam (siehe Abbildung 3b). Zusätzlich wurde das intraoperative Neuromonitoring (IONM) in 34,3% (n=24) der Fälle verwendet, wobei motorisch evozierte Potentiale (MEP) die häufigste Methode waren (32,8%, n=23), gefolgt von somatosensorisch evozierten Potentialen (SEP) in 25,7% (n=18) der Fälle (siehe Abbildung 3b). Präoperativ wiesen mehr als die Hälfte der Patient:innen (54,3%) einen Karnofsky-Performance-Status (KPS) von  $\geq 90$  auf (Abbildung 3c). Ein präoperativer KPS von  $\leq 80$  hatte keinen Einfluss auf das progressionsfreie Überleben (siehe Abbildung 3d). Jedoch war ein präoperativer KPS von  $\leq 80$  mit einem schlechteren Gesamtüberleben in der Kaplan-Meier-Analyse assoziiert (4,2 vs. 18,0 Monate,  $p=0,02$ ) (siehe Abbildung 3e). Postoperativ zeigte sich in der Gesamtkohorte ein etwas niedrigerer KPS, sodass hier nur insgesamt 47,1% aller Fälle einen KPS von größer oder gleich 90 aufwiesen (Abbildung 3f). Ein niedriger postoperativer KPS von  $\leq 80$  hatte keinen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben (siehe Abbildung 3g). Dennoch wurde ein Überlebensvorteil für Patienten mit einem postoperativen KPS von  $\geq 90$  festgestellt (5,8 vs. 23,1 Monate,  $p=0,0002$ ) (Abbildung 3h).

In Bezug auf das Resektionsausmaß wurden bei mehr als der Hälfte aller Patient:innen (54,3%, n=38) Biopsien durchgeführt, wobei sowohl stereotaktische oder neuronavigationsbasierte Biopsien als auch offene, transkortikale Biopsien zum Einsatz kamen. Von den Patient:innen, die sich einer Resektion unterzogen, erreichten 14,3% (n=10) eine radiologisch vollständige Resektion, während bei 30% (n=21) eine subtotale Resektion (STR) erzielt wurde (Abbildung 3i). Unsere Studie zeigt, dass Patient:innen, die eine Resektion erhielten, im Vergleich zu biopsierten Patient:innen weder einen signifikanten Überlebensvorteil beim progressionsfreien Überleben (PFS) (Abbildung 3j) noch beim Gesamtüberleben (OS) ( $p=0,9666$ ) aufwiesen (Abbildung 3k). Ebenso erbrachte die Analyse des Restvolumens nach chirurgischer Resektion keine Unterschiede: es wurde keine wesentliche Verbesserung des Überlebens beobachtet, wenn man a) den Median von 8 cm<sup>3</sup> Restvolumen ( $p=0,8831$ ) und b) Quartile, kategorisiert als  $<3$  cm<sup>3</sup>, 3-8 cm<sup>3</sup>, 8-20 cm<sup>3</sup>,  $>20$  cm<sup>3</sup> ( $p=0,3482$ ), auswertete (Tabelle 2). Eine vollständige Resektion wurde bei Erwachsenen häufiger erreicht als bei Kindern (10% vs. 0%,  $p=0,0439$ ). Darüber hinaus wiesen pädiatrische Patient:innen ein leicht kürzeres, jedoch nicht signifikant unterschiedliches medianes Gesamtüberleben von 10,15 Monaten auf ( $p=0,4765$ ).

Des Weiteren zeigte sich bei Patient:innen, die sich einer Resektion unterzogen, keine signifikante Verbesserung des KPS im Vergleich zu denen, die sich einer Biopsie unterzogen ( $p=0,8644$ ) (Abbildung 3n). Ferner analysierten wir die Patient:innen, bei denen sich der Karnofsky-Performance-Status (KPS) nach der Operation verschlechterte, um diejenigen zu identifizieren, bei denen eine Resektion möglicherweise nicht ratsam ist. Unsere Untersuchung ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Alter, Tumorgroße, Ödeme, Tumorlokalisation oder das Vorhandensein eines präoperativen Hydrozephalus (supplementäre Tabelle 3). Außerdem erhielten Patient:innen, bei denen sich der KPS nach der Operation verschlechterte, in ähnlichem Maße intraoperatives Neuromonitoring (IONM), Neuronavigation und Fluoreszenz wie Patient:innen, bei denen dies nicht der Fall war. Es ist jedoch erwähnenswert, dass ein signifikant höherer Anteil der Patient:innen mit verschlechtertem postoperativem KPS in Bauchlage operiert wurde als Patient:innen mit stabilem oder verbessertem KPS (42,9% vs. 18,2%,  $p=0,0391$ ). Des Weiteren hatten Patient:innen, bei denen sich der KPS nach der Operation verschlechterte, eine deutlich längere Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation als Patient:innen mit stabilem oder verbessertem KPS (8,2 vs. 2,5 Tage,  $p=0,0272$ ). Zudem hatten Patient:innen, die sich einer chirurgischen Resektion unterzogen, eine deutlich längere Verweildauer auf der Intensivstation als Patient:innen, im Vergleich zu denjenigen, die sich einer Biopsie unterzogen (6,9 vs. 2,2 Tage,  $p=0,00337$ ) (Abbildung 3l). Außerdem traten bei den Patient:innen, bei denen eine Resektion durchgeführt wurde, signifikant häufiger anhaltende oder neue postoperative klinisch-neurologische Defizite auf als bei denen, bei denen nur eine Biopsie durchgeführt wurde (54,8% vs. 23,1%,  $p=0,0120$ ) (Abbildung 3m).

**Abbildung 3**



**Abbildung 3 - Klinische Parameter a)** Grafische Darstellung der neurochirurgischen Zugänge, die in dieser Kohorte verwendet wurden, wobei der häufigste Zugang die Konvexität war. Biopsien bestanden aus stereotaktisch geführten Nadelbiopsien (20,4%), während offene und minimal-invasive Biopsien unter Verwendung anderer chirurgischer Zugänge durchgeführt wurden (34,3%). **b)** Tortendiagramme der während der Operation verwendeten chirurgischen Instrumente: 5-ALA-Fluoreszenz wurde in 21,4% aller Fälle verwendet; Neuronavigation wurde in 62,8% und intraoperatives Neuromonitoring wurde in 34,3% aller Fälle verwendet. **c)** Darstellung der Verteilung des jeweiligen präoperativen Karnofsky-Performance-Status. Ein KPS-Wert von 90 oder höher wurde in 54,3% aller Fälle beobachtet. **d)** Kaplan-Meier-Kurve: Der präoperative KPS hatte keinen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben

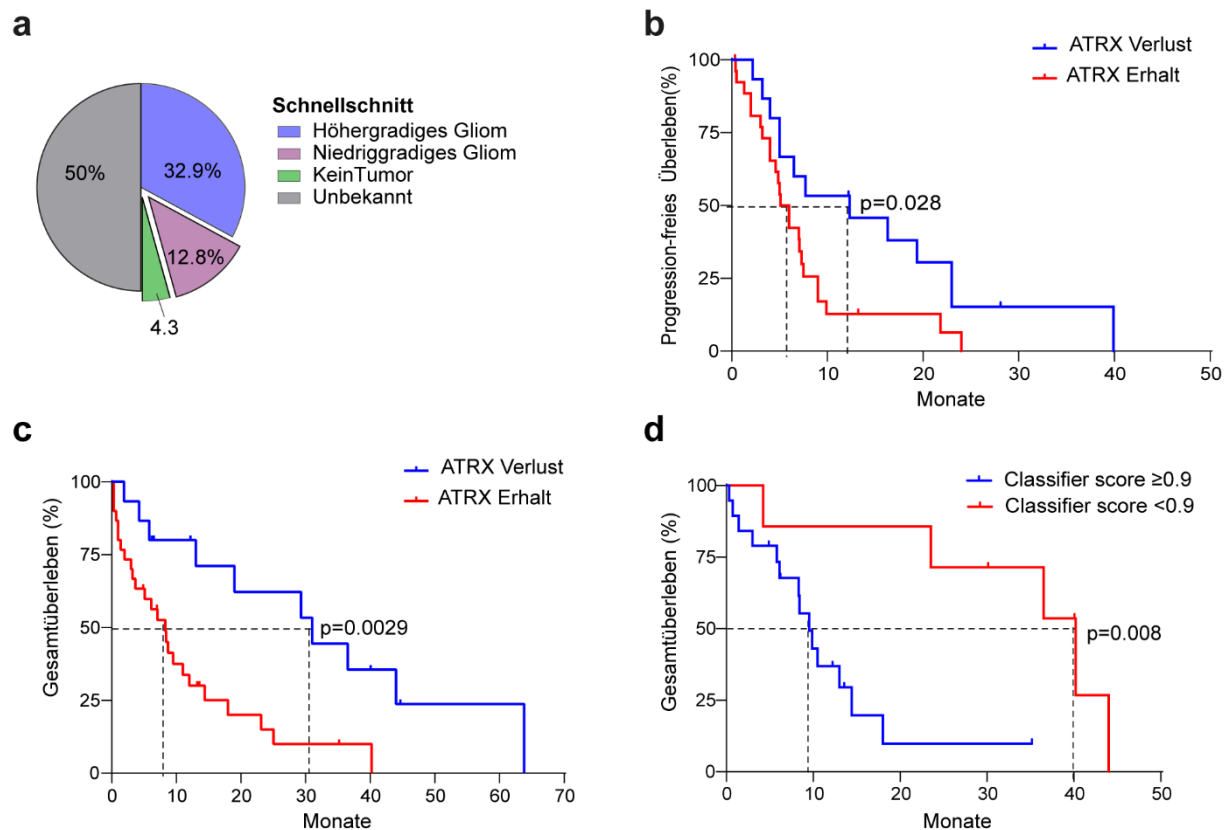
( $p=0,5981$ ). **e)** Kaplan-Meier-Kurve: Ein präoperativer KPS-Wert  $>80$  war mit einem Überlebensnachteil verbunden (23,1 vs. 4,2 Monate;  $p=0,0042$ ). **f)** Verteilung des postoperativen KPS. **g)** Kaplan-Meier-Kurve: Der postoperative KPS hatte keinen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben bei H3-K27M-mutierten Gliomen ( $p=0,1168$ ). **h)** Kaplan-Meier-Kurve: Ein postoperativer KPS-Wert  $<80$  war mit einem Überlebensnachteil verbunden (23,1 vs. 5,8 Monate;  $p=0,002$ ). **i)** Tortendiagramm der Verteilung des Ausmaßes der Resektion (EOR). **j)** Kaplan-Meier-Kurve: Ein größeres Ausmaß der Resektion zeigte keinen Überlebensvorteil im Vergleich zur Biopsie ( $p=0,9666$ ). **k)** Kaplan-Meier-Kurve: Das Ausmaß der Resektion (EOR) zeigte keinen Überlebensvorteil im Vergleich zwischen der kompletten Resektion (GTR), subtotaler Resektion (STR) und Biopsie ( $p=0,8845$ ). **l)** Patient:innen, die eine Resektion (GTR/STR) erhielten, wiesen einen signifikant längeren Aufenthalt auf der Intensivstation auf als biopsierte Patient:innen (6,9 vs. 2,2 Tage,  $p=0,0337$ ). **m)** Patient:innen, die sich einer Resektion unterzogen, wiesen signifikant mehr postoperative Defizite auf als biopsierte Patient:innen (54,8% vs. 23,1%,  $p=0,0120$ ). **n)** Patient:innen, die eine Resektion erhielten, zeigten eine ähnliche Verteilung der Verschlechterung des KPS im Vergleich zu denen, die eine Biopsie erhielten (34% vs. 42%,  $p=0,8110$ ).

Nach dem chirurgischen Eingriff erhielten 75,7% der Patient:innen eine kombinierte Radio-Chemotherapie, während nur 4,3% aller Patient:innen ausschließlich eine Chemotherapie und 7,1% ausschließlich eine Strahlentherapie erhielten. Von allen Patient:innen, die eine adjuvante Strahlentherapie erhielten ( $n=58$ , 82,8%), erhielten 47 (81,0%) die empfohlene Dosis ( $>54$  Gy) der adjuvanten Strahlentherapie, während die Dosis bei lediglich 8 (13,8%) Patient:innen unbekannt blieb. Bei drei Patient:innen (5,2%) war es nicht möglich, die volle empfohlene Dosis von  $>54$  Gy zu verabreichen (siehe Tabelle 1). Des Weiteren erhielten insgesamt 53 (75,5%) der Patient:innen eine Kombination aus Radio- und Chemotherapie als adjuvante Behandlung, wobei alle Temozolomid als Chemotherapeutikum erhielten. Die durchschnittliche Anzahl der Chemotherapiezyklen betrug  $4,3 \pm 2,9$  Monate. Bei der histopathologischen Analyse ergab der intraoperative Schnellschnitt ein niedrig-gradiges Gliom in 12,8% ( $n=9$ ) der Fälle, ein hochgradiges Gliom in 32,9% ( $n=23$ ), und bei 4,3% ( $n=3$ ) wurde zunächst kein Tumor gefunden, jedoch dann erst später in der endgültigen histologischen Aufarbeitung (siehe Abbildung 4a). Zusätzlich wurde bei 12,8% der Fälle ( $n=9$ ) eine Methylierung des MGMT-Promotors festgestellt. Ein nukleärer Verlust von ATRX wurde bei 25,7% ( $n=18$ ) aller erwachsenen Patient:innen beobachtet, während bei pädiatrischen Patient:innen etwas weniger ATRX-Mutationen (11,7%) vorlagen ( $p=0,0723$ ) (siehe ergänzende Tabelle 1). Des Weiteren fanden wir heraus, dass der Verlust von ATRX mit einem signifikanten Überlebensvorteil beim progressionsfreien Überleben (PFS) verbunden war ( $p=0,028$ , Abbildung 4b) sowie beim Gesamtüberleben (31 vs. 8,3 Monate,  $p=$

0,0029) (siehe Abbildung 4c). 44,3% der Fälle wurden mit einer globalen Methylierungsanalyse (850k) untersucht, und in 1,4% wurde eine 450k-Analyse durchgeführt. Davon wiesen 24 Fälle (75,0%) einen Matching-Score von  $\geq 0,9$  für ein H3 K27M-mutiertes Gliom auf, während ein Fall (3,1%) eine engere Übereinstimmung mit der IDH-Wildtyp-Glioblastom-Gruppe aufwies und 7 Fälle (21,9%) in der Methylierungsanalyse nicht mit einem H3 K27M-mutierten Gliom übereinstimmten ([www.molecularNeuropathology.org](http://www.molecularNeuropathology.org); Classifier Version V11b4). Dennoch wurden alle Fälle in den endgültigen neuropathologischen Berichten als H3 K27M-mutiertes Gliom klassifiziert. Ein Klassifikator-Score  $\leq 0,9$  war außerdem mit einem besseren Gesamtüberleben assoziiert als ein höherer Klassifikator-Score ( $p=0,008$ ) (Abbildung 4d). Des Weiteren zeigte die multivariate Analyse, dass die ATRX-Retention (HR 4,335, 95% CI: 1,647-13,34,  $p=0,0054$ ) und ein präoperativer KPS  $<90$  (HR 4,358, 95% CI: 1,628-12,29,  $p=0,0039$ ) als unabhängige ungünstige Risikofaktoren für das Gesamtüberleben identifiziert werden konnten (ergänzende Tabelle 2). In Fällen, in denen Methylierungsanalysen zusammen mit den verfügbaren Daten zur Kopienzahlvariation durchgeführt wurden, wurde ein Gesamtprofil der genomischen Gewinne und Verluste in der gesamten Kohorte erstellt (supplementäre Abbildung 1a). Darunter zeigte sich eine Vielzahl von Zielmutationen, wobei einer der häufigsten ein C19MC-Verlust war (supplementäre Abbildung 1b). Besonderes Interesse galt den Auswirkungen von ATRX auf die Genomstabilität und das Auftreten verschiedener Tumormutationen (supplementäre Abbildung 1c). Dabei zeigte sich, dass der Verlust von ATRX tendenziell mit vermehrten Gewinnen in den Regionen MDM4, PPM1D, PTCH1, MYB und KIAA1549/BRAF assoziiert war, während die Beibehaltung von ATRX tendenziell mit vermehrten Verlusten in der C19MC-Genregion einherging (supplementäre Abbildung 1d).



## Abbildung 4



**Abbildung 4** - Histopathologische Parameter **a)** Die Schnellschnitte ergaben 32,9% hochgradige Tumoren, 12,8% niedrig-gradige Tumoren und in 4,3% keinen Tumor. **b)** Kaplan-Meier-Kurve: Der Verlust von ATRX ist mit einem Vorteil im progressionsfreien Überleben (PFS) im Vergleich zur ATRX-Retention assoziiert (12,3 vs. 5,5 Monate,  $p=0,028$ ). **c)** Kaplan-Meier-Kurve: Der Verlust von ATRX ist mit einem Überlebensvorteil bei der Gesamtüberlebenszeit (OS) im Vergleich zur ATRX-Retention assoziiert (31 vs. 8,3 Monate,  $p=0,0029$ ). **d)** Kaplan-Meier-Kurve: Ein Methylierungsklassifikations-Score  $<0,9$  war mit einem besseren Überlebensergebnis assoziiert ( $p=0,008$ ).

## 4. Diskussion

H3 K27M-mutierte Gliome sind eine kürzlich in der WHO-Klassifikation eigenständig definierte molekulare Subgruppe von Hirntumoren, die vor allem bei Erwachsenen selten vorkommen. Sie sind durch eine Mutation im Histon H3 K27M-Gen gekennzeichnet, die zu einer Veränderung des Histons H3.3 führt, was einen Verlust der Trimethylierung zur Folge hat. Die hieraus resultierenden Tumore zeigen ein diffuses infiltratives Wachstum, vor allem im Bereich der Mittellinie des Gehirns. Diese hochgradig bösartigen Tumore sind in der Regel gegen herkömmliche Therapien resistent und enden fast immer tödlich. Die vorliegende Studie beschäftigt sich folglich mit verschiedenen klinischen Merkmalen der H3 K27M-

mutierten Gliomen bei Erwachsenen im Rahmen einer großen multizentrischen Serie.

In unserer Studie lag das durchschnittliche Alter zum Zeitpunkt der Diagnose bei 36 Jahren, während das durchschnittliche Diagnosealter in der pädiatrischen Literatur bei etwa 9 Jahren liegt (Mackay et al., 2017; Kleinschmidt-DeMasters and Mulcahy Levy, 2018; Lu et al., 2019; Levy, 2018; Lu et al., 2019). Interessanterweise haben wir eine Verschiebung der Altersgruppen in Bezug auf ihre Hirnlokalisation festgestellt und beobachtet, dass Tumore im Myelencephalon im Vergleich zu anderen Lokalisationen ein deutlich höheres Durchschnittsalter aufwiesen (Durchschnittsalter von 45 Jahren). Im Gegensatz dazu zeigen die klassischen ZNS-WHO-Grad 4 IDH-Wildtyp-Glioblastome, die vor allem im Telencephalon lokalisiert sind, ein deutlich höheres Alter bei Diagnosestellung mit einem Median von 64 Jahren (Chakrabarti et al., 2005; Ostrom et al., 2013). Die genaue Ursache für diese Altersverteilung bleibt unklar und könnte auf eine altersbedingte Plastizität des Tumors und eine unterschiedliche Zellzusammensetzung hinweisen (Neftel et al., 2019; Hara et al., 2021; Schmitt et al., 2021). So konnten beispielsweise neueste Studien zeigen, dass sich die Zellzusammensetzung mit dem Alter verändert, wie beispielsweise in der Studie von Liu et al., in der ein steigendes Alter der Patient:innen mit einem H3 K27M-mutiertem Gliom, mit einer Zunahme der mesenchymalen (MES)-ähnlichen Zellen in der Tumorzusammensetzung assoziiert war, was wiederum mit altersabhängigen Veränderungen des Immunmilieus in Verbindung gebracht wird (Liu et al., 2022).

Des Weiteren stellten wir in unserer Studie fest, dass erwachsene Patient:innen mit einem H3 K27M-mutiertem Gliom eine Prädisposition für eine Lokalisation im Diencephalon zeigen, gefolgt von Mes- und Metencephalon. In unserer pädiatrischen Kohorte, aber auch gemäß der Literatur, sind H3 K27M-mutierte Gliome bei Kindern jedoch am häufigsten im Hirnstamm und hier insbesondere in der Pons lokalisiert (Thust et al., 2021; Wang et al., 2021; Zheng et al., 2022). Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass die Tumorlokalisation im Mes- oder Metencephalon mit einem signifikanten Überlebensvorteil im Vergleich zu den anderen Lokalisationen assoziiert war. Die Erklärung für die Auswirkungen der Tumorlokalisation im Gehirn auf das Überleben bleibt nach wie vor ungeklärt und hängt möglicherweise mit den unterschiedlichen Ursprungszellen und ihrer

jeweiligen biologischen Aggressivität in den verschiedenen Regionen zusammen (Marques et al., 2016; Huang et al., 2020; Fu et al., 2021). Die Untersuchungen in der Studie von Liu et al. zeigten, dass sich die Zusammensetzung der Zellen je nach Tumorlokalisation ändert, sodass Tumore im Dienzephalon einen erhöhten Anteil an reiferen Oligodendrozyten-Vorläuferzellen aufwiesen, während Tumore mit pontinen Lokalisationen eine erhöhte Anzahl an unreifen Oligodendrozyten-Vorläuferzellen aufwiesen (Nagaraja et al., 2019; Liu et al., 2022). Das Ausmaß, in welchem diese Zellzusammensetzung sowohl die Bösartigkeit des Tumors als auch ihr biologisches Verhalten beeinflusst, bleibt bisher ungeklärt, zeigt jedoch die Heterogenität dieser Tumorentität sowie die Dringlichkeit eines differenzierten Verständnisses der zugrunde liegenden Pathobiologie, um die Entwicklung wirksamer, zielgerichteter Behandlungsstrategien für diese schwerwiegenden Krankheit zu erleichtern.

Radiologisch konnten wir in der Magnetresonanztomografie bei 15,7% der Tumoren keine Kontrastmittelaufnahme feststellen. Dabei wurde deutlich, dass insbesondere Tumoren im Bereich des Metencephalons und Myelencephalons keine Kontrastmittelaufnahme aufwiesen. Frühere Berichte hatten bereits Variationen in der Kontrastmittelaufnahme beschrieben, was möglicherweise ebenfalls auf eine unterschiedliche Zellzusammensetzung hinweist (Dono et al., 2020; Schulte et al., 2020). Einen Zusammenhang zwischen der Variation der Kontrastmittelaufnahme des Tumors und der Malignität in Bezug auf das Überleben konnte in der vorliegenden Studie nicht dargestellt werden. Dennoch zeigte sich, dass Patienten mit einer zystischen Tumorkomponente ein besseres Gesamtüberleben aufwiesen. Dies verdeutlicht die unterschiedliche Biologie des Tumorwachstums bei dieser Entität, da eine nicht zystische Tumormorphologie häufiger bei stark infiltrierenden Tumoren zu finden ist (Lai et al., 2011).

Histopathologisch zeigte sich bei 25% der Patient:innen ein Verlust des nukleären ATRX. In früheren Studien wurde ein ATRX-Verlust bei pädiatrischen H3 K27M-mutierten Gliomen nur selten festgestellt, bei Erwachsenen dagegen häufiger, mit einer Inzidenz von 5 - 12,5%, und ebenso war ein nukleärer ATRX-Verlust in der Pädiatrie mit einem höheren Alter assoziiert (Khuong-Quang et al., 2012; Zheng et al., 2022). Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass ein nukleärer ATRX-Verlust mit einem signifikant besseren Gesamtüberleben assoziiert ist als bei Tumoren mit ATRX-Retention, was im Einklang mit früheren Studien steht (Ebrahimi et al., 2016;

Vuong et al., 2021; Zheng et al., 2022). Dennoch wurde in anderen Studien mit H3 K27M-mutierten Gliomen beschrieben, dass der Verlust von ATRX bei Erwachsenen mit einer kürzeren Gesamtüberlebenszeit vergesellschaftet war, nicht jedoch bei Kindern (Wang et al., 2021; Gong et al., 2023). Es ist jedoch zu beachten, dass in diesen Studien ein erheblicher Anteil (37,2%) der Patient:innen in der Erwachsenenkohorte palliativmedizinisch versorgt wurde, ohne dass eine Chemo- und/oder Strahlentherapie durchgeführt wurde. ATRX weist mehrere Funktionen auf und ist für die Umgestaltung des Chromatins und als Histon-Chaperon notwendig. Frühere Untersuchungen ergaben, dass der Komplex ATRX/DAXX (death-domain associated protein) für die Ablagerung von H3.3 an Telomeren und perizentrischem Heterochromatin von wesentlicher Bedeutung ist, dennoch bleibt der zugrundeliegende Prozess eines Überlebensvorteils der ATRX-Mutation in dieser Tumorentität bisher ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen (Dyer et al., 2017). Da ATRX an der Telomer-Verlängerung bei Gliomen beteiligt ist, schließen sich ATRX-Mutationen und Mutationen im Telomerase-Reverse-Transkriptase (TERT)-Promotorbereich aufgrund ihrer funktionellen Redundanz gegenseitig aus (Liu et al., 2019). Der Erhalt von ATRX könnte jedoch als prognostischer Marker dienen und rechtfertigt daher eine aggressivere Therapie, d.h. eine Kombination von Temozolomid mit Chlorethyl-Cyclohexyl-Nitrosoharnstoff (CCNU), analog zu den Daten der CeTeG-Studie von Herrlinger et al. (Herrlinger et al., 2019), insbesondere bei einer so jungen Patientenpopulation.

Eines der wichtigsten Erkenntnisse dieser Studie war jedoch die Feststellung, dass weder eine vollständige noch eine teilweise neurochirurgische Resektion einen Überlebensvorteil im Vergleich zur reinen Biopsie zeigte. Gleichzeitig konnten wir einen Überlebensvorteil bei Patient:innen mit einem höheren prä- und postoperativen KPS von >80 zeigen. Dieser Überlebensvorteil könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Patient:innen demnach besser in der Lage waren eine adjuvante Behandlungen, wie Bestrahlung oder Chemotherapie, zu vollenden, die für die Verlängerung des Überlebens dieser Patienten entscheidend sind. Darüber hinaus liegt der Verdacht nahe, dass der Nutzen der chirurgischen Resektion durch die Verringerung des KPS geschmälert wird, der sowohl bei einer aggressiveren Resektion als auch bei schwer zu erreichenden Tumoren, gefährdet ist. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass wir bei Patient:innen, die sich einer Resektion unterzogen, im Vergleich zu Patient:innen, bei denen nur eine Biopsie

durchgeführt wurde, eine höhere Häufigkeit postoperativer Defizite sowie einen längeren intensivmedizinischen Aufenthalt sehen konnten und dass sich der KPS bei einer Resektion im Vergleich zu einer Biopsie nicht verbesserte. Da die häufig eloquente und sehr zentrale Lage von H3 K27M-mutierten Tumoren mit einem hohen chirurgischen Risiko für sekundäre Morbiditäten und keiner KPS-Verbesserung assoziiert ist und eine Gesamtresektion nur in einer Minderheit der Fälle erreicht werden kann, sprechen unsere Daten dafür, dass Tumoren mit hochgradigem radiologischem Verdacht auf eine H3 K27M-Diagnose und hohem Risiko für sekundäre Morbidität vor einer neurochirurgischen Resektion zunächst biopsiert werden sollten. Nach Bestätigung der Verdachtsdiagnose, sprechen unsere Studiendaten dafür, dass neurochirurgische Eingriffe in erster Linie darauf abzielen sollten, den KPS zu verbessern, das heißt beispielsweise einen Hydrozephalus zu behandeln oder, wenn dies sicher möglich ist, den Tumor zu verkleinern, um neurologische Defizite zu verbessern und so die Einleitung einer adjuvanten Therapie zu ermöglichen. Bei der Gesamtinterpretation unserer Daten ist zu berücksichtigen, dass die bisher definierten Parameter zur Beurteilung der Teil- und der Gesamtresektion nicht vollständig auf diesen heterogenen, diffus infiltrierenden Tumor der Mittellinie angewendet werden können, zumal die postoperative radiologische Beurteilung der Resektion in den Mittellinienstrukturen schwierig ist. Daher kann die Aussage, dass die Wirkung einer Gesamtresektion auf das Überleben des Tumors begrenzt ist, letztlich nicht abschließend getroffen werden. Da jedoch die Volumenreduktion durch Teilresektion das Ergebnis nicht verbessert, empfehlen wir, dass das Ziel der Tumorresektion sehr sorgfältig gegen das Risiko einer klinischen Verschlechterung abgewogen werden sollte.

In Zukunft werden auch weitere diagnostische Ansätze, wie einer Biopsie mittels Biomarker die Diagnostik und Behandlung diese Entität unterstützen. Erst kürzlich gelang Afflerbach et al. eine zuverlässige Diagnose von H3 K27M-mutierten Tumoren und anderen Hirntumoren durch Nanopore-Sequenzierungsanalysen des Liquors (Afflerbach et al., 2023). Daher stellt sich die Frage, ob diese Tumoren mit Verdacht auf eine H3 K27M-Mutation sowie einem begleitenden okklusiven Hydrozephalus nun zunächst durch Anlage einer Liquordrainage eine Liquorprobe zur histologischen Sicherung dienen kann und anschließend eine chirurgische Resektion oder ausschließlich eine Biopsie entsprechend ihrer Entität durchgeführt werden sollte, um (1) einen stabilen klinischen Zustand des Patienten

aufrechtzuerhalten und (2) so bald wie möglich eine adjuvante Therapie zu beginnen. Die derzeitige Standardbehandlung nach chirurgischer Resektion oder Biopsie ist nach wie vor die kombinierte Radio- und Chemotherapie mit Temozolomid mit nachfolgender zyklischer Temozolomidtherapie nach dem Stupp Protokoll (Stupp et al., 2009). Neue Behandlungsmöglichkeiten wie der Histonacetylase-Inhibitor "Panobinostat", der ALK2-Inhibitoren oder Immuntherapien sind jedoch vielversprechend und werden derzeit erprobt (Hennika et al., 2017; Benitez-Ribas et al., 2018; Carvalho et al., 2019; Argersinger et al., 2021; Vitanza et al., 2021).

Die Immuntherapie hat dank der Entdeckung der Immuncheckpoints im letzten Jahrzehnt einen großen Durchbruch in der Behandlung verschiedenster Tumore erzielt und dessen Bedeutung wurde durch die Verleihung des Nobelpreises der Medizin an Allison und Honjo verdeutlicht. Nun findet die Immuncheckpoint eine routinemäßige Anwendung bei vor allem malignen Melanomen, Lungentumoren, Lymphomen sowie Nierenkarzinomen (Garon et al., 2015; Luke et al., 2017; Xu-Monette, Zhou and Young, 2018; Curran and Kopp, 2021). In einer retrospektiven Datenanalyse an rezidierten, pädiatrischen diffusen Mittelliniengliomen im Bereich der Pons, welche mittels Re-Radiatio sowie mit und ohne PD-1 Inhibitoren behandelt wurden zeigte sich eine Verlängerung des Gesamtüberlebens bei der Kombination von Bestrahlung und PD-1 Inhibitoren (22.9 vs. 20.4 Monate) (Kline et al., 2018). Neben der Immuncheckpoint Blockade zeigte auch die CAR-T Zell Therapie in den letzten Jahren hoffnungsvolle Ergebnisse. So konnte in einer Studie von Mount et al. eine erhöhte Expression von GD2 in H3 K27M mutierten Gliomen festgestellt werden und diese mittels CAR T Zell Therapie adressiert werden (Mount and Majzner, 2018). In der Phase I Studie von intravenöser sowie bei Ansprechen auch intraventrikulärer GD2 CAR T Zell Therapie (NCT04196413) zeigte sich bei drei von vier Patient:innen mit diffusen pontinen Mittelliniengliomen ein klinisches sowie radiografisches Therapieansprechen (Majzner et al., 2022).

Darüber hinaus hat sich ONC201, ein Dopaminrezeptor-D2 (DRD2)-Antagonist und ein Agonist der caseinolytischen Protease P (ClpP), als vielversprechendes therapeutisches Medikament zur Bekämpfung von Gliome erwiesen. Insbesondere H3 K27M-mutierte Gliome haben eine erhöhte Anfälligkeit für ONC201 gezeigt. So wurde beispielweise in einer klinischen Studie für rezidivierende Glioblastome durch

Zufall ein erwachsener Patient mit einer H3 K27M-Mutation eingeschlossen, dessen Überleben sich nach der Behandlung mit ONC201 deutlich verbesserte (Arrillaga-Romany et al., 2017). Eine weitere Studie von Chi et al. untersuchte sieben erwachsene Patient:innen mit rezidivierendem H3 K27M-mutiertem Gliome, die mit ONC201 behandelt wurden. Die Erwachsenen in dieser Studie zeigten keine signifikante Verlängerung des mittleren progressionsfreien Überlebens im Vergleich zu den pädiatrischen Patient:innen (15 vs. 13 Wochen) (Chi et al., 2019). Kürzlich veröffentlichten Venetti *et al.* die Ergebnisse von zwei klinischen Studien (NCT03416530, NCT03134131), in denen ONC201 sowohl bei pädiatrischen als auch bei erwachsenen H3 K27M-mutierten Gliomen eingesetzt wurde, und berichtete über eine signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens (Venetti et al., 2023). Wir analysierten die veröffentlichten Daten in Bezug auf altersabhängige Unterschiede und stellten fest, dass für die Gruppe der erstdiagnostizierten, sowohl erwachsenen (>18 Jahre) und pädiatrischen (<18 Jahre) H3 K27M-mutierten Gliome kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben bestand, wenn sie nach der Bestrahlung mit ONC201 behandelt wurden (26 vs. 21,7 Monate,  $p=0.7540$ ). In der Kohorte der rezidierten H3 K27M-mutierten Gliome wiesen erwachsene Patient:innen jedoch ein signifikant längeres Gesamtüberleben auf, wenn sie mit ONC201 behandelt wurden, verglichen mit ihren pädiatrischen Pendanten (11,4 vs. 5,8 Monate,  $p=0.0275$ ). Dies deutet darauf hin, dass erwachsene Patient:innen mit rezidivierendem H3 K27M-mutiertem Gliomen besser auf eine ONC201-Therapie ansprechen. Darüber hinaus wurden vor kurzem zwei klinische Phase-II-Studien für erwachsene Patient:innen mit rezidivierendem H3 K27M-mutiertem Gliom eingeleitet, die mit ONC201 behandelt werden (NCT03295396; NCT02525692), was Hoffnung auf weitere Erkenntnisse und potenzielle therapeutische Durchbrüche bei der Behandlung von erwachsenen H3 K27M-mutierten Gliomen gibt.

Zusammenfassend zeigt unsere Studie, dass der derzeitige chirurgische Ansatz kritisch hinterfragt werden sollte und primär die Biopsie als chirurgische Behandlung in Erwägung gezogen werden sollte, vor allem bei Tumoren im Bereich der Mittellinie mit hochgradigem Verdacht auf eine H3 K27M-Mutation. Da ein größeres Resektionsausmaß keinen Überlebensvorteil bietet und ein höheres Risiko für schlechtere postoperative Ergebnisse birgt, profitieren Patient:innen in erster Linie von einer Minimierung ihrer präoperative und postoperative neurologische Defizite.

## 5. Zusammenfassung

H3 K27M-mutierte Gliome wurden erstmals 2016 als eigene Tumorentität der Gliome definiert. Aufgrund der besonderen Häufigkeit dieser bösartigen Tumorart haben sich bisherige Studien hauptsächlich auf das typische Erscheinungsbild dieser Tumoren bei Kindern und jungen Erwachsenen konzentriert, was den Bedarf an einem besseren Verständnis der prognostischen Faktoren und der Auswirkungen der Operation bei erwachsenen Patient:innen erhöht hat. Folglich berichten wir in der vorliegenden Studie über eine multizentrische Analyse dieser Tumorentität im Erwachsenenalter. Hierzu haben wir alle molekularbiologisch und histopathologisch gesicherten Fälle von H3 K27M-mutierten Gliomen bei Patient:innen über 18 Jahren eingeschlossen, die zwischen 2016 und 2022 eine neurochirurgische Operation erhielten. Für diese Patient:innen wurden dann die klinischen, radiologischen und chirurgischen Merkmale analysiert, und sowohl univariate als auch multivariate Analysen durchgeführt, um prognostische Faktoren zu herauszufinden. Die Studie umfasste hierbei insgesamt 70 Patient:innen mit einem Durchschnittsalter von 36,1 Jahren. Das mediane Gesamtüberleben betrug  $13,6 \pm 14$  Monate. Eine vollständige Resektion wurde bei 14,3% der Patienten erreicht, während bei 30% eine subtotale Resektion und bei 54,3% eine Biopsie durchgeführt wurden. In der Überlebensanalyse zeigte sich, dass vor allem Tumoren mit einer Lokalisation im Telenzephalon/Zwischenhirn/Myelenzephalon mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert waren, während hingegen eine Lage im Mesenzephalon/Metencephalon ein signifikant längeres Gesamtüberleben aufwies (8,7 vs. 25,0 Monate,  $p=0,007$ ). Darüber hinaus zeigte ein präoperativer Karnofsky-Performance-Score (KPS)  $< 80$  ein geringeres Gesamtüberleben (4,2 vs. 18 Monate,  $p=0,02$ ). Außerdem konnten wir feststellen, dass der Verlust von ATRX, der bei 25,7% der Patient:innen nachweisbar war, mit einer Verlängerung des Gesamtüberlebens assoziiert war (31 vs. 8,3 Monate,  $p=0,0029$ ).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Patient:innen, die sich einer Resektion unterzogen, keinen Überlebensvorteil gegenüber einer Biopsie nachwiesen (12 vs. 11 Monate,  $p=0,4006$ ). Unsere Ergebnisse zeigen zudem, dass der ATRX-Status, die Tumorlokalisierung und der KPS das Gesamtüberleben bei H3 K27M-mutierten Gliomen signifikant beeinflussen.



## 6. Summary

H3 K27M-mutated gliomas were first described as a distinct tumor entity in 2016. Due to the notable prevalence of this malignant tumor type, previous studies have primarily focused on their typical presentation in children and young adults, highlighting the need for a better understanding of prognostic factors and the impact of surgery in adult patients. Consequently, our study presents a multicenter analysis of this tumor entity in adults. We included all molecularly and histopathologically confirmed cases of H3 K27M-mutated gliomas in patients older 18 years who underwent neurosurgical procedures between 2016 and 2022. Clinical, radiological, and surgical features were analyzed for these patients, and both univariate and multivariate analyses were conducted to identify prognostic factors. The study comprised a total of 70 patients with an average age of 36.1 years. The median overall survival was  $13.6 \pm 14$  months. Complete resection was achieved in 14.3% of patients, while subtotal resection and biopsy were performed in 30% and 54.3% of cases, respectively.

Survival analysis revealed that tumors located in the telencephalon/diencephalon/myelencephalon were associated with poorer overall survival, whereas a location in the mesencephalon/metencephalon was significantly associated with a longer overall survival (8.7 vs. 25.0 months,  $p=0.007$ ). Additionally, a preoperative Karnofsky Performance Score (KPS)  $<80$  was associated with lower overall survival (4.2 vs. 18 months,  $p=0.02$ ). Furthermore, we found that the loss of ATRX, observed in 25.7% of patients, was independently associated with prolonged overall survival (31 vs. 8.3 months,  $p=0.0029$ ).

In summary, patients who underwent resection did not demonstrate a survival advantage over those who underwent biopsy (12 vs. 11 months,  $p=0.4006$ ). In addition, our results indicate that ATRX status, tumor localization, and KPS significantly influence overall survival (OS) in H3 K27M-mutated gliomas.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

|       |                                                         |
|-------|---------------------------------------------------------|
| 5-ALA | 5-aminolevulinic acid                                   |
| ALK-2 | Activin receptor-like kinase 2                          |
| ATRX  | Thalassemia/mental retardation syndrome X-linked        |
| CCNU  | Chloroethyl-cyclohexyl-nitrosourea                      |
| DAXX  | Death-domain associated protein                         |
| DMG   | Diffuses Mittelliniengliom                              |
| EZH1P | Enhancer of Zest Homologs Inhibitory Protein            |
| HGG   | Höher-gradiges Gliom                                    |
| ITS   | Intensivstation                                         |
| IDH   | Isocitrate dehydrogenase                                |
| IONM  | Intraoperatives Neuromonitoring                         |
| KPS   | Karnofsky Performance Score                             |
| MEP   | Motorisch evozierte Potenziale                          |
| MES   | Mesenchymal                                             |
| MGMT  | O <sup>6</sup> -methylguanine-methyltransferase         |
| MRT   | Magnetic Resonanztomografie                             |
| mt    | Mutant                                                  |
| OPC   | Oligodendrocyte-progenitor cells                        |
| SEP   | Somatosensorisch evozierte Potenziale                   |
| WHO   | World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation) |
| Wt    | Wild-type                                               |
| TERT  | Telomerase Reverse Transcriptase                        |

## 8. Literaturverzeichnis

Afflerbach, A.-K., Rohrandt, C., Brändl, B., Sönksen, M., Hench, J., Frank, S., Börnigen, D., Alawi, M., Mynarek, M., Winkler, B., Ricklefs, F., Synowitz, M., Dührsen, L., Rutkowski, S., Wefers, A. K., Müller, F.-J., Schoof, M., & Schüller, U. (2023). Classification of Brain Tumors by Nanopore Sequencing of Cell-Free DNA from Cerebrospinal Fluid. *Clinical Chemistry*, 70(1), 250–260. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvad115>

Antin, C., Tauziède-Espariat, A., Debily, M.-A., Castel, D., Grill, J., Pagès, M., Ayrault, O., Chrétien, F., Gareton, A., Andreiuolo, F., Lechapt, E., & Varlet, P. (2020). EZHIP is a specific diagnostic biomarker for posterior fossa ependymomas, group PFA and diffuse midline gliomas H3-WT with EZHIP overexpression. *Acta Neuropathologica Communications*, 8(1), 183. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-01056-8>

Argersinger, D. P., Rivas, S. R., Shah, A. H., Jackson, S., & Heiss, J. D. (2021). New Developments in the Pathogenesis, Therapeutic Targeting, and Treatment of H3K27M-Mutant Diffuse Midline Glioma. *Cancers*, 13(21), 5280. <https://doi.org/10.3390/cancers13215280>

Arrillaga-Romany, I., Chi, A. S., Allen, J. E., Oster, W., Wen, P. Y., & Batchelor, T. T. (2017). A phase 2 study of the first imipridone ONC201, a selective DRD2 antagonist for oncology, administered every three weeks in recurrent glioblastoma. *Oncotarget*, 8(45), 79298–79304. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17837>

Bender, S., Tang, Y., Lindroth, A. M., Hovestadt, V., Jones, D. T. W., Kool, M., Zapatka, M., Northcott, P. A., Sturm, D., Wang, W., Radlwimmer, B., Højfeldt, J. W., Truffaux, N., Castel, D., Schubert, S., Ryzhova, M., Şeker-Cin, H., Gronych, J., Johann, P. D., ... Pfister, S. M. (2013). Reduced H3K27me3 and DNA Hypomethylation Are Major Drivers of Gene Expression in K27M Mutant Pediatric High-Grade Gliomas. *Cancer Cell*, 24(5), 660–672. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.10.006>

Benitez-Ribas, D., Cabezón, R., Flórez-Grau, G., Molero, M. C., Puerta, P., Guillen, A., Paco, S., Carcaboso, A. M., Santa-Maria Lopez, V., Cruz, O., de Torres, C., Salvador, N., Juan, M., Mora, J., & La Madrid, A. M. (2018). Immune Response Generated With the Administration of Autologous Dendritic Cells Pulsed With an

Allogenic Tumoral Cell-Lines Lysate in Patients With Newly Diagnosed Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Frontiers in Oncology*, 8, 127. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00127>

Buczkowicz, P., Hoeman, C., Rakopoulos, P., Pajovic, S., Letourneau, L., Dzamba, M., Morrison, A., Lewis, P., Bouffet, E., Bartels, U., Zuccaro, J., Agnihotri, S., Ryall, S., Barszczyk, M., Chornenkyy, Y., Bourgey, M., Bourque, G., Montpetit, A., Cordero, F., ... Hawkins, C. (2014). Genomic analysis of diffuse intrinsic pontine gliomas identifies three molecular subgroups and recurrent activating ACVR1 mutations. *Nature Genetics*, 46(5), 451–456. <https://doi.org/10.1038/NG.2936>

Carvalho, D., Taylor, K. R., Olaciregui, N. G., Molinari, V., Clarke, M., Mackay, A., Ruddle, R., Henley, A., Valenti, M., Hayes, A., Brandon, A. D. H., Eccles, S. A., Raynaud, F., Boudhar, A., Monje, M., Popov, S., Moore, A. S., Mora, J., Cruz, O., ... Jones, C. (2019). ALK2 inhibitors display beneficial effects in preclinical models of ACVR1 mutant diffuse intrinsic pontine glioma. *Communications Biology*, 2, 156. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0420-8>

Castel, D., Philippe, C., Kergrohen, T., Sill, M., Merlevede, J., Barret, E., Puget, S., Sainte-Rose, C., Kramm, C. M., Jones, C., Varlet, P., Pfister, S. M., Grill, J., Jones, D. T. W., & Debily, M. A. (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. <https://doi.org/10.1186/S40478-018-0614-1>

Chakrabarti, I., Cockburn, M., Cozen, W., Wang, Y. P., & Preston-Martin, S. (2005). A population-based description of glioblastoma multiforme in Los Angeles County, 1974-1999. *Cancer*, 104(12), 2798–2806. <https://doi.org/10.1002/CNCR.21539>

Chi, A. S., Tarapore, R. S., Hall, M. D., Shonka, N., Gardner, S., Umemura, Y., Sumrall, A., Khatib, Z., Mueller, S., Kline, C., Zaky, W., Khatua, S., Weathers, S.-P., Odia, Y., Niazi, T. N., Daghistani, D., Cherrick, I., Korones, D., Karajannis, M. A., ... Mehta, M. P. (2019). Pediatric and adult H3 K27M-mutant diffuse midline glioma treated with the selective DRD2 antagonist ONC201. *Journal of Neuro-Oncology*, 145(1), 97–105. <https://doi.org/10.1007/s11060-019-03271-3>

Curran, C. S., & Kopp, J. B. (2021). PD-1 immunobiology in glomerulonephritis and renal cell carcinoma. *BMC Nephrology*, 22(1), 80. <https://doi.org/10.1186/s12882-021-02257-6>

Dono, A., Takayasu, T., Ballester, L. Y., & Esquenazi, Y. (2020). Adult diffuse midline gliomas: Clinical, radiological, and genetic characteristics. *Journal of Clinical Neuroscience : Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 82(Pt A), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2020.10.005>

Dyer, M. A., Qadeer, Z. A., Valle-Garcia, D., & Bernstein, E. (2017). ATRX and DAXX: Mechanisms and Mutations. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(3), a026567. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026567>

Ebrahimi, A., Skardelly, M., Bonzheim, I., Ott, I., Mühleisen, H., Eckert, F., Tabatabai, G., & Schittenhelm, J. (2016). ATRX immunostaining predicts IDH and H3F3A status in gliomas. *Acta Neuropathologica Communications*, 4(1), 60. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0331-6>

Findlay, I. J., De Iuliis, G. N., Duchatel, R. J., Jackson, E. R., Vitanza, N. A., Cain, J. E., Waszak, S. M., & Dun, M. D. (2022). Pharmaco-proteogenomic profiling of pediatric diffuse midline glioma to inform future treatment strategies. *Oncogene*, 41(4), 461–475. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-02102-y>

Fu, Y., Yang, M., Yu, H., Wang, Y., Wu, X., Yong, J., Mao, Y., Cui, Y., Fan, X., Wen, L., Qiao, J., & Tang, F. (2021). Heterogeneity of glial progenitor cells during the neurogenesis-to-gliogenesis switch in the developing human cerebral cortex. *Cell Reports*, 34(9), 108788. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108788>

Gallitto Ba, M., Lazarev, S., Wasserman Mph, I., Stafford Phd, J. M., Wolden, S. L., Terezakis, S. A., Bindra, R. S., & Bakst, R. L. (2019). Critical Review Role of Radiation Therapy in the Management of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma: A Systematic Review. *Adv Radiat Oncol*, 4(3), 520–531. <https://doi.org/10.1016/j.adro.2019.03.009>

Garon, E. B., Rizvi, N. A., Hui, R., Leighl, N., Balmanoukian, A. S., Eder, J. P., Patnaik, A., Aggarwal, C., Gubens, M., Horn, L., Carcereny, E., Ahn, M.-J., Felip, E., Lee, J.-S., Hellmann, M. D., Hamid, O., Goldman, J. W., Soria, J.-C., Dolled-Filhart, M., ... Gandhi, L. (2015). Pembrolizumab for the Treatment of Non–Small-Cell Lung

Cancer. *New England Journal of Medicine*, 372(21), 2018–2028.  
<https://doi.org/10.1056/nejmoa1501824>

Gessi, M., Gielen, G. H., Dreschmann, V., Waha, A., & Pietsch, T. (2015). High frequency of H3F3A K27M mutations characterizes pediatric and adult high-grade gliomas of the spinal cord. *Acta Neuropathologica*, 130(3), 435–437.  
<https://doi.org/10.1007/s00401-015-1463-7>

Gong, X., Kuang, S., Deng, D., Wu, J., Zhang, L., & Liu, C. (2023). Differences in survival prognosticators between children and adults with H3K27M-mutant diffuse midline glioma. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 29(12), 3863–3875.  
<https://doi.org/10.1111/cns.14307>

Hara, T., Chanoch-Myers, R., Mathewson, N. D., Myskiw, C., Atta, L., Bussema, L., Eichhorn, S. W., Greenwald, A. C., Kinker, G. S., Rodman, C., Gonzalez Castro, L. N., Wakimoto, H., Rozenblatt-Rosen, O., Zhuang, X., Fan, J., Hunter, T., Verma, I. M., Wucherpennig, K. W., Regev, A., ... Tirosh, I. (2021). Interactions between cancer cells and immune cells drive transitions to mesenchymal-like states in glioblastoma. *Cancer Cell*, 39(6), 779-792.e11.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.05.002>

Harutyunyan, A. S., Krug, B., Chen, H., Papillon-Cavanagh, S., Zeinieh, M., De Jay, N., Deshmukh, S., Chen, C. C. L., Belle, J., Mikael, L. G., Marchione, D. M., Li, R., Nikbakht, H., Hu, B., Cagnone, G., Cheung, W. A., Mohammadnia, A., Bechet, D., Faury, D., ... Majewski, J. (2019). H3K27M induces defective chromatin spread of PRC2-mediated repressive H3K27me2/me3 and is essential for glioma tumorigenesis. *Nature Communications*, 10(1262). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09140-x>

Hennika, T., Hu, G., Olaciregui, N. G., Barton, K. L., Ehteda, A., Chitranjan, A., Chang, C., Gifford, A. J., Tsoi, M., Ziegler, D. S., Carcaboso, A. M., & Becher, O. J. (2017). Pre-Clinical Study of Panobinostat in Xenograft and Genetically Engineered Murine Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Models. *PloS One*, 12(1), e0169485–e0169485. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169485>

Herrlinger, U., Tzaridis, T., Mack, F., Steinbach, J. P., Schlegel, U., Sabel, M., Hau, P., Kortmann, R.-D., Krex, D., Grauer, O., Goldbrunner, R., Schnell, O., Bähr, O., Uhl, M., Seidel, C., Tabatabai, G., Kowalski, T., Ringel, F., Schmidt-Graf, F., ... Glas,

M. (2019). Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CeTeG/NOA-09): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*, 393(10172), 678–688. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)31791-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(18)31791-4)

Huang, W., Bhaduri, A., Velmeshev, D., Wang, S., Wang, L., Rottkamp, C. A., Alvarez-Buylla, A., Rowitch, D. H., & Kriegstein, A. R. (2020). Origins and Proliferative States of Human Oligodendrocyte Precursor Cells. *Cell*, 182(3), 594-608.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.027>

Jain, S. U., Rashoff, A. Q., Krabbenhoft, S. D., Hoelper, D., Do, T. J., Gibson, T. J., Lundgren, S. M., Bondra, E. R., Deshmukh, S., Harutyunyan, A. S., Juretic, N., Jabado, N., Harrison, M. M., & Lewis, P. W. (2020). H3 K27M and EZHIP Impede H3K27-Methylation Spreading by Inhibiting Allosterically Stimulated PRC2. *Molecular Cell*, 80(4), 726-735.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.09.028>

Jiao, L., & Liu, X. (2015). Structural basis of histone H3K27 trimethylation by an active polycomb repressive complex 2. *Science*, 350(6258). [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAC4383/SUPPL\\_FILE/JIAO.SM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAC4383/SUPPL_FILE/JIAO.SM.PDF)

Khuong-Quang, D.-A., Buczkowicz, P., Rakopoulos, P., Liu, X.-Y., Fontebasso, A. M., Bouffet, E., Bartels, U., Albrecht, S., Schwartzentruber, J., Letourneau, L., Bourgey, M., Bourque, G., Montpetit, A., Bourret, G., Lepage, P., Fleming, A., Lichter, P., Kool, M., von Deimling, A., ... Hawkins, C. (2012). K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathologica*, 124(3), 439–447. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-0998-0>

Kleinschmidt-DeMasters, B. K., & Mulcahy Levy, J. M. (2018). H3 K27M-mutant gliomas in adults vs. children share similar histological features and adverse prognosis. *Clinical Neuropathology*, 37 (2018)(2), 53–63. <https://doi.org/10.5414/NP301085>

Kline, C., Liu, S. J., Duriseti, S., Banerjee, A., Nicolaides, T., Raber, S., Gupta, N., Haas-Kogan, D., Braunstein, S., & Mueller, S. (2018). Reirradiation and PD-1 inhibition with nivolumab for the treatment of recurrent diffuse intrinsic pontine

glioma: a single-institution experience. *Journal of Neuro-Oncology*, 140(3), 629–638. <https://doi.org/10.1007/s11060-018-2991-5>

Lai, A., Kharbanda, S., Pope, W. B., Tran, A., Solis, O. E., Peale, F., Forrest, W. F., Pujara, K., Carrillo, J. A., Pandita, A., Ellingson, B. M., Bowers, C. W., Soriano, R. H., Schmidt, N. O., Mohan, S., Yong, W. H., Seshagiri, S., Modrusan, Z., Jiang, Z., ... Phillips, H. S. (2011). Evidence for sequenced molecular evolution of IDH1 mutant glioblastoma from a distinct cell of origin. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(34), 4482–4490. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.8715>

Lewis, P. W., Müller, M. M., Koletsky, M. S., Cordero, F., Lin, S., Banaszynski, L. A., Garcia, B. A., Muir, T. W., Becher, O. J., & David Allis, C. (2013). Inhibition of PRC2 Activity by a Gain-of-Function H3 Mutation Found in Pediatric Glioblastoma. *Science*, 340(6134), 857–861. <https://doi.org/10.1126/science.1232245>

Liu, I., Jiang, L., Samuelsson, E. R., Salas, S. M., Beck, A., Hack, O. A., Jeong, D., Shaw, M. L., Englinger, B., Labelle, J., Mire, H. M., Madlener, S., Mayr, L., Quezada, M. A., Trissal, M., Panditharatna, E., Ernst, K. J., Vogelzang, J., Gatesman, T. A., & Filbin, M. G. (2022). The landscape of tumor cell states and spatial organization in H3-K27M mutant diffuse midline glioma across age and location. *Isabel Arrillaga-Romany*, 54, 20. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01236-3>

Liu, J., Zhang, X., Yan, X., Sun, M., Fan, Y., & Huang, Y. (2019). Significance of TERT and ATRX mutations in glioma. *Oncology Letters*, 17(1), 95–102. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9634>

Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. In *Acta Neuropathologica* (Vol. 131, Issue 6, pp. 803–820). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>

Lu, V. M., Alvi, M. A., McDonald, K. L., & Daniels, D. J. (2019). Impact of the H3K27M mutation on survival in pediatric high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics*, 23(3), 308–316. <https://doi.org/10.3171/2018.9.peds18419>



- Luke, J. J., Flaherty, K. T., Ribas, A., & Long, G. V. (2017). Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14(8), 463–482. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.43>
- Mackay, A., Burford, A., Carvalho, D., Izquierdo, E., Fazal-Salom, J., Taylor, K. R., Bjerke, L., Clarke, M., Vinci, M., Nandhabalan, M., Temelso, S., Popov, S., Molinari, V., Raman, P., Waanders, A. J., Han, H. J., Gupta, S., Marshall, L., Zacharoulis, S., ... Jones, C. (2017). Integrated Molecular Meta-Analysis of 1,000 Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell*, 32(4), 520-537.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.08.017>
- Majzner, R. G., Ramakrishna, S., Yeom, K. W., Patel, S., Chinnasamy, H., Schultz, L. M., Richards, R. M., Jiang, L., Barsan, V., Mancusi, R., Geraghty, A. C., Good, Z., Mochizuki, A. Y., Gillespie, S. M., Toland, A. M. S., Mahdi, J., Reschke, A., Nie, E. H., Chau, I. J., ... Monje, M. (2022). GD2-CAR T cell therapy for H3K27M-mutated diffuse midline gliomas. *Nature*, 603(7903), 934–941. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04489-4>
- Margueron, R., & Reinberg, D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*, 469(7330), 343–349. <https://doi.org/10.1038/NATURE09784>
- Marques, S., Zeisel, A., Codeluppi, S., van Bruggen, D., Mendanha Falcão, A., Xiao, L., Li, H., Häring, M., Hochgerner, H., Romanov, R. A., Gyllborg, D., Muñoz Manchado, A., La Manno, G., Lönnerberg, P., Floriddia, E. M., Rezayee, F., Ernfors, P., Arenas, E., Hjerling-Leffler, J., ... Castelo-Branco, G. (2016). Oligodendrocyte heterogeneity in the mouse juvenile and adult central nervous system. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6291), 1326–1329. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6463>
- Monje, M., Mitra, S. S., Freret, M. E., Raveh, T. B., Kim, J., Masek, M., Attema, J. L., Li, G., Haddix, T., Edwards, M. S. B., Fisher, P. G., Weissman, I. L., Rowitch, D. H., Vogel, H., Wong, A. J., & Beachy, P. A. (2011). Hedgehog-responsive candidate cell of origin for diffuse intrinsic pontine glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(11), 4453–4458. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101657108>
- Mount, C. W., & Majzner, R. G. (2018). Diffuse intrinsic pontine glioma (DIPG) and other diffuse midline gliomas (DMGs) with mutated histone H3 K27M (H3-K27M). *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0006-x>

Nagaraja, S., Quezada, M. A., Gillespie, S. M., Arzt, M., Lennon, J. J., Woo, P. J., Hovestadt, V., Kambhampati, M., Filbin, M. G., Suva, M. L., Nazarian, J., & Monje, M. (2019). Histone Variant and Cell Context Determine H3K27M Reprogramming of the Enhancer Landscape and Oncogenic State. *Molecular Cell*, 76(6), 965-980.e12. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.08.030>

Neftel, C., Laffy, J., Filbin, M. G., Hara, T., Shore, M. E., Rahme, G. J., Richman, A. R., Silverbush, D., Shaw, M. L., Hebert, C. M., Dewitt, J., Gritsch, S., Perez, E. M., Gonzalez Castro, L. N., Lan, X., Druck, N., Rodman, C., Dionne, D., Kaplan, A., ... Suvà, M. L. (2019). An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma. *Cell*, 178(4), 835-849.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.06.024>

Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Farah, P., Ondracek, A., Chen, Y., Wolinsky, Y., Stroup, N. E., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2013). CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro-Oncology*, 15 Suppl 2(Suppl 2). <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOT151>

Schmitt, M. J., Company, C., Dramaretska, Y., Barozzi, I., Göhrig, A., Kertalli, S., Großmann, M., Naumann, H., Sanchez-Bailon, M. P., Hulsman, D., Glass, R., Squatrito, M., Serresi, M., & Gargiulo, G. (2021). Phenotypic Mapping of Pathologic Cross-Talk between Glioblastoma and Innate Immune Cells by Synthetic Genetic Tracing. *Cancer Discovery*, 11(3), 754–777. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0219>

Schreck, K. C., Ranjan, S., Skorupan, N., Bettegowda, C., Eberhart, C. G., Ames, H. M., & Holdhoff, M. (2019). Incidence and clinicopathologic features of H3 K27M mutations in adults with radiographically-determined midline gliomas. *Journal of Neuro-Oncology*, 143(1), 87–93. <https://doi.org/10.1007/s11060-019-03134-x>

Schulte, J. D., Buerki, R. A., Lapointe, S., Molinaro, A. M., Zhang, Y., Villanueva-Meyer, J. E., Perry, A., Phillips, J. J., Tihan, T., Bollen, A. W., Pekmezci, M., Butowski, N., Oberheim Bush, N. A., Taylor, J. W., Chang, S. M., Theodosopoulos, P., Aghi, M. K., Hervey-Jumper, S. L., Berger, M. S., ... Clarke, J. L. (2020). Clinical, radiologic, and genetic characteristics of histone H3 K27M-mutant diffuse midline

gliomas in adults. *Neuro-Oncology Advances*, 2(1), vdaa142–vdaa142. <https://doi.org/10.1093/noajnl/vdaa142>

Stupp, R., Hegi, M. E., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Taphoorn, M. J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., Hau, P., Brandes, A. A., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C. J., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., ... Mirimanoff, R. O. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet Oncology*, 10(5), 459–466. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70025-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70025-7)

Tate, M. C., Lindquist, R. A., Nguyen, T., Sanai, N., Barkovich, A. J., Huang, E. J., Rowitch, D. H., & Alvarez-Buylla, A. (2015). Postnatal Growth of the Human Pons: A Morphometric and Immunohistochemical Analysis. *J Comp Neurol*, 523(3), 449–462. <https://doi.org/10.1002/cne.23690>

Taylor, K. R., Mackay, A., Truffaux, N., Butterfield, Y., Morozova, O., Philippe, C., Castel, D., Grasso, C. S., Vinci, M., Carvalho, D., Carcaboso, A. M., de Torres, C., Cruz, O., Mora, J., Entz-Werle, N., Ingram, W. J., Monje, M., Hargrave, D., Bullock, A. N., ... Grill, J. (2014). Recurrent activating ACVR1 mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nature Genetics*, 46(5), 457–461. <https://doi.org/10.1038/ng.2925>

Thust, S., Micallef, C., Okuchi, S., Brandner, S., Kumar, A., Mankad, K., Wastling, S., Mancini, L., Jäger, H. R., & Shankar, A. (2021). Imaging characteristics of H3 K27M histone-mutant diffuse midline glioma in teenagers and adults. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, 11(1), 43–56. <https://doi.org/10.21037/qims-19-954>

Venneti, S., Kawakibi, A. R., Ji, S., Waszak, S. M., Sweha, S. R., Mota, M., Pun, M., Deogharkar, A., Chung, C., Tarapore, R. S., Ramage, S., Chi, A., Wen, P. Y., Arrillaga-Romany, I., Batchelor, T. T., Butowski, N. A., Sumrall, A., Shonka, N., Harrison, R. A., ... Koschmann, C. (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), 2370–2393. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-23-0131>

Vitanza, N. A., Biery, M. C., Myers, C., Ferguson, E., Zheng, Y., Girard, E. J., Przystal, J. M., Park, G., Noll, A., Pakiam, F., Winter, C. A., Morris, S. M., Sarthy, J.,

Cole, B. L., Leary, S. E. S., Crane, C., Lieberman, N. A. P., Mueller, S., Nazarian, J., ... Olson, J. M. (2021). Optimal therapeutic targeting by HDAC inhibition in biopsy-derived treatment-naïve diffuse midline glioma models. *Neuro-Oncology*, 23(3), 376–386. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa249>

Vuong, H. G., Le, H. T., Ngo, T. N. M., Fung, K.-M., Battiste, J. D., McNall-Knapp, R., & Dunn, I. F. (2021). H3K27M-mutant diffuse midline gliomas should be further molecularly stratified: an integrated analysis of 669 patients. *Journal of Neuro-Oncology*, 155(3), 225–234. <https://doi.org/10.1007/s11060-021-03890-9>

Wang, Y., Feng, L.-L., Ji, P.-G., Liu, J.-H., Guo, S.-C., Zhai, Y.-L., Sankey, E. W., Wang, Y., Xue, Y.-R., Wang, N., Lou, M., Xu, M., Chao, M., Gao, G.-D., Qu, Y., Gong, L., & Wang, L. (2021). Clinical Features and Molecular Markers on Diffuse Midline Gliomas With H3K27M Mutations: A 43 Cases Retrospective Cohort Study. *Frontiers in Oncology*, 10, 602553. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.602553>

Xu-Monette, Z. Y., Zhou, J., & Young, K. H. (2018). PD-1 expression and clinical PD-1 blockade in B-cell lymphomas. *Blood*, 131(1), 68–83. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-07-740993>

Zheng, L., Gong, J., Yu, T., Zou, Y., Zhang, M., Nie, L., Chen, X., Yue, Q., Liu, Y., Mao, Q., Zhou, Q., & Chen, N. (2022). Diffuse Midline Gliomas With Histone H3 K27M Mutation in Adults and Children: A Retrospective Series of 164 Cases. *The American Journal of Surgical Pathology*, 46(6), 863–871. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001897>

## Neuro-Oncology

XX(XX), 1–15, 2024 | <https://doi.org/10.1093/neuonc/noae061> | Advance Access date 20 March 2024

1

## Insights from a multicenter study on adult H3 K27M-mutated glioma: Surgical resection's limited influence on overall survival, ATRX as molecular prognosticator

Alice Ryba<sup>✉</sup>, Zeynep Özdemir, Nitzan Nissimov, Lisa Hönikl, Nicolas Neidert, Martin Jakobs, Darius Kalasauskas, Aleksandrs Krigers, Claudius Thomé, Christian F Freyschlag, Florian Ringel, Andreas Unterberg, Philip Dao Trong, Jürgen Beck, Dieter Henrik Heiland, Bernhard Meyer, Peter Vajkoczy, Julia Onken, Walter Stummer<sup>✉</sup>, Eric Suero Molina, Jens Gempt, Manfred Westphal<sup>✉</sup>, Ulrich Schüller<sup>✉</sup>, and Malte Mohme<sup>✉</sup>

All author affiliations are listed at the end of the article

**Corresponding Author:** Malte Mohme, FEBNS, Department of Neurosurgery, Laboratory for Brain Tumor Biology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20253 Hamburg, Germany ([m.mohme@uke.de](mailto:m.mohme@uke.de)).

## Abstract

**Background.** H3 K27M-mutated gliomas were first described as a new grade 4 entity in the 2016 World Health Organization classification. Current studies have focused on its typical appearance in children and young adults, increasing the need to better understand the prognostic factors and impact of surgery on adults. Here, we report a multicentric study of this entity in adults.

**Methods.** We included molecularly confirmed H3 K27M-mutated glioma cases in patients  $\geq 18$  years diagnosed between 2016 and 2022. Clinical, radiological, and surgical features were analyzed. Univariate and multivariate analyses were performed to identify prognostic factors.

**Results.** Among 70 patients with a mean age of 36.1 years, the median overall survival (OS) was  $13.6 \pm 14$  months. Gross-total resection was achieved in 14.3% of patients, whereas 30% had a subtotal resection and 54.3% a biopsy. Tumors located in telencephalon/diencephalon/myelencephalon were associated with a poorer OS, while a location in the mesencephalon/metencephalon showed a significantly longer OS (8.7 vs. 25.0 months,  $P = .007$ ). Preoperative Karnofsky-Performance Score (KPS)  $\leq 80$  showed a reduced OS (4.2 vs. 18 months,  $P = .02$ ). Furthermore, ATRX loss, found in 25.7%, was independently associated with an increased OS (31 vs. 8.3 months,  $P = .0029$ ). Notably, patients undergoing resection showed no survival benefit over biopsy (12 vs. 11 months,  $P = .4006$ ).

**Conclusions.** The present study describes surgical features of H3 K27M-mutated glioma in adulthood in a large multicentric study. Our data reveal that ATRX status, location and KPS significantly impact OS in H3 K27M-mutated glioma. Importantly, our dataset indicates that resection does not offer a survival advantage over biopsy.

## Key Points

- Greater extent of resection did not improve survival in H3 K27M-mutated glioma.
- Tumors located in mesencephalon or metencephalon show longer survival.
- Nuclear loss of ATRX was highly associated with better survival.

H3 K27M-mutated gliomas are among the most malignant intrinsic brain tumors and have only recently been distinguished from the CNS-World Health Organization (WHO) grade 4 glioblastoma group due to their unique molecular signature. Subsequently, H3 K27M-mutated gliomas were reclassified as a separate tumor entity in the 2016 WHO classification

of tumors of the central nervous system. Here, H3 K27M-mutated gliomas are defined by the following features: (1) infiltrative lesion primarily located in the midline structures and (2) the presence of a H3 K27M mutation.<sup>1</sup>

In these cases, making up 70% of H3 K27M-altered cases, a mutation is found in the H3F3A gene or, less frequently, in

### Importance of the Study

Our study identified clinical and molecular prognostic parameters for the overall survival of H3 K27M-mutated glioma in adults, including tumor location, pre- and post-operative Karnofsky grading. Furthermore, our study

critically discusses the impact of surgical resection and offers a new insight into how far a surgical resection is beneficial in this rare and only recently defined tumor entity in adults.

HIST1H3B/C2 genes.<sup>2-38</sup> This somatic heterozygous mutation leads to a lysine-to-methionine substitution resulting in a global loss of trimethylation and an enhancement of H3 K27 acetylation, which is associated with an upregulation of proto-oncogenes and suppression of cellular differentiation leading to aggressive proliferation.<sup>5,6</sup> Furthermore, since the 2021 WHO classification update, the term H3 K27M-mutated tumors has been expanded to “H3 K27M-altered tumors.” Within this category, up to 15% of the cases of diffuse midline glioma exhibit a H3F3A wild type. However, these cases are marked by an overexpression of Enhancer of Zest Homologs Inhibitory Protein resulting in loss of H3 K27M trimethylation with equal biological effects and tumor characteristics.<sup>7-9</sup>

H3 K27M-mutated glioma occurs predominantly in children and young adults, accounting for nearly 20% of all childhood brain tumors. Here, they are uniformly associated with an invariably poor prognosis and show a median overall survival (OS) of 10–14 months.<sup>10,11</sup> Considering that these tumors typically arise in midline structures with a diffuse, infiltrative growth pattern, gross-total resection is typically impossible to achieve. Radiotherapy is a fundamental component of adjuvant treatment after surgical treatment, with a recommended dose of 54 to 60 Gy administered over 6 weeks most often in combination with a chemotherapeutic agent. However, to date, combinations of radio- and different chemotherapies have also not led to improved outcome.

Due to an increase in molecular pathologic analysis in the daily routine and integration of H3 K27M staining, it has become apparent that this tumor entity also occurs in adults. Nonetheless, after many large studies focusing exclusively on pediatric cases of this tumor entity, the clinical behavior in adults remains unclear, especially compared to their pediatric counterparts and H3 wild-type gliomas. To date, adult H3 K27M-mutated gliomas have been treated as aggressively as pediatric gliomas, namely by extensive resection followed by combined radio-chemotherapy.

The present study aimed to identify prognostic factors and potential clinical subgroups of all H3 K27M-mutated cerebral gliomas in adults.

## Materials and Methods

### Study Cohort

We retrospectively collected all adult intracranial gliomas harboring a H3 K27M mutation ( $n = 70$ ), who received surgical treatment at a total of 8 different neurosurgical centers in Germany and Austria between 2016 and 2022.

Patients were identified by positivity for H3 K27M antibody staining using immunohistochemistry with monoclonal Anti-Histone H3 (K27M mutant) antibodies (rabbit monoclonal clone RM192, RevMAB Biosciences, San Francisco) regardless of midline involvement. The minimum age at time of initial diagnosis was set to 18 years. Additionally, we included all available pediatric patients (under 18 years;  $n = 17$ ) as a representative group for comparison with our adult cohort (Supplementary Table 1). The study was approved by the medical ethics committee of the Hamburg chamber of physicians (2023-300382-WF) and performed in accordance with the hospital regulations of Hamburg, as well as the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from all patients.

### Patient Characteristics

Patient demographics and characteristics were retrospectively obtained from the hospital records. The clinical features analyzed were divided into preoperative and post-operative presentations. For the preoperative characteristics, we analyzed Karnofsky-Performance Score (KPS), age, gender, and the occurrence of various clinical symptoms such as nausea/vomiting, headache, hemiparesis, and seizures. For postoperative characteristics, we further analyzed KPS, length of stay at intensive-care units (ICU), and incidence of clinical deficits. We also considered the adjuvant therapies used, which were divided into combined radio-chemotherapy and standalone radiation therapy or chemotherapy with temozolomide. The median follow-up was 9.8 months (range: 0–63.8). A total of 15 (21.4%) patients were lost to follow-up after surgery. Additionally, 9 patients (12.8%) were still alive and their median follow-up time was 23.1 months (range: 7–40).

### Surgical Parameters

The following surgical features were analyzed: Extent of resection (EOR), surgical approach including positioning, histopathological results of intraoperative cryosections, and the use of intraoperative tools, including neuronavigation, intraoperative neuromonitoring (IONM) and fluorescent guidance. Patient positioning was divided into prone, supine, and lateral position. Surgical approaches were further divided into 5 groups: (1) suboccipital, (2) retrosigmoidal, (3) paramedian, (4) convexity, and (5) biopsy including frame-based stereotactic and neuronavigation-guided needle biopsies. The EOR was assessed by using postoperative radiographic imaging to measure volumetrics of the postoperative residual tumor



and was then classified into gross-total resection (GTR; <5% residual), subtotal resection (STR; >5% residual), and biopsy. The results of intraoperative cryosections were subdivided into high-grade glioma, low-grade glioma, and no tumor. IONM was subdivided into cortical mapping, motor evoked potentials, and somatosensory evoked potentials. The fluorescent agent used was 5-aminolevulinic acid (5-ALA).

### Radiographic Analysis

On radiographic magnetic resonance imaging (MRI), we analyzed tumor location, volume, and midline involvement including the extent of midline shift, the size of edema, ventricular involvement of the tumor, and the presence of contrast enhancement (CE). Tumor location was divided into 5 main groups: (1) telencephalon (including frontal, parietal, temporal, and occipital lobes), (2) diencephalon (thalamus and basal ganglia), (3) mesencephalon, (4) metencephalon (pons and cerebellum), and (5) myelencephalon. A unified study protocol was compiled, where volumetric measurements were clearly defined. Herein, the tumor volume was calculated using the approximation formula ( $a \times b \times c/2$ ), where  $a$ ,  $b$ , and  $c$  represents tumor length, width, and height. An approximation of the extent of peritumoral edema was quantified from T2-weighted MRI sequences, then subtracted from the extent of the tumor and finally calculated with the above formula. The residual tumor volume was assessed on MRIs, performed within 72 hours after resection, by comparing T1-weighted images with and without CE.

### Neuropathological Analysis

The current study included only patients with proven H3 K27M mutation and isocitrate dehydrogenase (IDH)-wild-type status in immunohistochemistry. Furthermore, the following histopathological and molecular tumor features were analyzed: O6-methylguanine-methyltransferase (MGMT) status, alpha-thalassemia/mental retardation syndrome X-linked (ATRX) status, and DNA-methylation analysis (450 k or 850 k) with its molecular subclass and classifier score when available.

### Statistical Analysis

Univariate and multivariate analyses were then performed to identify prognostic factors using GraphPad Prism 9 software. An unpaired 2-tailed Student's  $t$ -test was used to analyze continuous scale data, and 2 group comparison was performed with the 2-sided Fisher's exact test. Multivariate analysis was done on significant factors using multivariate Cox proportional hazards models and significance testing ( $\alpha = 0.05$ ). Overall survival was analyzed using the Kaplan–Meier method. The log-rank test was used to perform univariate assessments of Kaplan–Meier plots. The progression-free survival (PFS) was calculated from the time of first intervention.  $P$  values were considered significant when  $< .05$ .

## Results

A total of 70 adult patients with H3 K27M-mutated glioma underwent surgery between February 10, 2016 and October 18, 2022. Their characteristics are summarized in Table 1. The clinical presentation included nausea and vomiting (30%,  $n = 21$ ), headache (43.5%,  $n = 30$ ), hemiparesis (30%,  $n = 21$ ), seizures (4.3%,  $n = 3$ ), and cranial nerve palsies (37.2%,  $n = 26$ ; Table 1).

The median overall survival (OS) was  $13.6 \pm 14.2$  months. A total of 44 (62.8%) patients died as a consequence of the progression of their underlying oncological disease during our follow-up. Statistical analysis of survival testing is summarized in Table 2.

The most frequent location of H3 K27M-mutated glioma was diencephalon ( $n = 38$ , 54.3%) subdivided into thalamus and basal ganglia followed by metencephalon ( $n = 12$ , 17.1%), including pons and cerebellum (Figure 1A). Other locations included the mesencephalon ( $n = 10$ , 14.3%), myelencephalon ( $n = 6$ , 8.6%), and telencephalon ( $n = 4$ , 5.7%). However, pediatric H3 K27M-mutated gliomas were most frequently located in the metencephalon with 68.8 ( $n = 11$ ; Supplementary Table 1). Most H3 K27M-mutated glioma cases showed a location involving the midline (84.3%,  $n = 59$ ). The median age at initial diagnosis was 33 years (range: 18–64), and the female-to-male ratio was 1:1.4 (female 41.4%; male 58.6%; Figure 1B). Tumor location was found to vary with age, such that tumors in the telencephalon or diencephalon had a significantly lower mean age than tumors in the myelencephalon (Figure 1C). Tumors located in telencephalon/diencephalon/myelencephalon were associated with poor OS, whereas location in the mes-/metencephalon had a significantly better OS (8.7 vs. 25 months,  $P = .007$ ; Figure 1D and 1E).

On MRI analysis, H3 K27M-mutated gliomas showed a heterogeneous appearance (Figure 2A). CE on MRI was present in most of the cases (77.1%,  $n = 54$ ; Figure 2B). Obstructive hydrocephalus was observed in almost half of the patients ( $n = 31$ , 44.3%; Figure 2C). Most H3 K27M-mutated glioma cases showed a location involving the midline (84.3%,  $n = 59$ ). The mean approximated tumor volume was  $12.2 \pm 13.1$  cm<sup>3</sup> and mean volume of edema reached  $10.4 \pm 13.1$  cm<sup>3</sup>. This measurement protocol was consistently applied across all participating centers. Furthermore, tumors with a cystic component were associated with a survival benefit compared to non-cystic lesions independent of age and location (23 vs. 5 months,  $P = .0046$ ).

Half of the cases were operated via a supratentorial transcortical approach (50%,  $n = 35$ ), followed by 20% of frame-based stereotactic or neuronavigation-guided biopsies ( $n = 14$ ), 15.7% of suboccipital approaches ( $n = 11$ ), 8.6% of interhemispheric approaches ( $n = 6$ ) and 4.3% of retrosigmoidal approaches ( $n = 3$ ; Figure 3A). The most frequently used patient positioning in this tumor entity was a supine position (58.6%,  $n = 41$ ), followed by prone (25.7%,  $n = 18$ ) and lateral position (4.3%,  $n = 3$ ). Neuronavigation was used in 62.8% ( $n = 44$ ) of all cases, whereas fluorescent guidance was used in 21.4% ( $n = 15$ ) of cases (Figure 3B). In addition, intraoperative neuromonitoring (IONM)

Table 1. Patient and Tumor Characteristics

| Clinical data                         |               | Surgical data                  |               |
|---------------------------------------|---------------|--------------------------------|---------------|
| At admission                          |               | Patient positioning–n (%)      |               |
| Age (years)–median (range)            | 33 (18–64)    | Supine                         | 41 (58.6)     |
| Gender–n (%)                          |               | Prone                          | 18 (25.7)     |
| Female                                | 29 (41.4)     | Lateral                        | 3 (4.3)       |
| Male                                  | 41 (58.6)     | Surgical procedure–n (%)       |               |
| Nausea/Vomiting–n (%)                 | 21 (30)       | Biopsy                         | 38 (55.7)     |
| Headache–n (%)                        | 30 (43.5)     | Resection                      | 26 (37.1)     |
| Hemiparesis–n (%)                     | 21 (30)       | Both                           | 5 (7.1)       |
| Seizures–n (%)                        | 3 (4.3)       | Approach–n (%)                 |               |
| Cranial Nerve Palsy–n (%)             | 26 (37.2)     | Suboccipital                   | 11 (15.7)     |
| Preoperative KPS–mean (SD)            | 80.43 ± 19.59 | Retrosigmoidal                 | 3 (4.3)       |
|                                       |               | Paramedian                     | 6 (8.6)       |
| After Surgery                         |               | Convexity                      | 35 (50)       |
| Neurological Deficits–n (%)           | 26 (37.1)     | Stereotaxy/Varioguide          | 14 (20)       |
| New Neurological Deficits–n (%)       | 8 (11.4)      | EOR–n (%)                      |               |
| Hemiparesis after surgery–n (%)       | 23 (32.9)     | GTR                            | 10 (14.3)     |
| Length of ICU stay (d)–mean (SD)      | 4.367 ± 8.622 | STR                            | 21 (30)       |
| Postoperative KPS–median (SD)         | 79.09 ± 22.22 | Biopsy                         | 38 (54.3)     |
| Follow-up                             |               | IONM–n (%)                     |               |
| Follow-up (months)–median (range)     | 9.8 (0–63.8)  | Total                          | 24 (34.3)     |
| Recurrence–n (%)                      | 53 (75.7)     | Cortical mapping               | 7 (10)        |
| Progression-free survival–median (SD) | 7.557 ± 8.004 | MEP                            | 23 (32.8)     |
| Death–n (%)                           | 44 (62.8)     | SEP                            | 18 (25.7)     |
| Overall survival–median (SD)          | 13.62 ± 14.23 |                                |               |
|                                       |               | Navigation–n (%)               | 44 (62.8)     |
| Radiographic data                     |               | Fluorescence, e.g. 5-ALA–n (%) | 15 (21.4)     |
| Localization–n (%)                    |               | Awake surgery–n (%)            | 0 (0)         |
| Telencephalon                         | 4 (5.7)       |                                |               |
| Frontal Lobe                          | 3 (4.3)       | Histological data              |               |
| Parietal Lobe                         | 1 (1.4)       | Results of Cyro Section–n (%)  |               |
| Temporal Lobe                         | 0 (0)         | High-grade glioma              | 23 (32.9)     |
| Diencephalon                          | 38 (54.3)     | Low-grade glioma               | 9 (12.8)      |
| Thalamic                              | 36 (51.4)     | No Tumor                       | 3 (4.3)       |
| Basal ganglia                         | 2 (2.9)       | Unknown                        | 35 (50)       |
| Mesencephalon                         | 10 (14.3)     | MGMT–n (%)                     |               |
| Metencephalon                         | 12 (17.1)     | methyalted                     | 9 (12.8)      |
| Pons                                  | 8 (11.4)      | ATRX–n (%)                     |               |
| Cerebellum                            | 4 (5.7)       | loss                           | 18 (25.7)     |
| Myelencephalon                        | 6 (8.6)       | Ki67 [%] - mean (SD)           | 23.20 ± 7.06  |
|                                       |               | p53 - mean (SD)                | 24.41 ± 30.73 |
| Contrast enhancement–n (%)            |               | Molecular data                 |               |
| yes                                   | 54 (77.2)     | 450K–n (%)                     | 1 (1.4)       |
| no                                    | 11 (15.7)     | 850k–n (%)                     | 31 (44.3)     |
| Unknown                               | 5 (7.1)       | Not available–n (%)            | 38 (54.3)     |
| Side–n (%)                            |               | Subclass–n (%)                 |               |
| Left                                  | 34 (48.6)     | H3K27M                         | 24 (34.3)     |
| Right                                 | 21 (30)       | Glioblastoma                   | 1 (1.4)       |



Table 1. Continued

| Clinical data                                |             | Surgical data                    |             |
|----------------------------------------------|-------------|----------------------------------|-------------|
| At admission                                 |             | Patient positioning–n (%)        |             |
| Both                                         | 10 (7.1)    | No match                         | 4 (5.7)     |
| Midline involvement–n (%)                    | 59 (84.3)   | Classifier score–mean (SD)       | 0.86 ± 0.21 |
| Cystic–n (%)                                 | 16 (22.8)   |                                  |             |
| Ventricular involvement–n (%)                | 25 (42.4)   | Adjuvant therapy                 |             |
| Hydrocephalus–n (%)                          | 31 (44.3)   | Chemotherapy                     |             |
| Midline Shift (cm)–mean (SD)                 | 0.35 ± 0.46 | Chemotherapy (CT)–n (%)          | 3 (4.3)     |
| Edema (cm <sup>3</sup> )–mean (SD)           | 10.4 ± 13.7 | Combined RT/CT–n (%)             | 53 (75.7)   |
| Volume (cm <sup>3</sup> )–mean (SD)          | 12.2 ± 13.1 | CT duration [cycles] - mean (SD) | 4.3 (± 2.9) |
| Residual volume (cm <sup>3</sup> )–mean (SD) | 6.4 ± 6.4   |                                  |             |
|                                              |             | Radiation–n (%)                  | 58 (82.8)   |
|                                              |             | Radiotherapy (RT)–n (%)          | 5 (7.1)     |
|                                              |             | Combined RT/CT–n (%)             | 53 (75.7)   |
|                                              |             | RT dose–n (%)                    |             |
|                                              |             | >54 Gy                           | 47 (81.0%)  |
|                                              |             | <54 Gy                           | 3 (5.2%)    |
|                                              |             | Unknown                          | 8 (13.8%)   |

n, Number; SD, Standard deviation; KPS, Karnofsky-Performance Score; EOR, Extent of resection; GTR, gross-total resection; STR, subtotal resection; IONM, intraoperative neuromonitoring; MEP, motor evoked potentials; SEP, somatosensory evoked potentials.

was used in 34.3% ( $n = 24$ ), with MEPs being the most frequent method (32.8%,  $n = 23$ ), followed by SEPs in 25.7% ( $n = 18$ ) of cases (Figure 3B).

Preoperatively, more than half of the patients (54.3%) presented with a Karnofsky-Performance Status (KPS)  $\geq 90$  (Figure 3c). A preoperative KPS of  $\leq 80$  did not affect PFS (Figure 3D). However, a preoperative KPS  $\leq 80$  was associated with worse OS in the Kaplan–Meier (4.2 vs. 18.0 months,  $P = .02$ ; Figure 3E). Postoperatively, patients had a slightly lower KPS, leaving only 47.1% of all cases with a KPS greater than or equal to 90 (Figure 3F). A lower postoperative KPS of  $\leq 80$  had no significant impact on PFS (Figure 3G). Nevertheless, we found a survival advantage for patients with a postoperative KPS  $\geq 90$  (5.8 vs. 23.1 months,  $P = .0002$ ; Figure 3h).

Regarding the EOR, biopsies were performed in over half of the patients (54.3%,  $n = 38$ ), encompassing stereotactic or neuronavigation-based biopsies as well as open, transcortical biopsies. Among those who underwent resection, radiographically complete resection (GTR) was achieved in 14.3% ( $n = 10$ ), whereas subtotal resection (STR) was achieved in 30% ( $n = 21$ ; Figure 3I). Our study shows that patients who received resection (GTR/STR) did not show a significant survival benefit in either PFS (Figure 3J) or OS compared to biopsied patients ( $P = .9666$ ; Figure 3K). This was also confirmed by assessing the residual volume after resection, and no substantial enhancement in survival was observed when evaluating: (1) the median of 8 cm<sup>3</sup> of residual volume ( $P = .8831$ ) and (2) quartiles categorized as  $< 3$  cm<sup>3</sup>, 3–8 cm<sup>3</sup>, 8–20 cm<sup>3</sup>, and  $> 20$  cm<sup>3</sup> ( $P = .3482$ ; Table 2). Complete GTR was more frequently attained in adults

compared to children (10% vs. 0%,  $P = .0439$ ). Additionally, pediatric patients presented a slightly, nonsignificantly shorter median OS of 10.15 months ( $P = .4765$ ). Furthermore, patients who underwent resection (GTR/STR) did not show a significant improvement in the KPS over the ones who underwent biopsy ( $P = .8644$ ; Figure 3N).

We further analyzed patients who experienced a decline in their KPS following surgery to identify individuals for whom resection might not be advisable. However, our investigation did not reveal any significant differences in terms of age, tumor size, edema, tumor location, or the presence of preoperative hydrocephalus (Supplementary Table 3). Additionally, patients who experienced a decline in KPS after surgery received intraoperative neuromonitoring (IONM), neuronavigation, and fluorescent guidance at a similar rate to those who did not experience a decline. However, it is worth noting that a significantly higher proportion of patients with worsened postoperative KPS were operated on in the prone position compared to those with stable or improved KPS (42.9% vs. 18.2%,  $P = .0391$ ). Moreover, patients who experienced a decrease in KPS following surgery had a notably extended duration of stay in the ICU compared to those with stable or improved KPS (8.2 vs. 2.5 days,  $P = .0272$ ). Additionally, patients who underwent surgical resection (GTR/STR) experienced notably extended stays at the ICU compared to those who underwent biopsies (2.2 vs. 6.9 days,  $P = .00337$ ; Figure 3L). Moreover, patients who had resection exhibited a significantly higher occurrence of ongoing or new postoperative deficits when compared to those who underwent biopsy only (23.1% vs. 54.8%,  $P = .0120$ ; Figure 3M).

**Table 2.** Overall Survival and Progression-Free Survival as Prognosticators

|                               | Median OS (months) | P-value | Sig. | Median PFS (months) | P-value | Sig. |
|-------------------------------|--------------------|---------|------|---------------------|---------|------|
| <i>Clinical data</i>          |                    |         |      |                     |         |      |
| <b>Age (years)</b>            |                    |         |      |                     |         |      |
| ≥33                           | 14.4               | .5756   | ns   | 6                   | .2407   | ns   |
| <33                           | 9.9                |         |      | 7.3                 |         |      |
| <24                           | 9.5                | .5700   | ns   | 7.5                 | .4574   | ns   |
| 24–33                         | 9.87               |         |      | 5.5                 |         |      |
| 33–50                         | 23.1               |         |      | 5                   |         |      |
| >50                           | 11                 |         |      | 6                   |         |      |
| <b>Gender</b>                 |                    |         |      |                     |         |      |
| Male                          | 13                 | .6767   | ns   | 6.5                 | .5140   | ns   |
| Female                        | 8.7                |         |      | 5.1                 |         |      |
| <i>Clinical symptoms</i>      |                    |         |      |                     |         |      |
| Hemiparesis                   | 19                 | .1604   | ns   | 5.8                 | .9845   | ns   |
| No hemiparesis                | 9.9                |         |      | 6                   |         |      |
| Nausea                        | 12                 | .4816   | ns   | 6.5                 | .7194   | ns   |
| No nausea                     | 9.9                |         |      | 5                   |         |      |
| Cranial nerve palsy           | 13                 | .8103   | ns   | 4.5                 | .7215   | ns   |
| No cranial nerve Palsy        | 12                 |         |      | 6                   |         |      |
| Headache                      | 13                 | .1474   | ns   | 6                   | .3597   | ns   |
| No headache                   | 10.5               |         |      | 4.9                 |         |      |
| Seizure                       | 12                 | .5241   | ns   | 4.6                 | .0829   | ns   |
| No seizure                    | 12                 |         |      | 6.5                 |         |      |
| <b>Preoperative KPS</b>       |                    |         |      |                     |         |      |
| >80                           | 23.1               | .0042   | *    | 6                   | .0761   | ns   |
| ≤80                           | 6.5                |         |      | 5.7                 |         |      |
| ≥80                           | 18                 | .02     | *    | 6                   | .5981   | ns   |
| <80                           | 4.2                |         |      | 6.5                 |         |      |
| <b>Postoperative KPS</b>      |                    |         |      |                     |         |      |
| >80                           | 23.1               | .0002   | ***  | 7.1                 | .1168   | ns   |
| ≤80                           | 5.8                |         |      | 5.5                 |         |      |
| <i>Radiographic</i>           |                    |         |      |                     |         |      |
| Hydrocephalus                 | 12                 | .7768   | ns   | 6                   | .8191   | ns   |
| No hydrocephalus              | 13                 |         |      | 6.1                 |         |      |
| Midline Involvement           | 9.5                | .1526   | ns   | 6                   | .9516   | ns   |
| No midline Involvement        | 23.1               |         |      | 8.3                 |         |      |
| CE                            | 9.8                | .2529   | ns   | 5.05                | .2395   | ns   |
| No CE                         | 23.1               |         |      | 11.5                |         |      |
| Cystic                        | 13.85              | .6488   | ns   | 23                  | .0046   | *    |
| Non-cystic                    | 11                 |         |      | 5                   |         |      |
| <b>Side</b>                   |                    |         |      |                     |         |      |
| Left                          | 14                 | .4525   | ns   | 7.4                 | .0652   | ns   |
| Right                         | 8.7                |         |      | 4                   |         |      |
| Both                          | 7.1                |         |      | 4.5                 |         |      |
| One-sided tumor (left/right)  | 12                 | .5759   | ns   | 6                   | .6043   | ns   |
| Both hemispheres              | 7.1                |         |      | 4.5                 |         |      |
| <b>Edema (cm<sup>3</sup>)</b> |                    |         |      |                     |         |      |
| <4,5                          | 8.4                | .9929   | ns   | 4.4                 | .1731   | ns   |

Table 2. Continued

|                                         | Median OS (months) | P-value | Sig. | Median PFS (months) | P-value | Sig. |
|-----------------------------------------|--------------------|---------|------|---------------------|---------|------|
| >4.5                                    | 15                 |         |      | 7                   |         |      |
| 0–0.5 cm <sup>3</sup>                   | 3                  | .1805   | ns   | 7.5                 | .0905   | ns   |
| 0.5–4.5 cm <sup>3</sup>                 | 44.949             |         |      | 7                   |         |      |
| 4.5–12.5 cm <sup>3</sup>                | 8.4                |         |      | 4                   |         |      |
| >12.5 cm <sup>3</sup>                   | 8.3                |         |      | 7.3                 |         |      |
| <b>Residual volume (cm<sup>3</sup>)</b> |                    |         |      |                     |         |      |
| >8 cm <sup>3</sup>                      | 8.4                | .8831   | ns   | 6.5                 | .8584   | ns   |
| <8 cm <sup>3</sup>                      | 11                 |         |      | 5.5                 |         |      |
| <3 cm <sup>3</sup>                      | 15                 | .3482   | ns   | 9.65                | .3339   | ns   |
| 3–8 cm <sup>3</sup>                     | 6.1                |         |      | 4.5                 |         |      |
| 8–20 cm <sup>3</sup>                    | 14.4               |         |      | 7                   |         |      |
| >20 cm <sup>3</sup>                     | 8                  |         |      | 5                   |         |      |
| >20 cm <sup>3</sup>                     | 8                  | .2538   | ns   | 5                   | .6721   | ns   |
| <20 cm <sup>3</sup>                     | 14.4               |         |      | 6                   |         |      |
| <b>Volume (cm<sup>3</sup>)</b>          |                    |         |      |                     |         |      |
| >8.5                                    | 9.5                | .6906   | ns   | 5.1                 | .8714   | ns   |
| <8.5                                    | 14.4               |         |      | 6                   |         |      |
| <3                                      | 18                 | .1044   | ns   | 9                   | .2139   | ns   |
| 3–8.5                                   | 5.8                |         |      | 4.6                 |         |      |
| 8.5–16                                  | 8.4                |         |      | 5                   |         |      |
| > 16                                    | 12                 |         |      | 7.3                 |         |      |
| <b>Location</b>                         |                    |         |      |                     |         |      |
| Mesencephalon                           | 25.0               | .0111   | *    | 9.9                 | .5308   | ns   |
| Diencephalon                            | 9.5                |         |      | 5                   |         |      |
| Metencephalon                           | 36.5               |         |      | 11.5                |         |      |
| Myelencephalon                          | 10.5               |         |      | 4                   |         |      |
| Telencephalon                           | 2.82               |         |      | 7.7                 |         |      |
| Met-/Mesencephalon                      | 25.04              | .007    | **   | 10.7                | .0310   | *    |
| Tel-/Di-/Myelencephalon                 | 8.7                |         |      | 5                   |         |      |
| <b>Histopathology</b>                   |                    |         |      |                     |         |      |
| <b>MGMT</b>                             |                    |         |      |                     |         |      |
| methyated                               | 13                 | .8742   | ns   | 5                   | .2076   | ns   |
| non-methyated                           | 14                 |         |      | 7                   |         |      |
| <b>Classifier score</b>                 |                    |         |      |                     |         |      |
| ≥0.9                                    | 9.5                | .008    | **   | 5                   | .0661   | ns   |
| <0.9                                    | 40.2               |         |      | 15.05               |         |      |
| <b>ATRX</b>                             |                    |         |      |                     |         |      |
| Loss                                    | 31                 | .0029   | **   | 12.3                | .0280   | *    |
| Retention                               | 8.3                |         |      | 5.5                 |         |      |
| <b>Cyto section</b>                     |                    |         |      |                     |         |      |
| Malign                                  | 9.87               | .1023   | ns   | 6                   | .0260   | *    |
| Benign                                  | 44                 |         |      | 21.8                |         |      |
| No tumor                                | 16.8               |         |      | 5.1                 |         |      |
| Malign                                  | 9.9                | .0457   | *    | 6                   | .0069   | **   |
| Benign/No tumor                         | 29.3               |         |      | 21.8                |         |      |
| <b>Surgical Approach</b>                |                    |         |      |                     |         |      |

Table 2. Continued

|                             | Median OS (months) | P-value | Sig. | Median PFS (months) | P-value | Sig. |
|-----------------------------|--------------------|---------|------|---------------------|---------|------|
| Suboccipital                | 15                 | .3822   | ns   | 9                   | .7972   | ns   |
| Retrosigmoidal              | 38.35              |         |      | 5.75                |         |      |
| Paramedian                  | 6.1                |         |      | 6                   |         |      |
| Stereotaxy/Varioguide       | 8.4                |         |      | 6.5                 |         |      |
| Convexity                   | 9.9                |         |      | 5                   |         |      |
| IONM                        | 9.5                | .9704   | ns   | 6                   | .7915   | ns   |
| No IONM                     | 14                 |         |      | 6                   |         |      |
| <b>EOR</b>                  |                    |         |      |                     |         |      |
| GTR                         | 9.5                | .8845   | ns   | 6.1                 | .9666   | ns   |
| STR                         | 12                 |         |      | 7.1                 |         |      |
| Biopsy                      | 11                 |         |      | 5                   |         |      |
| Resection (GTR/STR)         | 12                 | .4006   | ns   | 7.074               | .8041   | ns   |
| Biopsy                      | 11                 |         |      | 5                   |         |      |
| <b>Therapy</b>              |                    |         |      |                     |         |      |
| RT                          | 14.4               | .2730   | ns   | 6                   | .9666   | ns   |
| CT                          | 8.7                |         |      | 4                   |         |      |
| RT/CT                       | 8.1                |         |      | 8.215               |         |      |
| Combined therapy (RT/CT)    | 14.4               | .1072   | ns   | 6                   | .9857   | ns   |
| Single treatment (RT or CT) | 8.7                |         |      | 4                   |         |      |

OS, Overall survival; PFS, Progression-free survival; ns, not significant; KPS, Karnofsky-Performance Score; EOR, Extent of resection, GTR, gross-total resection; STR, subtotal resection, IONM, intraoperative neuromonitoring; MEP, motor evoked potentials; SEP, somatosensory evoked potentials.

After the surgical procedure, 75.7% of the patients received combined radio-chemotherapy, while in only 4.3% of all patients, standalone chemotherapy was administered and 7.1% underwent radiotherapy only. Out of all patients, that received adjuvant radiation, ( $n = 58$ , 82.8%),  $n = 47$  (81.0%) received their recommended dose ( $>54$  Gy) of adjuvant radiotherapy and in only  $n = 8$  (13.8%) patients the dose remained unknown. Three patients (5.2%) were not able to receive their full recommended dose of  $>54$  Gy (Table 1). Furthermore, a total of  $n = 53$  (75.5%) of patients received a combination of radio- and chemotherapy as an adjuvant treatment. Within these patients, all of them received temozolomide as a chemotherapeutic agent. The mean number of chemotherapeutic cycles was  $4.3 \pm 2.9$  months.

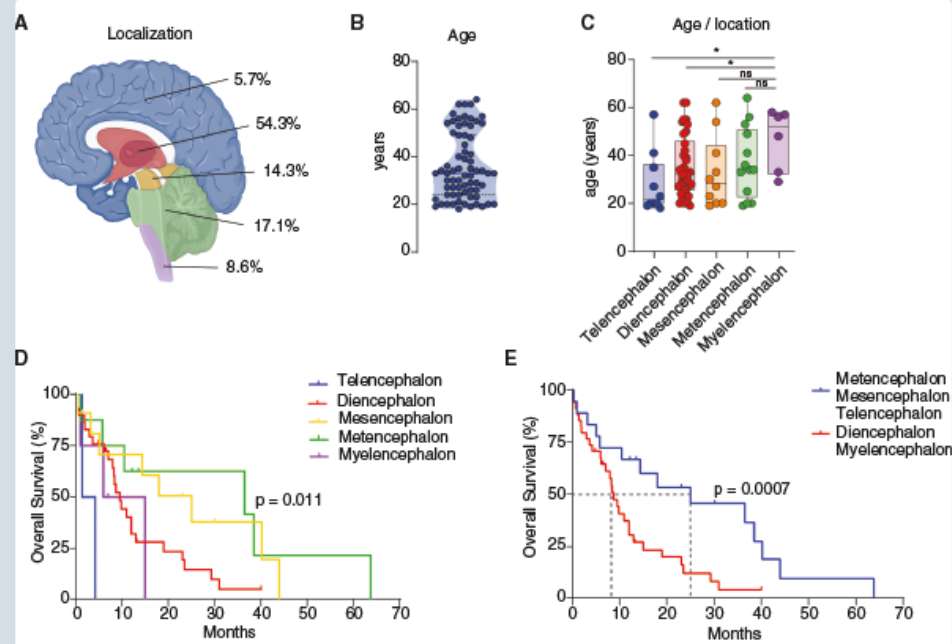
In the histopathological analysis, intraoperative cryosection resulted in low-grade glioma in 12.8% ( $n = 9$ ), high-grade glioma in 32.9% ( $n = 23$ ), and no tumor was found in 4.3% ( $n = 3$ ) of cases, but later in the final histological specimen (Figure 4A). Furthermore, the MGMT promoter was methylated in 12.8% of the cases ( $n = 9$ ). In 25.7% ( $n = 18$ ) of all adult patients, a nuclear loss of ATRX was observed, whereas their pediatric counterparts presented slightly less mutations in the ATRX (16.8%;  $P = .0723$ ; Supplementary Table 1). We further discovered that the loss of ATRX was associated with a significant survival benefit in PFS ( $P = .028$ , Figure 4B) as well as for the OS (31 vs. 8.3 months,  $P = .0029$ ; Figure 4C).

A total of 44.3% of cases were analyzed with global methylation analysis (850 k), and in 1.4%, a 450 k analysis was

performed. Out of these, 24 cases (75.0%) presented with a matching score of  $\geq 0.9$  for an H3 K27M-mutated glioma, whereas one case (3.1%) indicated a closer match to the IDH wild-type glioblastoma group and 7 cases (21.9%) did not align with H3 K27M-mutated glioma in the methylation analysis ([www.molecularNeuropathology.org](http://www.molecularNeuropathology.org); Classifier Version V11b4). Nevertheless, all cases were considered H3 K27M-mutated glioma in the final neuropathological reports. Additionally, a classifier score  $\leq 0.9$  was associated with a better OS than a higher classifier score ( $P = .008$ ; Figure 4D).

In addition, the multivariate analysis revealed that ATRX retention (HR 4.335, 95% CI: 1.647–13.34,  $P = .0054$ ) and a preoperative KPS  $< 90$  (HR 4.358, 95% CI: 1.628–12.29,  $P = .0039$ ) were identified as independent unfavorable risk factors for OS (Supplementary Table 2).

In cases of methylation analyses with the copy number variation data available, we generated an overall profile of genomic gains and losses across the cohort (Supplementary Figure 1A). This revealed a wide variety of target mutations, one of the most common of which was a C19MC loss (Supplementary Figure 1B). We were particularly interested in the impact of ATRX on genome stability and the occurrence of various tumor mutations (Supplementary Figure 1C). Thus, loss of ATRX tended to be associated with more gains in the *MDM4*, *PPM1D*, *PTCH1*, *MYB*, and *KIAA1549/BRAF* regions, whereas retention of ATRX tended to go along with more losses in the *C19MC* gene region (Supplementary Figure 1D).



**Figure 1.** Radiographic parameters (A) Schematic figure of tumors' localization in the brain (B) Age distribution of the analyzed cohort (C) Distribution of age depending on tumor localization. Tumors located in the telencephalon ( $28.0 \pm 12.7$  years,  $P = .0127$ ) or diencephalon ( $35.42 \pm 12.7$  years,  $P = .0477$ ) had a significantly lower age compared to a tumor localized in the myelencephalon ( $46.83 \pm 12.8$  years) (D) Kaplan-Meier curve of tumor localization in various brain regions, where a localization in metencephalon or mesencephalon stands out with a prolonged OS (36.5 and 25 months;  $P = .011$ ) (E) Kaplan-Meier curve: A localization in metencephalon or mesencephalon was favorable in the OS compared to tumors located in telencephalon, diencephalon or myelencephalon (25.04 vs. 8.7 months,  $P = .007$ ). Created with BioRender.com

## Discussion

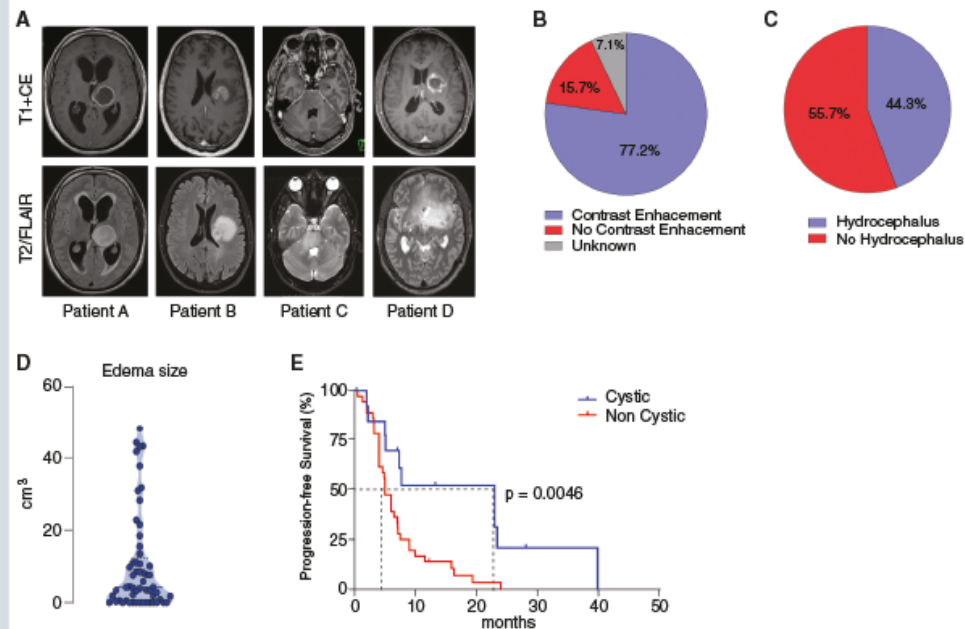
H3 K27M-mutated gliomas represent an only recently established tumor entity and are rarely seen in adults. They are characterized by a mutation in the histone H3 K27M gene leading to a modification in H3.3, resulting in loss of trimethylation. The resulting tumors show diffuse infiltrative growth in the midline structures of the brain. These highly malignant tumors are typically resistant to conventional therapies and almost invariably fatal. The present study analyzed various clinical characteristics of H3 K27M-mutated glioma in adults in a large multicentric series.

First, in this study, the mean age at diagnosis was 36 years, whereas the pediatric counterpart showed a mean age at diagnosis of around 9 years, according to literature.<sup>10,12,13</sup> Interestingly, we found a redistribution of age groups concerning their localization in the brain and observed that tumors in the myelencephalon region presented at a significantly older age (mean age of 45 years) compared to other localizations. The exact cause of this age distribution remains unclear and may indicate an

age-related plasticity of the tumor and varying cell composition.<sup>14-16</sup> Recent studies have shown that cell composition changes with age, and thus the study by Liu et al. found that with increasing age of H3 K27M-mutated glioma-diagnosed patients, there was an increase in mesenchymal (MES)-like cells in the tumor composition, which is associated with age-dependent changes in the immune environment.<sup>17</sup>

Furthermore, this study showed a predilection of adult H3 K27M-mutated glioma for localization in the diencephalon, followed by mes- and metencephalon, whereas in pediatric cases, the most frequent location described was the brainstem and herein, especially the pons.<sup>18-20</sup> In addition, we found that tumor localization in the mes- or metencephalon was associated with a significant survival advantage compared with the other localizations. The explanation behind the impact on survival concerning tumor location in the brain remains ambiguous, possibly linked to distinct cells of origin across various locations.<sup>21-23</sup> The study of Liu et al. showed that cell composition changed according to localization and that tumors in the diencephalon had an increased proportion of more mature oligodendrocyte-precursor cells, whereas





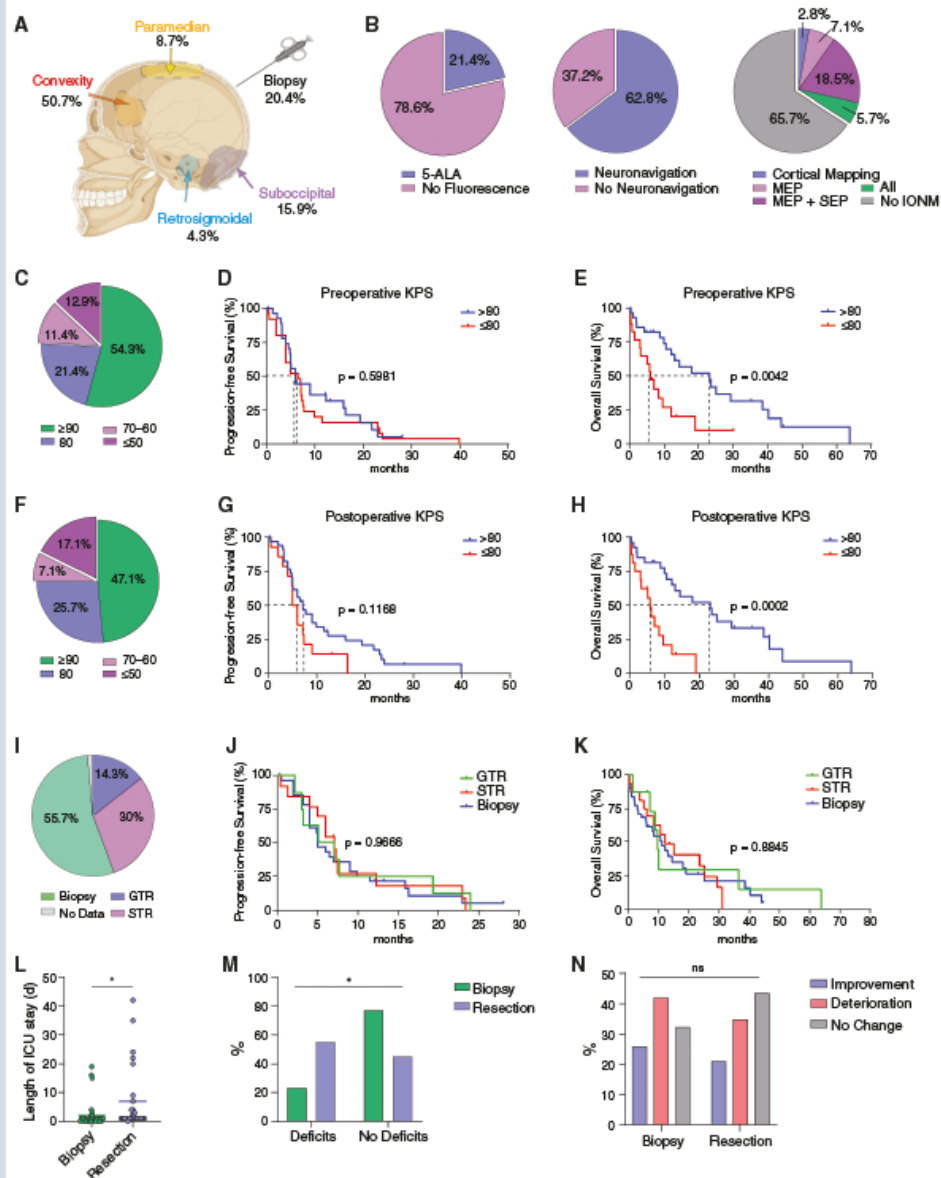
**Figure 2.** Radiographic parameters (A) magnetic resonance imaging (MRI) images of various patients with H3 K27M-mutated glioma with varying radiographic behavior. Patient A shows a midline localization with contrast enhancement (CE) and no peritumoral edema. Patient B represents a H3 K27M-mutated glioma with CE and peritumoral edema but missing hydrocephalus. Patient C depicts a tumor localized in the pons without CE on T1-weighted MRI. Patient D represents a solid tumor with CE-uptake in the basal ganglia. (B) Pie chart: CE on T1-weighted MRI appeared in 77.2% of all cases (C) Pie chart: Hydrocephalus was present in 44.3% of all cases (D) Distribution of edema volume in the total cohort (E) Kaplan–Meier curve: Cystic lesions are associated with a better survival compared to non-cystic lesions (23 vs. 5 months,  $P = .0046$ )

pontine localizations had an increased number of immature oligodendrocyte-precursor cells-like signature.<sup>17,24</sup> The extent to which this cell composition influences the malignancy of tumors and their biological behavior remains unclear but demonstrates the tumors' heterogeneity and the urgency for a differentiated understanding of the underlying pathobiology of H3 K27M-mutated glioma to facilitate developing effective, target-driven treatment strategies for this devastating disease.

Radiographically, we found 15.7% of tumors without CE on MRI. Here, absence of contrast uptake was noted mainly in tumors in the metencephalon and myelencephalon. Variations in contrast uptake had been described previously; thus this could also indicate a different cell composition.<sup>25,26</sup> An effect of the different contrast medium uptake of the tumor on the malignancy regarding survival could not be established based on this study. However, we saw that patients presenting with a cystic tumor component had a better overall survival. This highlights the diverse biology of tumor growth in this entity, as a non-cystic tumor morphology can be found more often in highly infiltrating tumors.<sup>27</sup>

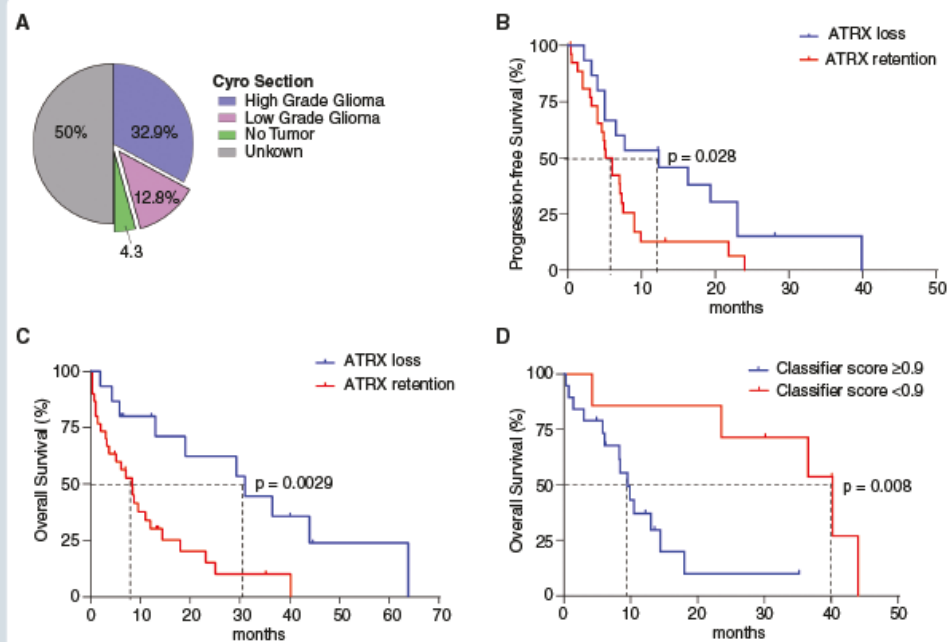
Second, 25% of patients presented a loss of nuclear ATRX. In preceding studies, loss of ATRX was found rarely

in pediatric H3 K27M-mutated gliomas but more frequently in adults with an incidence of 5%–12.5% and in pediatrics was then associated with an older age.<sup>6,20</sup> We further discovered that a nuclear loss of ATRX was associated with a significantly better overall survival over tumors with ATRX retention, consistent with previous studies.<sup>20,28,29</sup> However, other studies in H3 K27M-mutated glioma found that ATRX loss was associated with shorter overall survival in adults but not in children.<sup>18,30</sup> Nonetheless, it is worth noting, that these studies included a substantial proportion (37.2%) of patients who received palliative care without undergoing chemo- and/or radiotherapy in the adult cohort. ATRX has multiple functions and is necessary for chromatin remodeling and histone chaperone. Prior investigations identified that the complex ATRX/DAXX (death-domain associated protein) is essential for H3.3 deposition at telomeres and pericentric heterochromatin but the underlying process of a survival advantage of ATRX mutation in this tumor entity remains to be explained.<sup>31</sup> Given ATRX's involvement in alternative lengthening of telomeres in glioma, the mutual exclusivity between ATRX mutations and mutations in the Telomerase reverse transcriptase (TERT) promoter region is attributed to functional redundancy.<sup>32</sup> The retention of ATRX, however, could serve as a



**Figure 3.** Clinical parameters (A) Schematic representation of the surgical approaches used in this cohort with the most common approach being convexity. Biopsies consisted of stereotactic-guided needle biopsies (20.4%), while open and minimally invasive biopsies were performed using other surgical approaches (34.3%). (B) Pie charts of surgical tools being used during surgery: 5-ALA fluorescence is being used in 21.4% of all cases; neuronavigation was used in 62.8% and intraoperative neuromonitoring was used in 34.3% of all cases (C) Representation of the distribution of the respective preoperative Kamofsky-performance status. A KPS greater than or equal to 90 was observed in 54.3% of all cases. (D) Kaplan-Meier curve: preoperative KPS had no significant impact on progression-free survival (PFS;  $P = .5981$ ) (E) Kaplan-Meier curve:

Preoperative KPS > 80 was associated with survival disadvantage (23.1 vs. 4.2 months;  $P = .0042$ ) (F) Distribution of postoperative KPS (G) Kaplan–Meier curve: Postoperative KPS had no significant impact on PFS in H3 K27M-mutated glioma ( $P = .1168$ ) (H) Kaplan–Meier curve: Postoperative KPS ≤ 80 yielded a survival disadvantage (23.1 vs. 5.8 months;  $P = .002$ ) (I) Pie chart of distribution of the extent of resection (EOR) (J) Kaplan–Meier curve: A greater EOR did not depict any survival benefit compared to biopsy ( $P = .9666$ ) (K) Kaplan–Meier curve: EOR did not show any survival benefit comparing the arrangement of gross-total resection (GTR), subtotal resection (STR) and biopsy ( $P = .8845$ ) (L) Patients that underwent resection (GTR/STR) revealed a significantly longer stay at intensive-care units over biopsied patients (6.9 vs. 2.2 days,  $P = .0337$ ) (M) Patients who underwent resection presented significantly more postoperative deficits over biopsied patients (54.8% vs. 23.1%,  $P = .0120$ ) (N) Patients who underwent resection exhibited a similar distribution of KPS deterioration compared to those who underwent a biopsy (34% vs. 42%,  $P = .8110$ ).



**Figure 4.** Histopathological parameters (A) Pie chart of cryo section results: Cryo section showed 32.9% of high-grade tumors, 12.8% low-grade tumors, and 4.3% in tumor detection (B) Kaplan–Meier curve: ATRX loss is associated with a benefit in progression-free survival (PFS) compared to ATRX retention (12.3 vs. 5.5 months,  $P = .028$ ) (C) Kaplan–Meier curve: ATRX loss is associated with a survival benefit in OS compared with ATRX retention (31 vs. 8.3 months,  $P = .0029$ ) (D) Kaplan–Meier curve: methylation classifier score < 0.9 was associated with a better survival outcome ( $P = .008$ ).

prognostic marker and thus warrants a more aggressive therapy, i.e. a combination of temozolomide therapy with Chloroethyl-cyclohexyl-nitrosourea (CCNU), in analogy to the data from the CeTeG study by Herrlinger et al., especially in such a young patient population.<sup>33</sup>

Last, and most importantly, we found that neurosurgical resection, including gross- or subtotal, did not confer a survival advantage compared to biopsy only. At the same time, we could see a survival advantage in patients with a higher pre- and postoperative KPS of > 80. This survival benefit could be influenced by their improved ability to adhere to adjuvant treatments such as radiation and chemotherapy, representing crucial elements in extending

survival for these patients. It could be speculated that the benefit of surgical resection is diminished by the reduction in KPS, which is at risk with more aggressive resection and tumors that are mostly located in less accessible regions. Supporting this hypothesis, we found an increased frequency of postoperative deficits and a prolonged ICU stay in patients undergoing resection compared to biopsy only and no improvement in the KPS for resection compared to biopsy. As the delicate location of H3 K27M-mutated tumors is associated with a high surgical risk for secondary morbidity and no KPS improvement, and GTR can only be achieved in a minority of cases, our data supports that tumors with radiographic suspicion for a H3 K27M diagnosis



and high risk for secondary morbidity after surgery should be biopsied first. If the tumor is then confirmed for the diagnosis, our study data support that neurosurgical interventions should primarily aim to improve the KPS, ie, treating the hydrocephalus or, if safely feasible, reduce the tumor size in order to ameliorate neurological deficits and allow adjuvant therapy to be initiated. For the overall interpretation of our data, it must be considered that the previously defined parameters to evaluate subtotal- and GTR cannot be fully applied to this heterogeneous, diffusely infiltrating tumor of the midline, especially as the postoperative radiographic assessment of resection in the midline structures is difficult. Therefore, the statement that the effect of a GTR on tumor survival is limited cannot ultimately be made. However, as the reduction in volume by subtotal resection does not improve the outcome, we propose that the aim of the tumor resection should be weighed very carefully against the risk of deterioration.

In the future, this entity will support further diagnostic approaches, such as liquid biopsy. Only recently, Afflerbach et al. succeeded in making a reliable diagnosis of H3 K27M-mutated tumors and other brain tumors by nanopore sequencing analyses of cerebrospinal fluid.<sup>34</sup> Thus, the question arises whether these tumors with suspected H3 K27M mutation should now be initially identified by liquid CSF biopsy considering patients with hydrocephalus and subsequently undergo surgical resection or solely biopsy according to their entity in order to (1) maintain a stable clinical condition of the patient and (2) start adjuvant therapy as soon as possible. The current standard of care treatment after surgical resection or biopsy is still radio- and chemotherapy with temozolomide. However, new emerging treatment options including the histone acetylase inhibitors "Panobinostat," ALK2 inhibitors or immunotherapy hold promise and are currently under testing.<sup>35-39</sup> Additionally, ONC201, a dopamine receptor D2 (DRD2) antagonist and a caseinolytic protease P (ClpP) agonist, has emerged as a promising therapeutic target for gliomas. Notably, H3 K27M-mutated gliomas have displayed increased susceptibility to ONC201. As a result, one clinical trial for recurrent glioblastoma coincidentally enrolled an adult patient with an H3 K27M mutation, who experienced improved survival following ONC201 treatment.<sup>40</sup> In addition, a study by Chi et al. included 7 adult patients with recurrent H3 K27M-mutated glioma treated with ONC201. Adults in this study exhibited a not significantly longer median PFS of 15 weeks compared to 13 weeks for their pediatric counterparts.<sup>41</sup> Recently, Venetti et al. published the results of 2 clinical trials (NCT03416530, NCT03134131) involving ONC201 treatment for both pediatric and adult H3 K27M-mutated gliomas, reporting a significant improvement in OS.<sup>42</sup> We further analyzed their published data in relation to age-dependent differences and found that for the non-recurrent group, adult (>18 years) and pediatric (<18 years) H3 K27M-mutated gliomas did not exhibit a significant difference in OS when treated with ONC201 after radiation (26 vs. 21.7 months,  $P = .7540$ ). However, in the cohort of recurrent H3 K27M-mutated gliomas, adult patients showed significantly prolonged OS when treated with ONC201 compared to their pediatric counterparts (11.4 vs. 5.8 months,  $P = .0275$ ). This suggests a more favorable response rate to ONC201 therapy among

adult patients with recurrent H3 K27M-mutated glioma. Additionally, 2 recent clinical phase II trials have been initiated for adult patients with recurrent H3 K27M-mutated glioma undergoing treatment with ONC201 (NCT03295396; NCT02525692), offering hope for further insights and potential therapeutic breakthroughs in adults H3 K27M-mutated glioma.

In conclusion, our study shows that the current surgical approach should be critically questioned, and biopsy may currently be the preferred first approach to the patient, most notably in midline tumors with suspected H3 K27M mutation. Since a greater EOR does not offer a survival benefit and carries a higher risk of worse postoperative outcomes, patients primarily benefit from experiencing fewer preoperative and postoperative neurological deficits.

## Limitation

This retrospective, multicenter study has limitations primarily related to the retrospective nature of the investigation and the relatively small size of the pediatric comparison group used to evaluate clinical outcomes. The role of the EOR must be critically evaluated in view of tumor localization, biological and radiographic heterogeneity, and postoperative accessibility, so the impact of GTR cannot be conclusively determined. Due to the proximity to midline structures and consequently its surgically challenging localization, a total or even subtotal resection of H3 K27M-mutated glioma remains feasible for only a small fraction of patients.

## Conclusion

In summary, the present retrospective study describes clinical, radiographic, surgical, and molecular features of H3 K27M-mutated glioma in adults in one of the largest existing multicentric studies to date. Our data demonstrate that location and pre- and postoperative KPS, as well as ATRX status, impact overall survival significantly in H3 K27M-mutated glioma. Furthermore, resection provided no significant survival benefit compared with biopsy. The adult form of H3 K27M-mutated glioma may present a different clinical behavior and prognosis compared to its pediatric counterpart and could therefore require specific therapeutic approaches.

## Supplementary material

Supplementary material is available online at *Neuro-Oncology* (<https://academic.oup.com/neuro-oncology>).

## Keywords

high-grade glioma | H3 K27M | Histone H3 | H3F3A | HIST1H3B

### Funding

The authors declare that they have not received any financial funds, grants, or other support while preparing this manuscript and likewise that they have no relevant nonfinancial interests to disclose.

### Conflict of interest statement

None declare.

### Authorship statement

The concept and design of this study were developed by M.M.. All authors were responsible for data collection. A.R., U.S., and M.M. worked on the interpretation of results and statistical analysis. The manuscript was prepared by A.R., U.S., and M.M. and critically reviewed and edited by all authors.

### Data availability

Data are available from the corresponding author upon reasonable request.

### Affiliations

Department of Neurosurgery, Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany (A.R., J.G., M.W., M.M.); Department of Neurosurgery, University Hospital of Münster, Münster, Germany (Z.O., W.S., E.S.M.); Department of Neurosurgery, Charité University Hospital Berlin, Berlin, Germany (N.N., P.V., J.O.); Department of Neurosurgery, Technical University Munich, Munich, Germany (L.H., B.M.); Department of Neurosurgery, Medical Center - University of Freiburg, Freiburg, Germany (N.N., J.B., D.H.H., J.); Department of Neurosurgery, Heidelberg University Hospital, Heidelberg, Germany (M.J., A.U., P.D.T.); Division of Stereotactic Neurosurgery, Department of Neurosurgery, Heidelberg University Hospital, Heidelberg, Germany (M.J.); Heidelberg University, Medical Faculty, Heidelberg, Germany (M.J., A.U., P.D.T.); Department of Neurosurgery, University Medical Center Mainz, Mainz, Germany (D.K., F.R.); Department of Neurosurgery, Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Austria (A.K., C.T., C.F.F.); Institute of Neuropathology, Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany (U.S.); Department of Pediatric Hematology and Oncology, Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany (U.S.); Research Institute Children's Cancer Center Hamburg, Hamburg, Germany (U.S.)

### References

- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):803–820.
- Buczkowicz P, Hoeman C, Rakopoulos P, et al. Genomic analysis of diffuse intrinsic pontine gliomas identifies three molecular subgroups and recurrent activating ACVR1 mutations. *Nat Genet.* 2014;46(5):451–456.
- Taylor KR, Mackay A, Truffaux N, et al. Recurrent activating ACVR1 mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat Genet.* 2014;46(5):457–461.
- Castel D, Philippe C, Kergrohen T, et al. 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 Neuropathol Commun.* 2018;6(1):117.
- Gessi M, Gielen GH, Dreschmann V, Waha A, Pietsch T. High frequency of H3F3A K27M mutations characterizes pediatric and adult high-grade gliomas of the spinal cord. *Acta Neuropathol.* 2015;130(3):435–437.
- Khuong-Quang DA, Buczkowicz P, Rakopoulos P, et al. K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathol.* 2012;124(3):439–447.
- Jain SU, Rashoff AQ, Krabbenhoft SD, et al. H3 K27M and EZHIP impede H3K27-methylation spreading by inhibiting allosterically stimulated PRC2. *Mol Cell.* 2020;80(4):726–735.e7.
- Findlay U, De Iulius GN, Duchatel RJ, et al. Pharmacoproteogenomic profiling of pediatric diffuse midline glioma to inform future treatment strategies. *Oncogene.* 2022;41(4):461–475.
- Antin C, Tauziède-Espariat A, Debily MA, et al. EZHIP is a specific diagnostic biomarker for posterior fossa ependymomas, group PFA and diffuse midline gliomas H3-WT with EZHIP overexpression. *Acta Neuropathol Commun.* 2020;8(1):183.
- Mackay A, Burford A, Carvalho D, et al. Integrated molecular meta-analysis of 1,000 pediatric high-grade and diffuse intrinsic pontine glioma. *Cancer Cell.* 2017;32(4):520–537.e5.
- Schreck KC, Ranjan S, Skorupan N, et al. Incidence and clinicopathologic features of H3 K27M mutations in adults with radiographically-determined midline gliomas. *J Neurooncol.* 2019;143(1):87–93.
- Lu VM, Alvi MA, McDonald KL, Daniels DJ. Impact of the H3K27M mutation on survival in pediatric high-grade glioma: A systematic review and meta-analysis. *J Neurosurg Pediatr.* 2018;23(3):308–316.
- Kleinschmidt-DeMasters BK, Levy JMM. H3 K27M-mutant gliomas in adults vs. children share similar histological features and adverse prognosis. *Clin Neuropathol.* 2018;37(03):53–63.
- Neftel C, Laffy J, Filbin MG, et al. An integrative model of cellular states, plasticity, and genetics for glioblastoma. *Cell.* 2019;178(4):835–849.e21.
- Hara T, Chanoch-Myers R, Mathewson ND, et al. In brief Interactions between cancer cells and immune cells drive transitions to mesenchymal-like states in glioblastoma. *Cancer Cell.* 2021;39(6):779–792.e11.
- Schmitt MJ, Company C, Dramaretska Y, et al. Phenotypic mapping of pathologic cross-talk between glioblastoma and innate immune cells by synthetic genetic tracing. *Cancer Discov.* 2021;11(3):754–777.
- Liu I, Jiang L, Samuelsson ER, et al. The landscape of tumor cell states and spatial organization in H3-K27M mutant diffuse midline glioma across age and location. *Nat Genet.* 2022;54(12):1881–1894.
- Wang Y, Feng LL, Ji PG, et al. Clinical features and molecular markers on diffuse midline gliomas with H3K27M mutations: A 43 cases retrospective cohort study. *Front Oncol.* 2021;10:602553.

19. Thust S, Micallef C, Okuchi S, et al. Imaging characteristics of H3 K27M histone-mutant diffuse midline glioma in teenagers and adults. *Quant Imaging Med Surg.* 2021;11(1):43–56.
20. Zheng L, Gong J, Yu T, et al. Diffuse midline gliomas with histone H3 K27M mutation in adults and children: A retrospective series of 164 cases. *Am J Surg Pathol.* 2022;46(6):863–871.
21. Fu Y, Yang M, Yu H, et al. Heterogeneity of glial progenitor cells during the neurogenesis-to-gliogenesis switch in the developing human cerebral cortex. *Cell Rep.* 2021;34(9):108788.
22. Huang W, Bhaduri A, Velmeshev D, et al. Origins and proliferative states of human oligodendrocyte precursor cells. *Cell.* 2020;182(3):594–608.e11.
23. Marques S, Zeisel A, Codeluppi S, et al. Oligodendrocyte heterogeneity in the mouse juvenile and adult central nervous system. *Science.* 2016;352(6291):1326–1329.
24. Nagaraja S, Quezada MA, Gillespie SM, et al. Histone variant and cell context determine H3K27M reprogramming of the enhancer landscape and oncogenic state. *Mol Cell.* 2019;76(6):965–980.e12.
25. Dono A, Takayasu T, Ballester LY, Esquenazi Y. Adult diffuse midline gliomas: Clinical, radiological, and genetic characteristics. *J Clin Neurosci.* 2020;82(Pt A):1–8.
26. Schulte JD, Buerki RA, Lapointe S, et al. Clinical, radiologic, and genetic characteristics of histone H3 K27M-mutant diffuse midline gliomas in adults. *Neurooncol Adv.* 2020;2(1):vdaa142.
27. Lai A, Kharbada S, Pope WB, et al. Evidence for sequenced molecular evolution of IDH1 mutant glioblastoma from a distinct cell of origin. *J Clin Oncol.* 2011;29(34):4482–4490.
28. Vuong HG, Le HT, Ngo TNM, et al. H3K27M-mutant diffuse midline gliomas should be further molecularly stratified: An integrated analysis of 669 patients. *J Neurooncol.* 2021;155(3):225–234.
29. Ebrahimi A, Skardelly M, Bonzheim I, et al. ATRX immunostaining predicts IDH and H3F3A status in gliomas. *Acta Neuropathol Commun.* 2016;4(1):60.
30. Gong X, Kuang S, Deng D, et al. Differences in survival prognosticators between children and adults with H3K27M-mutant diffuse midline glioma. *CNS Neurosci Ther.* 2023;29(12):3863–3875.
31. Dyer MA, Qadeer ZA, Valle-Garcia D, Bernstein E. ATRX and DAXX: Mechanisms and mutations given the identification of ATRX and DAXX mutations in cancer, these factors have received. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.* 2017;7(3):a026567.
32. Liu J, Zhang X, Yan X, et al. Significance of TERT and ATRX mutations in glioma. *Oncol Lett.* 2019;17(1):95–102.
33. Herrlinger U, Tzaridis T, Mack F, et al. Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CeTeG/NOA-09): A randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 2019;393(10172):679–688.
34. Afflerbach AK, Rohrandt C, Brändl B, et al. OTHR-03. Classification of brain tumors by nanopore sequencing of cell-free DNA from cerebrospinal fluid. [https://academic.oup.com/neuro-oncology/article/25/Supplement\\_1/74/7194554](https://academic.oup.com/neuro-oncology/article/25/Supplement_1/74/7194554). Accessed July 18, 2023.
35. Argersinger DP, Rivas SR, Shah AH, Jackson S, Heiss JD. New developments in the pathogenesis, therapeutic targeting, and treatment of H3K27M-mutant diffuse midline glioma. *Cancers.* 2021;13(21):5280.
36. Benítez-Ribas D, Cabezón R, Flórez-Grau G, et al. Immune response generated with the administration of autologous dendritic cells pulsed with an allogenic tumoral cell-lines lysate in patients with newly diagnosed diffuse intrinsic pontine glioma. *Front Oncol.* 2018;8(APR):347913.
37. Hennika T, Hu G, Olaciregui NG, et al. Pre-clinical study of panobinostat in xenograft and genetically engineered murine diffuse intrinsic pontine glioma models. *PLoS One.* 2017;12(1):e0169485.
38. Vitanza NA, Biery MC, Myers C, et al. Optimal therapeutic targeting by HDAC inhibition in biopsy-derived treatment-naïve diffuse midline glioma models. *Neuro Oncol.* 2021;23(3):376–386.
39. Carvalho D, Taylor KR, Olaciregui NG, et al. ALK2 inhibitors display beneficial effects in preclinical models of ACVR1 mutant diffuse intrinsic pontine glioma. *Commun Biol.* 2019;2(1):156.
40. Arrillaga-Romany I, Chi AS, Allen JE, et al. A phase 2 study of the first imipridone ONC201, a selective DRD2 antagonist for oncology, administered every three weeks in recurrent glioblastoma. *Oncotarget.* 2017;8(45):79298–79304.
41. Chi AS, Tarapore RS, Hall MD, et al. Pediatric and adult H3 K27M-mutant diffuse midline glioma treated with the selective DRD2 antagonist ONC201. *J Neurooncol.* 2019;145(1):97–105.
42. Verneti S, Kawakibi AR, Ji S, et al. Clinical efficacy of ONC201 in H3K27M-mutant diffuse midline gliomas is driven by disruption of integrated metabolic and epigenetic pathways. *Cancer Discov.* 2023;13(11):2370–2393.

## 10. Erklärung des Eigenanteils

Mein Eigenanteil der vorliegenden Publikationspromotion mit dem Titel „*Insights from a Multicenter Study on Adult H3 K27M-Mutated Glioma: Surgical Resection's Limited Influence on Overall Survival, ATRX as Molecular Prognosticator*“ umfasst sowohl die Datenakquise der aus Hamburg stammenden Daten, die Zusammenführung der multizentrischen Daten und der statistischen Auswertung dieser sowie der Verfassung des Manuskripts und der Promotionsarbeit.

Die Datenerhebung der aus dem Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf stammenden Daten umfasste sowohl pädiatrische Patient:innen als auch Patient:innen im Erwachsenenalter. Nach Erhalt der ergänzenden Kohorte der weiteren sieben neuroonkologischen Zentren führte ich die statistische Analyse durch, erstellte die Abbildungen und verfasste das Manuskript.

Die Betreuung dieser Arbeit und Korrektur des Manuskripts erfolgte primär durch Privatdozent Dr. med. Malte Mohme sowie Professor Dr. med. Ulrich Schüller.

Die Ergebnisse dieser Arbeit habe ich sowohl in Form eines wissenschaftlichen Vortrags auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC) im Jahr 2023 in Stuttgart präsentiert als auch in einer wissenschaftlichen Posterpräsentation auf der Jahrestagung der Society of Neuro Oncology (SNO) in Vancouver im Jahr 2023 vorgestellt.

## **11. Danksagung**

Ich möchte meinen aufrichtigen Dank an Herrn Privatdozent Dr. med. Malte Mohme für die hervorragende Betreuung während der gesamten Durchführung meiner Dissertation aussprechen. Sein hohes Engagement und seine konstruktive Kritik waren in dieser Zeit eine große Hilfe.

Darüber hinaus gebührt auch Herrn Professor Dr. med. Ulrich Schüller ein besonderer Dank für seine Unterstützung und wertvollen Anregungen während der Erstellung des Manuskripts.

An dieser Stelle möchte ich mich ebenfalls bei Herrn Prof. Dr. med. Manfred Westphal sowie Herrn Prof. Dr. med. Jens Gempt für die Unterstützung und die Möglichkeit der Durchführung einer Doktorarbeit bedanken.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei allen Ko-Autoren und Ko-Autorinnen der beteiligten neuroonkologischen Zentren für deren tatkräftiges Engagement bei der Datenerhebung sowie ihre Unterstützung und gute Zusammenarbeit bedanken.

An letzter Stelle bedanke ich mich bei meinem Partner, meinen Geschwistern und meinen Eltern für die liebe volle Unterstützung während der Arbeit an dieser Doktorarbeit.

## **12. Curriculum vitae**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

### **13. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere hiermit ausdrücklich, dass ich diese Arbeit eigenständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe und keine anderen Quellen oder Hilfsmittel als die von mir angegebenen verwendet habe. Darüber hinaus habe ich alle wörtlich oder inhaltlich entnommenen Passagen aus den genutzten Werken jeweils mit Angabe von Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes klar gekennzeichnet.

Ferner bestätige ich, dass ich diese Dissertation bisher keinem anderen Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Begutachtung vorgelegt habe oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass das Dekanat der Medizinischen Fakultät meine Dissertation mithilfe einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft kann.