

CONTROLLO DI QUALITA' (CONCORDANZA DIAGNOSTICA) MUTAZIONI SOMATICHE GENE IDH1

A cura di: Susanna Cappia, Sara Orecchia

Approvato dal Gruppo di Studio sulla Patologia Molecolare

Coordinatori: Paola Francia di Celle, Tiziana Venesio

Partecipanti:

Renzo Boldrini, Susanna Cappia, Elda Feyles, Doriana Giustetto,
Genny Jocollé, Antonella Maffè, Caterina Marchiò, Narciso Mariani,
Raffaella Morettini, Sara Orecchia, Roberta Patetta, Anna Sapino,
Stefano Taraglio, Silvana Ungari, Claudia Veggiani, Marco Volante.

INTRODUZIONE

La famiglia di enzimi dell'isocitrato deidrogenasi (IDH)

La famiglia di enzimi dell'isocitrato deidrogenasi (IDH) comprende tre isoforme situate nel citoplasma e nei perossisomi (IDH1) e nei mitocondri (IDH2 e IDH3).

Gli enzimi IDH sono coinvolti in una serie di processi cellulari, inclusi la fosforilazione ossidativa mitocondriale, il metabolismo del glutammato, la lipogenesi, la regolazione del glucosio e dello stato redox della cellula.

IDH1 e IDH2 sono proteine altamente simili, entrambe catalizzano la decarbossilazione ossidativa reversibile dell'isocitrato ad alfa-ketoglutarato (α KG), riducendo NADP + a NADPH, mentre IDH3 catalizza la conversione da isocitrato dipendente da NAD + in α KG nel ciclo acido tricarbossilico (ciclo TCA).

I geni IDH1 e IDH2 si trovano rispettivamente sul cromosoma 2q33.3 e 15q26.1.

Le mutazioni nei geni IDH1 e IDH2 sono state identificate in sottogruppi di pazienti affetti da tumori maligni solidi e ematologici, incluso glioma, leucemia mieloide acuta, colangiosarcoma e condrosarcoma.

Quasi tutte le mutazioni IDH sono mutazioni puntiformi somatiche in eterozigosi nei siti attivi degli enzimi IDH1 e IDH2.

Gli enzimi IDH-mutati acquisiscono l'attività enzimatica neomorfa, convertendo NADPH e α KG a NADP + e D-2-idrossiglutarato (D-2HG), un metabolita che si accumula ad elevati livelli nelle cellule IDH mutanti.

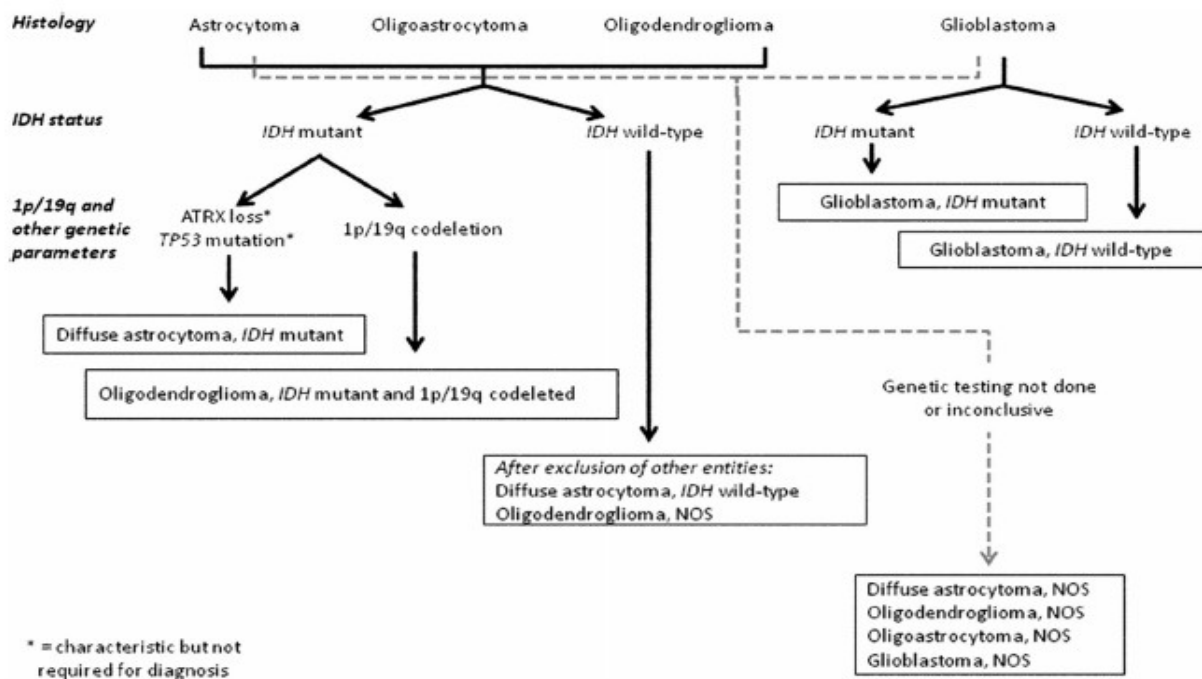
L'eccesso di D-2HG inibisce enzimi chiave coinvolti nella de-metilazione degli istoni e del DNA, portando ad una ipermetilazione che modifica l'espressione genica e la proliferazione delle cellule mutanti.

Il gene IDH nei Gliomi

I gliomi sono un insieme di tumori che originano dalle cellule gliali, cellule che circondano e supportano le cellule nervose (NCI 2013).

Nel 2016 la World Health Organization Classification dei tumori del sistema nervoso centrale ha introdotto una nuova classificazione di questi tumori sia concettuale che pratica rispetto alla precedente del 2007.

Per la prima volta, la classificazione OMS dei tumori del CNS utilizza parametri molecolari in aggiunta all'istologia per classificare i gliomi diffusi, in particolare:



da :David N. Louis, Arie Perry, Guido Reifenberger , Andreas von Deimling, Dominique FigarellaBranger,

Mutazioni di IDH1

Le mutazioni IDH1 si verificano nel 32% dei casi di glioma (COSMIC), si tratta di mutazioni puntiformi nell'esone 4 ed in particolare a carico dell'arginina in posizione 132 .

(Abel, T., K. Aldape, S. Clark, C. Vnencak-Jones, B. Mobley. 2015. IDH1 in Glioma. My Cancer Genome <https://www.mycancergenome.org/content/disease/glioma/idh1/>).

In ordine di frequenza le mutazioni conosciute sono:

IDH1 c.395G> A (p.R132H) Frequenza della mutazione: 87,6% (COSMIC);

IDH1 c.394C> T (p.R132C) Frequenza della mutazione: 2.9% (COSMIC);

IDH1 c.394C> G (p.R132G) Frequenza della mutazione: 2.3% (COSMIC);

IDH1 c.394C> A (p.R132S) Frequenza della mutazione: 1,8% (COSMIC);

La frequenza delle mutazioni varia nei sottogruppi di Classificazione dei tumori del SNC secondo WHO (Ref Hartmann et al Acta Neuropathol 2009).

Mutazioni di IDH2

IDH2 è mutato nell'1,7% dei casi di glioma (COSMIC).

Le mutazioni IDH2 rappresentano il 5-10% di tutte le mutazioni IDH nello glioma.

(Dang, Jin e Su 2010 Abel, T., K. Aldape, S. Clark, C. Vnencak-Jones, B. Mobley. 2014. IDH2 in Glioma. Genome del mio cancro <https://www.mycancergenome.org/content/disease/glioma/idh2/>).

IDH2 c.514A> G (p.R172G) Frequenza della mutazione: 2.7% (COSMIC);

IDH2 c.514A> T (p.R172W) Frequenza della mutazione: 8,2% (COSMIC);

IDH2 c.515G> A (p.R172K) Frequenza della mutazione: 58,2% (COSMIC);



IDH2 c.515G> T (p.R172M) Frequenza della mutazione: 19,1% (COSMIC);

IDH2 c.516G> C (p.R172S) Frequenza della mutazione: 3,6% (COSMIC);

IDH2 c.516G> T (p.R172S) Frequenza della mutazione: 3,6% (COSMIC).

La frequenza delle mutazioni varia nei sottogruppi di Classificazione dei tumori del SNC secondo WHO (Ref Hartmann et al Acta Neuropathol 2009).

CONTROLLO DI QUALITA' ANALISI MUTAZIONALE

GENE IDH1

Data l'importanza della valutazione delle mutazioni del gene IDH nella diagnosi dei gliomi e vista l'assenza di programmi di controllo di qualità esterni di tipo commerciale utilizzabile in tutti i centri che svolgono indagini di Patologia Molecolare della Rete Oncologica Piemonte e Valle d'Aosta, il Gruppo di Studio Patologia Molecolare ha costruito un proprio programma di controllo di concordanza così strutturato:

- I quattro centri in cui si svolgono tali test, ha identificato previa valutazione morfologica da parte di un Patologo del Centro partecipante, 4 campioni idonei a test di analisi mutazionale somatica.
Ha quindi prodotto due gruppi identici di campioni (gruppo A e gruppo B) ognuno formato di 4 provette identiche contenenti ognuna sezioni di un caso a stato mutazionale noto per il gene IDH.
- Alla presenza dei componenti del Gruppo di Studio Patologia Molecolare è stata prelevata a caso una provetta del gruppo A e una del gruppo B dai sacchetti di ogni centro in modo da formare 4 nuovi assemblamenti contenenti ognuno una provetta A e B provenienti da ogni centro.
- I campioni sono stati consegnati ad ogni centro partecipante per l'analisi.
- E' stato scelto un centro non tra i partecipanti a cui inviare entro un mese i risultati prodotti

per IDH1 e come valutazione opzionale IDH2.

I risultati inviati sono indicati nella tabella sottostante:

CONTROLLO DI QUALITA' (test di concordanza) GENE IDH1 (NM_005896.3 NP_005887.2)

	AL1	AL2	CN1	CN2	NO5	NO6	TO7	TO8	Tecnica utilizzata
ALESSANDRIA	c.395G>A p.R132H MUTATO		c.395G>A p.R132H MUTATO	c.395G>A p.R132H MUTATO		c.395G>A p.R132H MUTATO	c.395G>A p.R132H MUTATO		Pyrosequenziamento LOD 10%
CUNEO	c.395G>A p.R132H MUTATO		c.395G>A p.R132H MUTATO	c.395G>A p.R132H MUTATO		c.395G>A p.R132H MUTATO	c.395G>A p.R132H MUTATO		sequenziamento diretto LOD 20%
NOVARA	c.395G>A p.R132H MUTATO		c.395G>A p.R132H MUTATO	c.395G>A p.R132H MUTATO		c.395G>A p.R132H MUTATO	c.395G>A p.R132H MUTATO		sequenziamento diretto LOD 30%
TORINO	c.395G>A p.R132H MUTATO		c.395G>A p.R132H MUTATO	c.395G>A p.R132H MUTATO		c.395G>A p.R132H MUTATO	c.395G>A p.R132H MUTATO		Pyrosequenziamento LOD 10% conferma mutati Sanger

CONTROLLO DI QUALITA' OPZIONALE(test di concordanza) GENE IDH2 (NM_002168.3 NP_002159.2)

	AL1	AL2	CN1	CN2	NO5	NO6	TO7	TO8	Tecnica utilizzata
ALESSANDRIA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
CUNEO	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
NOVARA	WILD TYPE	WILD TYPE	WILD TYPE	WILD TYPE	WILD TYPE	WILD TYPE	WILD TYPE	WILD TYPE	sequenziamento diretto LOD 30%
TORINO	WILD TYPE	WILD TYPE	WILD TYPE	WILD TYPE	WILD TYPE	WILD TYPE	WILD TYPE	WILD TYPE	Pyrosequenziamento LOD nd conferma mutati sanger

Commento sui risultati del CQ

Dall'analisi dei risultati tabulati nelle precedenti tabelle, si evince una concordanza del 100 % tra i centri partecipanti sia nella definizione dello stato

Wilde Type rispetto allo stato mutato sia in questo ultimo caso, nell'identificazione della specifica mutazione presente (codifica nucleotidica e aminoacidica).

REFERENZE

Cairns R, Mak T. Oncogenic isocitrate dehydrogenase mutations: mechanisms, models, and clinical opportunities. Cancer Discovery 2013; 3: 730-41.

Dang L, Yen K, Attar EC. IDH mutations in cancer and progress toward development of targeted therapeutics. Ann Oncol 2016; 27: 599 – 608.

Mondesir J, Willekens C, Touat M, *et al.* IDH1 and IDH2 mutations as novel therapeutic targets: current perspectives. Journal of Blood Medicine 2016; 7: 171-80.

Dang L, White DW, Gross S, *et al.* Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. Nature 2009; 462(7274):739-44.

Xu W, Yang H, Liu Y, *et al.* Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenase. Cancer Cell 2011; 19(1):17-30.

Zhao S, Lin Y, Xu W, *et al.* Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 α . Science 2009; 324(5924):261-5.

Grassian AR, Parker SJ, Davidson SM, *et al.* IDH1 mutations alter citric acid cycle metabolism and increase dependence on oxidative mitochondrial metabolism. Cancer Res 2014; 74(12):3317-31.

Figuerola M, Abdel-Wahab O, Lu C, *et al.* Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. Cancer Cell 2010; 18: 553-67.

Turcan S, Rohle D, Goenka A, *et al.* IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylation phenotype. Nature 2012; 483: 479–83.

Parsons D, Jones S, Zhang X, *et al.* An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. Science 2008; 321: 1807–12.

Yan H, Parsons D, Jin G, *et al.* IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. N Engl J Med 2009; 360: 765-773.

Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, *et al.* IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. Am J Pathol 2009; 174: 1149-53.

Hartmann C1, Meyer J, Balss J, *et al.* Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related

to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. Acta Neuropathol 2009; 118: 469-74.

Cancer Genome Atlas Research Network, Brat D, Verhaak R, Aldape K, *et al.* Comprehensive, integrative genomic analysis of diffuse lower-grade gliomas. N Engl J Med 2015; 372: 2481-98.

Bai H, Harman AS, Erson-Omay EZ, *et al.* Integrated genomic characterization of IDH1-mutant glioma malignant progression. Nat Genet 2016; 48(1):59-66.

Weller M, van den Bent M, Hopkins K, *et al.* EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. Lancet Oncol 2014; 15: 395-403.

Stupp R, Brada M, van den Bent M, *et al.* High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 2014;25 (Suppl 3).

Sanson M, Marie Y, Paris S, *et al.* Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. J Clin Oncol 2009; 27: 4150-54.

Hartmann C, Hentschel B, Wick W, *et al.* Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. Acta Neuropathol 2010; 120(6):707-18.

Van den Bent M, Dubbink H, Sanson M, *et al.* MGMT promoter methylation is prognostic but not predictive for outcome to adjuvant PCV chemotherapy in anaplastic oligodendroglial tumors: a report from EORTC Brain Tumor Group Study 26951. J Clin Oncol 2009; 27: 5881-6.

Wick W, Meisner C, Hentschel B, *et al.* Prognostic or predictive value of MGMT promoter methylation in gliomas depends on IDH1 mutation. Neurology 2013; 81:1515-22.

Molenaar R, Verbaan D, Lamba S, *et al.* The combination of IDH1 mutations and MGMT methylation status predicts survival in glioblastoma better than either IDH1 or MGMT alone. Neuro Oncol 2014; 16: 1263-73.

Cairncross JG, Wang M, Jenkins RB, *et al.* Benefit from procarbazine, lomustine, and vincristine in oligodendroglial tumors is associated with mutation of IDH. J Clin Oncol 2014; 32(8):783-90.