



CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEI GLIOMI DELLA LINEA MEDIANA DELL'ADULTO AI FINI DELL'IDENTIFICAZIONE DI NUOVI POTENZIALI TARGET PER LA TERAPIA PERSONALIZZATA

A cura della Dr.ssa Elena Trisolini

Approvato dal Gruppo di Studio sulla Patologia Molecolare

Partecipanti:

Susanna Cappia, Laura Casorzo, Andrea Castelli, Massimo Di Benedetto, Patrizia Agnese Falcone, Paola Francia di Celle, Doriana Giustetto, Genny Jocollé, Antonella Maffè, Caterina Marchiò, Narciso Mariani, Sara Orecchia, Roberta Patetta, Maria Scatolini, Francesca Schillaci, Stefano Taraglio, Silvana Ungari, Claudia Veggiani, Tiziana Venesio, Ludovica Verdun di Cantogno

L'incontro del 17 settembre è stato dedicato a discutere e approfondire le problematiche associate alla caratterizzazione molecolare dei Gliomi Maligni.

Ad oggi questo ambito è limitato allo studio dello stato di metilazione del promotore del gene MGMT a scopo prognostico/predittivo nei Glioblastomi (lo stato di metilazione è predittivo di risposta agli agenti alchilanti) eseguito ormai in tutte le nuove diagnosi e l'analisi mutazionale dei geni IDH1 e IDH2 utile nella diagnosi dei gliomi di basso grado (unitamente alla caratterizzazione mediante FISH della codelezione 1p19q) e dei Glioblastomi secondari.

Le mutazioni IDH1 e IDH2 hanno anche un valore prognostico in quanto i pazienti portatori di loro mutazioni mostrano maggior sopravvivenza probabilmente a causa della sensibilizzazione delle cellule alla terapia.

Lo sviluppo della diagnostica dei Gliomi Maligni prevede l'inserimento di nuovi marcatori e in ultimo la validazione di un pannello NGS dedicato in grado di fornire contemporaneamente l'assetto mutazionale, lo stato di metilazione e il Copy Number Variation.

La Dr.ssa Elena Trisolini (Dottorando di Ricerca c/o Anatomia Patologica Novara) ha presentato una relazione “Caratterizzazione molecolare dei Gliomi della linea mediana nell'adulto al fine di identificare nuovi potenziali bersagli di terapia personalizzata”.

Nello studio qui presentato sono stati inclusi 166 casi di Gliomi della linea mediana (confermati da immagini radiologiche e conferma istologica) analizzati per mutazioni del gene IDH1, del gene FGFR1, del gene TERT e dei geni istonici.

L'analisi mutazionale è stata correlata con i dati di sopravvivenza. I dati confermano un'alta eterogeneità molecolare dei Gliomi, con frequenza minore di mutazioni istoniche rispetto alle forme pediatriche. Le varianti del gene IDH1 identificate sono rare e richiedono il sequenziamento per una loro giusta connotazione. Mutazioni di FGFR1 sono state identificate nel 18% dei casi anche in presenza di mutazioni dei geni istonici.

Mutazioni di TERT sono state identificate nel 37% dei casi e associano a grado IV e scarsa sopravvivenza. In conclusione l'espansione dell'analisi mutazionale dei Gliomi della linea mediana dell'adulto consente una miglior classificazione diagnostica, fornisce indicazioni sulla prognosi (TERT) e possibili bersagli terapeutici (FGFR1).



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

XXXII PhD Programme in Medical Sciences and Biotechnologies
curriculum: Neoplastic, Metabolic and Age-related Diseases

**Targeted molecular characterization of adult midline gliomas for
the identification of new potential targets for personalized therapy**



Dr.Elena Trisolini

Dipartimento di Scienze della Salute. Università del Piemonte Orientale
Anatomia Patologica – Laboratorio di Patologia Molecolare
"Ospedale Maggiore della Carità" Novara

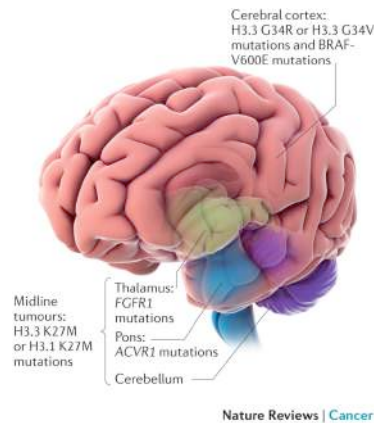
Caratterizzazione molecolare dei gliomi della
linea mediana dell'adulto ai fini
dell'identificazione di nuovi potenziali target
per la terapia personalizzata

INTRODUCTION

Diffuse midline gliomas (MLG) are primary brain tumours arising from thalamus, hypothalamus, brainstem, cerebellum or spinal cord, occurring predominantly in children and young adults

The majority of these tumours harbour recurrent missense mutations in H3F3A and HIST1H3B genes (K27M), which both encode variants of the histone H3 protein, involved in gliomagenesis

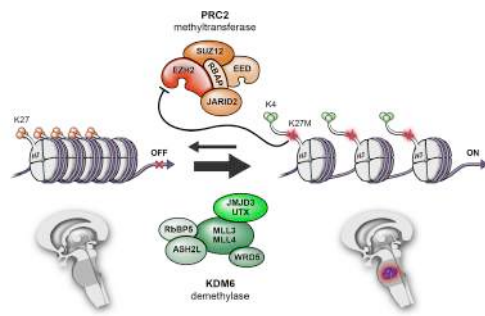
more aggressive clinical phenotype and poor prognosis in children and young adults (grade IV, WHO classification 2016)



I gliomi diffusi della linea mediana sono tumori primitivi cerebrali che si sviluppano da talamo, ipotalamo, tronco encefalico, cervelletto e midollo spinale, principalmente nei bambini e giovani adulti. La maggioranza di questi tumori è caratterizzata da una mutazione (K27M) a carico dei geni H3F3A e HIST1H3B che codificano per due isoforme della proteina istonica H3. Tumori che portano questa mutazione sono classificati come grado IV secondo la classificazione WHO 2016 e sono caratterizzata da prognosi peggiore (specialmente per i tumori dell'età pediatrica)

INTRODUCTION

Histone proteins are modified by the PRC2 methyltransferase and by KDM demethylase. PRC2 increases methylation of K27, which promotes a more compact and transcriptionally repressed chromatin state. In contrast, KDM demethylase complex removes methyl groups from K27 and increases methylation of K4 that, in combination, promote an open and transcriptionally active chromatin state.



Histone H3K27M mutant protein sequesters PRC2 histone methyltransferase and functionally inactivates it, leading to a global reduction of K27 methylation, thereby promoting an open chromatin structure that favors increased gene transcription.

Le proteine istoniche sono modificate dall'enzima metiltransferasi PRC2 e dalla demetilasi KDM. PRC2 aumenta la metilazione del residuo K27 promuovendo una conformazione chiusa della cromatina; KDM rimuove invece i gruppi metile dal residuo K27 causando un effetto contrario al precedente. La proteina mutata K27M sequestra la PRC2 inattivandola promuovendo così un globale aumento della trascrizione genica.

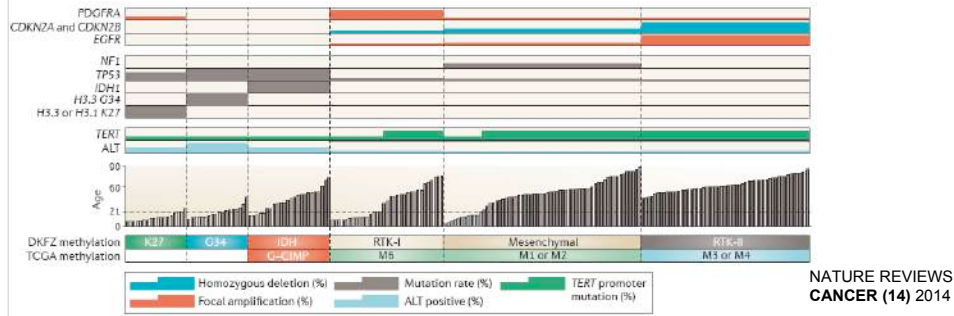
INTRODUCTION

In adults, less than 10% of diffuse gliomas arises in midline structures

Recent works suggested that this subset of tumours may present with phenotypic and molecular characteristics differing from both pediatric MLG and adult supratentorial gliomas

The prognostic significance of H3F3A mutations in adults remains unclear

Even if less frequent, IDH1 and FGFR1 hotspot mutations represent particular interest because small molecule inhibitors are being developed and there is an urgent need for new treatments



Negli adulti, meno del 10% dei gliomi diffusi origina dalle strutture della linea mediana e alcuni studi suggeriscono che siano un'entità differente dai corrispettivi tumori pediatrici o dai tumori sopratentoriali dell'adulto. Il significato prognostico della mutazione istonica nei tumori dell'adulto è ancora incerto e, anche se meno frequenti, l'interesse riguardo mutazioni a carico di IDH1 e FGFR1 sta aumentando a causa dello sviluppo di farmaci inibitori che potrebbero rappresentare nuove strategie terapeutiche.

AIM OF THE STUDY

Unravelling the genomic landscape of this heterogeneous group of tumours will enable better defining the prognostic value of molecular biomarkers in this disease and identify new therapeutic strategies that could improve patient care.

We report 116 adult patients with MLG and assess the prevalence of major driver molecular alterations associated with this subset of tumours compared to a large cohort of 478 hemispheric gliomas.

ARTICLE

***FGFR1* actionable mutations, molecular specificities, and outcome of adult midline gliomas**

Alberto Picca, MD, Giulia Berzero, MD, Franck Bielle, MD, PhD, Mehdi Touat, MD, Julien Savatovsky, MD, Marc Polivka, MD, Elena Trisolini, MSc, Sheida Meunier, BSc, Yohann Schmitt, MSc, Ahmed Idbaih, MD, PhD, Khe Hoang-Xuan, MD, PhD, Jean-Yves Delattre, MD, PhD, Karima Mokhtari, MD, Anna Luisa DiStefano, MD, PhD, and Marc Sanson, MD, PhD

Correspondence
Dr. Sanson
marc.sanson@aphp.fr

Neurology® 2018;90:e2086-e2094. doi:10.1212/WNL.0000000000005658



Scopo del lavoro è di definire meglio il ruolo di alcuni biomarcatori per identificarne nuovi potenziali target terapeutici. Nello studio indicato sono stati analizzati 166 GLM comparandoli con una coorte di 478 gliomi emisferici.

PATIENTS & METHODS

Adult patients (>15 years) with diagnosis of MLG were retrospectively identified from the database of GH Pitié-Salpêtrière (Paris, Prof. Marc Sanson) from 1996 to 2017 according to the following criteria:

- (1) tumour arising in midbrain location verified on at least 1 neuroimaging
- (2) histopathological confirmation of diffuse glioma according to WHO 2016 classification
- (3) available follow-up data.

DNA was extracted from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) or frozen samples by standard procedures.

Mutation analysis by Sanger sequencing of the major hot-spots:

IDH1-R132

IDH2-R172

H3F3A-K27/G34

HIST1H3B-K27

FGFR1-N546/K656

TERT promoter at positions -250 and -228



aCGH to determine EGFR amplification, p16/CDKN2A deletion, and chromosomes 1p, 19q, 9p, 10p, and 10q losses.

I pazienti, reclutati dall'ospedale Pitié-Salpêtrière di Parigi, sono stati selezionati a partire dal 1996 e secondo 3 criteri: 1) localizzazione nella linea mediana verificata da almeno 1 immagine radiologica, 2) conferma di diagnosi istologica secondo WHO 2016, 3) dati di follow-up disponibili.

Il DNA è stato estratto da tessuto FFPE o congelato e le analisi di mutazioni sono state condotte mediante sequenziamento Sanger per i codoni riportati.

E' stata eseguita anche una analisi di array-CGH per l'analisi di altre variazioni cromosomiche (v. sopra)

RESULTS

Histone H3 K27M mutation

- 38 patients (33%),
- associated with a younger age at diagnosis (median 33y vs. 53y, $p < 0.0001$)
- mutually exclusive with IDH1
- inversely related to pTERT mutations, p16/CDKN2A loss and EGFR amplification

IDH1 mutations

- only in brainstem tumours (6/24 patients, 25%)
- rarer mutations (R132G, R132C, R132L, R132G)
- contrasted with non-midline IDH1-mutant gliomas, typically R132H.

FGFR1 mutations

- 18% of analyzed patients (13/73): N546K (9), N546D (2), K656E (2)
- diverse locations: 7/37 thalamus (19%), 3/12 brainstem (17%), 2/13 cerebellar (15%), 1/3 spinal cord (33%)
- No mutation found in 478 hemispheric gliomas of different grades (II-IV)

Il 33% dei GLM presenta mutazione dell'istone H3 che risulta essere associata ad una età più giovane, essere mutualmente esclusiva con mutazioni di IDH1, pTERT, perdita di p16 e amplificazione di EGFR.

Le mutazioni di IDH1 sono state identificate solo in tumori del tronco e sono varianti rare (non R12H).

Mutazioni a carico dei 2 hotspot di FGFR1 sono state identificate nel 18% dei GLM e risultano essere specifiche per le strutture della linea mediana anche se non associate ad alcuna struttura particolare e assenti nei gliomi emisferici di controllo.

RESULTS

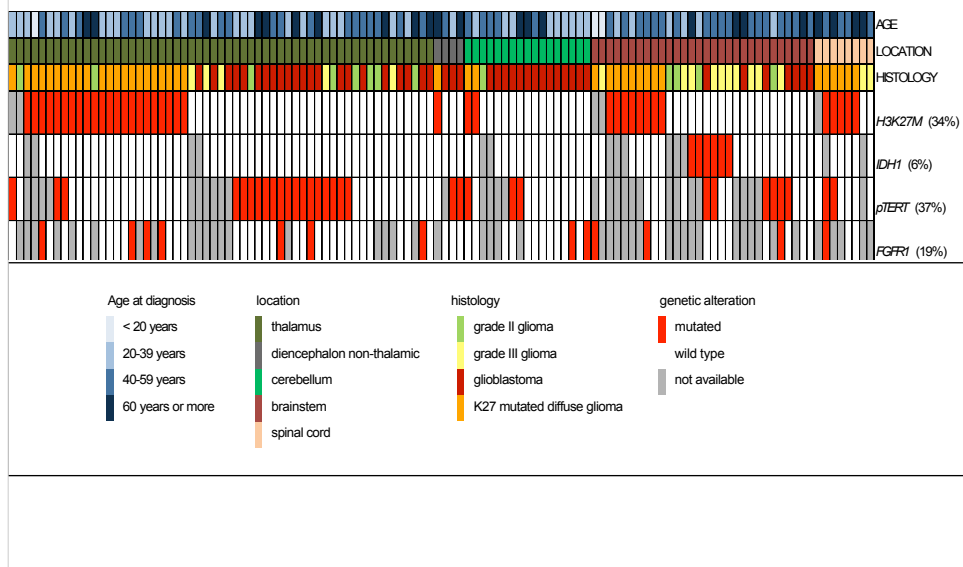
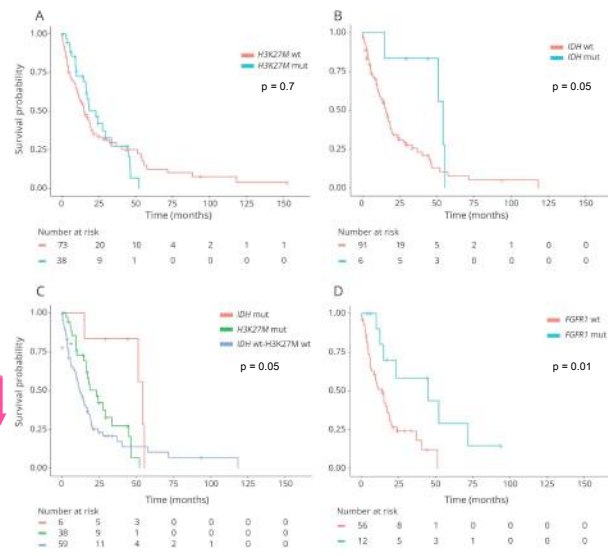
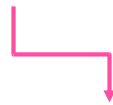


Diagramma rappresentativo dei risultati

RESULTS

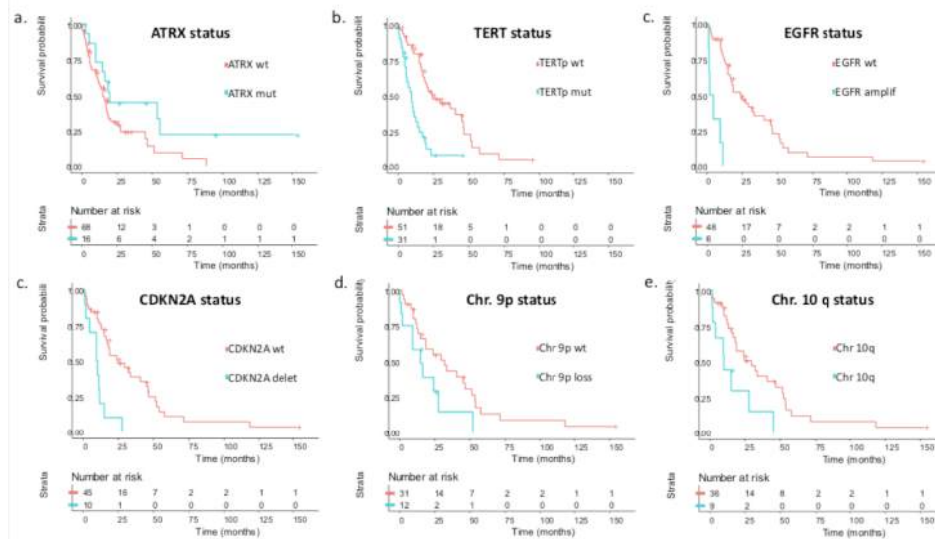
IDH wild-type-K27 wild-type patients showed the worst outcome. This group had frequent TERTp mutation, CDKN2A deletion, and EGFR amplification, all associated with shorter survival.



Le analisi di sopravvivenza mostrano come i pazienti IDH-wt e K27-wt abbiano la prognosi peggiore; questi pazienti hanno anche mutazioni a carico del promotore di TERT, delezione di CDKN2A e amplificazione di EGFR.

La mutazione istonica non dà indicazioni prognostiche mentre i pazienti con mutazione di FGFR1 sembrano avere una prognosi migliore

RESULTS



Cox model analysis: only TERTp, IDH, and FGFR1 status were independent prognostic markers

Analisi di Cox mostr che solo le mutazioni del promotore di TERT, di IDH e FGFR1 sono marker prognostici indipendenti

CONCLUSIONS

Adult MLG constitute a heterogeneous group with mostly high-grade neoplasms and clinical and histomolecular characteristics differing from both pediatric MLG and adult supratentorial high-grade gliomas.

Lower prevalence of histone H3 mutations compared to pediatric high-grade thalamic and brainstem gliomas (70%–80%)

H3K27M does not correlate with a poorer prognosis in adult MLG

A systematic IDH1 sequencing should be performed whenever feasible in brainstem gliomas due to the presence of non-R132H mutations

IDH1 mutation is associated with better outcome

I GLM dell'adulto rappresentano un gruppo eterogeneo di neoplasie, principalmente di alto grado, che differiscono dai GLM pediatrici e da altri gliomi sopratentoriali dell'adulto. Hanno una frequenza inferiore di mutazioni istoniche rispetto ai tumori pediatrici e la loro presenza non correla con una prognosi infausta.

L'analisi di IDH1 dovrebbe essere effettuata mediante sequenziamento per identificare varianti rare; tali mutazioni correlano con una prognosi migliore.

CONCLUSIONS

We identified here other potentially targetable hotspot mutations affecting FGFR1 in 18% of our patients.

FGFR1 mutations were not associated with any specific location or any molecular subgroup but they tended to be present in K27M tumours.

FGFR1 mutations tended to be associated with younger age ($p = 0.06$), and ATRX loss ($p = 0.05$)

TERTp mutation (37% of our patients) was associated with older age, grade IV, poor survival, EGFR amplifications, loss of chromosome 10, and deletion of CDKN2A.

Survival of these patients was particularly poor.

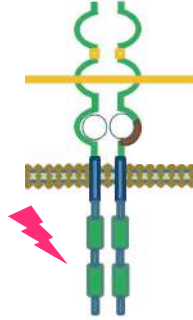
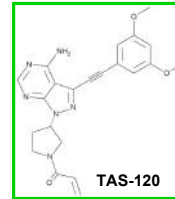
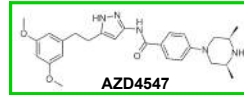
Mutazioni a carico di FGFR1 sono state identificate nel 18% dei GLM, non sono associate a particolare strutture della linea mediana e possono essere presenti anche in tumori K27M-mutati.

La mutazione di pTERT è stata riscontrata nel 37% dei casi ed è associata a età maggiore, grado IV, scarsa sopravvivenza, amplificazione di EGFR, perdita del chr 10 e delezione di p16.

CONCLUSIONS

Mutations in the residues N546 and K656 of FGFR1 lead to constitutive activation of the tyrosine kinase receptor and downstream RAS-MAPK signalling, contributing to transformation, and can be targeted by a number of oral inhibitors: notably,

The recent clinical development of irreversible FGFR inhibitors (TAS-120, AZD4547...) open new therapeutic opportunities in this population.



Mutazioni a carico dei residui N546 e K656 di FGFR1 possono essere target di nuovi farmaci inibitori tirosin kinasici e aprire quindi a nuove strategie terapeutiche

UPDATE on MLG

Acta Neuropathologica (2018) 135:639–642
<https://doi.org/10.1007/s00401-018-1826-y>

CORRESPONDENCE



cIMPACT-NOW update 2: diagnostic clarifications for *diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant* and *diffuse astrocytoma/anaplastic astrocytoma, IDH-mutant*

David N. Louis¹ · Caterina Giannini² · David Capper³ · Werner Paulus⁴ · Dominique Figarella-Branger⁵ · M. Beatriz Lopes⁶ · Tracy T. Batchelor⁷ · J. Gregory Cairncross⁸ · Martin van den Bent⁹ · Wolfgang Wick^{10,11,12} · Pieter Wesseling^{13,14}

Received: 21 February 2018 / Accepted: 23 February 2018 / Published online: 1 March 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Aggiornamento classificazione WHO riguardo
sia i GLM che gli astrocitomi

UPDATE on MLG

The definition of an entity using a specific mutation naturally draws attention to the diagnostic utility of the mutation. As a result, over the past few years, a number of tumors that are not diffuse midline gliomas have been reported with the same H3 K27M mutation, including ependymomas, pilocytic astrocytomas, pediatric diffuse astrocytomas, and gangliogliomas [3, 4, 6, 12–16, 18]. Notably, however, these appear to have substantially varied clinicopathological features, i.e., not forming a distinct entity, and not enough is known about the prognostic significance of finding H3 K27M mutations in these other tumors. For example, cases of pilocytic astrocytoma and diffuse astrocytoma have been reported with 10-year survivals [4, 18]. For these reasons, Working Committee 3 felt that the term *diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant* should be reserved for tumors that are *diffuse* (i.e., infiltrating), *midline* (e.g., thalamus, brain stem, spinal cord, etc.), *gliomas* and *H3 K27M-mutant*, and should not be applied to other tumors that are H3 K27M-mutant.

E' stata dimostrata la presenza della mutazione K27M anche in altri tipi tumorali però la terminologia «glioma diffuso della linea mediana, K27M-mutato» deve essere utilizzata solo per tumori gliali diffusi, a carico di strutture della linea mediana e mutati K27M e non ad altri tumori con questa mutazione.

UPDATE on MLG

The use of H3 K27M-mutant specific immunohistochemistry is useful to identify the mutation and specifically for diagnosis of *diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant*. Given the wide availability of the mutant-specific antibody, it is likely that additional tumors will be reported with H3 K27 mutations. Nonetheless, H3 K27M immunohistochemistry needs to be interpreted carefully; in particular, care must be given to recognizing positive nuclear staining in neoplastic cells, and to avoiding mistakenly calling cytoplasmic staining in macrophages and/or microglia positive. Another antibody that has been used to guide diagnosis of these tumors is to H3 K27me3 (trimethylated). H3 K27me3 immunohistochemistry, however, should only be used in conjunction with H3K27M immunohistochemistry, since loss of H3 K27me3 expression is by itself not specific [1, 2].

Inoltre, la valutazione della mutazione mediante immunoistochimica deve essere interpretata correttamente valutando la sola positività nucleare nelle cellule neoplastiche. L'utilizzo della colorazione IIC per la proteina trimetilata deve essere utilizzata in combinazione con quella contro la proteina mutata e non da sola.