

Summary & Samenvatting

SUMMARY

Gliomas are the most common type of primary malignant brain tumors. Several subtypes of glioma are recognized by the World Health Organization (WHO), based on histological and molecular criteria. The WHO classification of brain tumors was updated in 2016 and in this thesis the results of several studies on classification and clinical management of lower-grade glioma in the context of these updated WHO criteria are described. In **chapter 1**, the general introduction, we provide an overview of the WHO 2016 criteria and current clinical management of low-grade glioma.

In **chapter 2** we analyzed the publically available whole exome sequencing data of the *Cancer Genome Atlas* (TCGA) of both low and high grade glioma, to find additional markers of prognosis within WHO 2016 recognized glioma subgroups. We investigated all genes that were mutated at a population frequency of more than 1.7% and frequent chromosomal imbalances. In the entire dataset 57 genes were significantly correlated with overall survival. *IDH1/2* mutations showed the lowest hazard ratio, confirming *IDH1/2* is the most important prognostic marker in diffuse gliomas. With subsequent subgroup analysis, we found that within *IDH* mutated astrocytomas, mutations in *PI3* kinase genes *PIK3CA* and *PIK3R1*, are associated with poorer prognosis (median OS 3.7 vs. 6.3 years; $P=0.02$; HR 2.93; 95% CI 1.16-7.38). We also demonstrated that tumor grade remains an independent prognostic factor within molecular subgroups and found that tumor grade is correlated with mutational load.

In **chapter 3** we report on a study wherein we assessed the prognostic relevance of additional mutations and copy number alterations in a consecutive series of *IDH* mutated grade II glioma. In univariate analysis we found a significant shorter overall survival in *IDH* mutated astrocytoma patients with a trisomy of chromosome 7, and in oligodendroglioma patients with a *PTEN* mutation, but could not confirm these findings in multivariate analysis. We could also not confirm the impact of loss of 9p21.3 on overall survival, which is frequently reported as progression marker in high grade glioma. However, we need lengthy follow-up for definitive conclusions.

In **chapter 4** we report on a relatively large group of *IDH*-wildtype low-grade and anaplastic gliomas, which are recognized as a single entity and do not require further stratification according to the current WHO classification. We showed that this is actually a molecular and clinical heterogeneous group of tumors, which requires additional molecular testing beyond *IDH1/2*, in order to accurately estimate prognosis and guide treatment. Only 52.7% of patients showed a phenotype with trisomy of chromosome 7 and loss of 10q, which is a molecular characteristic of glioblastoma. Except one patient, all of these also had a *TERT* promoter mutation. 18.9% of patients had only a *TERT* promoter mutation, and had even a poorer prognosis than patients with the classical molecular characteristics of glioblastoma. More importantly, approximately

20% of patients did not have any of the investigated molecular aberrations, and had a significant better outcome.

In **chapter 5** we describe a study wherein we assessed the impact of extent of surgery on outcome in molecularly defined low grade glioma. As the WHO classification of gliomas has been completely revised and is now predominantly based on molecular criteria, the impact of extent of resection needed to be re-evaluated in molecularly defined low grade glioma. We included 228 adult patients who underwent surgery for a supratentorial low-grade glioma and semi-automatically assessed pre- and post-operative tumor volumes. In multivariable analysis, postoperative tumor volume was inversely correlated with overall survival (HR 1.01 per cm^3 increase in volume; 95% CI 1.002-1.02; $P = 0.016$). Therefore, our data supports maximal resection as first-line treatment for low-grade glioma. The impact of even small tumor residues was particularly strong in *IDH* mutated astrocytomas, where even small postoperative volumes already negatively affect overall survival.

In **chapter 6**, we focused on the timing of surgery and the impact on outcome in presumed low-grade glioma, but with a set-up wherein we tried to indication and selection bias that was present in previous studies. We retrospectively identified a cohort of patients in good clinical condition with a presumed low-grade glioma that was eligible for an extensive resection. We compared outcome between three types of treatment strategies: a wait-and-scan strategy, a biopsy, or early resection. We observed no difference in overall survival for early resection compared to wait-and-scan (HR 0.92; 95% CI 0.43-2.01; $p = 0.85$). Biopsy as initial treatment strategy was associated with a significant shorter overall survival compared to wait-and-scan (HR 2.69; 95% CI 1.19-6.06; $P = 0.02$).

In **chapter 7**, we provide insight in the location distribution of specific WHO molecular subgroups of glioma in the human brain. We created heatmaps of anatomic location per WHO molecular subgroup of the patients described in **chapter 5**. We showed there are both differences and similarities in spatial distribution between WHO subgroups. We found a significant predilection for *IDH* mutated low-grade gliomas in the rostral extensions of the anterior lateral ventricles and for *IDH* wildtype astrocytomas in the basal ganglia of the right hemisphere.

Finally, **chapter 8** discusses the main findings of **chapters 2 to 7** and put these results in perspective with recent literature.

SAMENVATTING

Gliomen zijn de meest voorkomende vorm van primaire kwaadaardige hersentumoren. Primair wil zeggen dat deze tumoren ontstaan in het hersenweefsel zelf, een wezenlijk verschil met tumoren die elders in het lichaam ontstaan en soms uitzaaien naar de hersenen. Gliomen ontstaan uit het steunweefsel dat alom aanwezig is in de hersenen, de zogenaamde gliale cellen. Glioom is een overkoepelende term voor de verscheidenheid aan verschillende subtypen die worden onderscheiden door de World Health Organization (WHO) in de WHO classificatie van hersentumoren. De WHO classificatie wordt wereldwijd toegepast voor de indeling van gliomen in verschillende subtypen en deze vormt een leidraad bij het instellen van de juiste behandeling en het informeren van de patiënt over de prognose. De basis van deze classificering was oorspronkelijk de beoordeling van enkele gedefinieerde kenmerken van het tumorweefsel (histologie) onder de microscoop door de patholoog. De afgelopen jaren is er echter steeds meer bekend geworden over de onderliggende DNA mutaties en chromosomale afwijkingen in de tumor, en het is gebleken dat gliomen nauwkeuriger zijn in te delen in subtypen op basis van deze moleculaire kenmerken. De WHO classificatie van hersentumoren werd daarom gereviseerd in 2016, en de subtypering van gliomen vind nu naast alleen histologische criteria, ook plaats op basis van moleculaire criteria. Bij discrepanties tussen de histologische en de moleculaire kenmerken binnen een tumor zijn de moleculaire kenmerken leidend voor het bepalen van het type glioom. De nieuwe criteria hebben in de praktijk geleid tot een verschuiving van diagnostische groepen en dit heeft consequenties voor de dagelijkse praktijk, gezien behandeling en prognose gekoppeld zijn aan deze classificatie. Het is derhalve noodzakelijk om enkele aspecten van bijvoorbeeld de behandeling te her-evalueren in het kader van de nieuwe classificatie. In dit proefschrift worden de resultaten van verschillende studies beschreven naar de prognosestelling en chirurgische behandeling van laaggradige gliomen in de context van deze gereviseerde classificatie. In **hoofdstuk 1**, de algemene inleiding, wordt een overzicht gegeven van de WHO criteria en de huidige behandeling van laaggradige gliomen.

Hoofdstuk 2 beschrijft een analyse van *The Cancer Genome Atlas*: een openbare database met genetische en klinische gegevens van een groot cohort van laag- en hooggradige gliomen. De doelstelling van deze studie was het identificeren van additionele prognostische moleculaire markers binnen de door de WHO 2016 erkende glioom subtypen. We onderzochten frequent voorkomende chromosomale afwijkingen en alle genen met een mutatiefrequentie in de populatie van meer dan 1.7%. In totaal waren 57 genen significant gecorreleerd met overleving. Mutaties in het *IDH1/2* gen waren geassocieerd met de laagste hazard ratio (HR) (relatieve kans op overlijden bij een mutatie in het betreffende gen, ten opzichte van geen mutatie), wat bevestigt dat

een mutatie in het *IDH1/2* gen de belangrijkste prognostische marker is bij diffuse gliomen. Middels een subgroep analyse toonden we aan dat mutaties in *PI3* kinase genen *PIK3CA* en *PIK3R1* bij *IDH* gemuteerde astrocytomen geassocieerd zijn met een slechtere prognose (mediane overleving 3.7 vs. 6.3 jaar; $P = 0,02$; HR 2,93; 95% CI 1.16-7.38). We toonden ook aan dat tumorgraad (een score van 1-4 die de mate van agressiviteit aangeeft) nog steeds een onafhankelijke prognostische factor is binnen de gedefinieerde moleculaire subgroepen, en dat tumorgraad gecorreleerd is met het aantal DNA mutaties in de tumor.

In **hoofdstuk 3** onderzochten we de prognostische waarde van frequent voorkomende DNA mutaties en chromosomale afwijkingen in een grote groep van *IDH* gemuteerde graad II gliomen. Trisomie van chromosoom 7 in *IDH* gemuteerde astrocytomen en een mutatie in het *PTEN* gen in oligodendrogliomen waren geassocieerd met een slechtere prognose. We konden dit echter niet bevestigen in een analyse gecorrigeerd voor andere prognostische factoren. Ook vonden we geen impact op de prognose van verlies van een deel van chromosoom 9, 9p21.3, wat regelmatig wordt gerapporteerd als marker van progressie in hooggradige gliomen. Langere follow-up is echter nodig voor definitieve conclusies.

In **hoofdstuk 4** beschrijven we een grote groep van *IDH*-wildtype (geen mutatie in het *IDH* gen) laaggradige en anaplastische gliomen en toonden aan dat deze groep tumoren zowel moleculair als klinisch zeer heterogeen is. Slechts 52,7% van de patiënten bleek namelijk een fenotype met trisomie van chromosoom 7 en verlies van chromosoom 10q te hebben, wat een moleculair kenmerk is van een glioblastoom (de meest agressieve vorm van gliomen). Behoudens één patiënt hadden al deze patiënten ook een *TERT* promotor mutatie. 18,9% van de patiënten had alleen een *TERT* promotor mutatie en had zelfs een slechtere prognose dan patiënten met de klassieke moleculaire kenmerken van een glioblastoom (trisomie chromosoom 7 en verlies 10q). Een belangrijke bevinding was dat ongeveer 20% van de patiënten geen van de onderzochte mutaties of chromosomale afwijkingen had, en dit was geassocieerd met een aanzienlijk langere overleving. Uit deze gegevens blijkt dat aanvullende moleculaire diagnostiek naast onderzoek naar het *IDH1/2* gen noodzakelijk is voor een adequate inschatting van prognose en starten van een juiste behandeling.

In **hoofdstuk 5** onderzochten we de mogelijke associatie tussen de uitgebreidheid van de operatieve resectie en de prognose bij laaggradige gliomen geclassificeerd volgens de WHO 2016 classificatie. De revisie van de WHO classificatie in 2016 maakte het noodzakelijk om de rol van chirurgie opnieuw te evalueren. We includeerden 228 volwassen patiënten die een operatie hadden ondergaan voor een supratentorieel gelokaliseerd laaggradig glioom. We onderzochten de uitgebreidheid van de resectie door het pre- en postoperatief tumorvolume semi-automatisch te bepalen. In een multivariabele analyse was het postoperatieve tumorvolume omgekeerd evenredig

gecorrleerd met totale overleving (HR 1.01 per cm^3 toename van het postoperatief volume; 95% CI 1.002-1.02; $P = 0.016$). Deze resultaten ondersteunen een maximale resectie als eerstelijnsbehandeling voor laaggradige gliomen. Het effect van postoperatieve tumorrest was met name sterkt in *IDH* gemuteerde astrocytomen, waarin zelfs zeer kleine postoperatieve tumorvolumes al een negatief effect hadden op de overleving.

Hoofdstuk 6 richt zich op de timing van de operatie en het effect op de overleving bij tumoren die op beeldvorming verdacht zijn voor een laaggradig glioom. Middels een unieke studieopzet hebben we geprobeerd de indicatie- en selectiebias te voorkomen die aanwezig is in eerdere studies naar de timing van chirurgie. In een retrospectief cohort van patiënten in goede klinische conditie met een vermoedelijk laaggradig glioom op beeldvorming, en die in aanmerking kwamen voor een uitgebreide operatie, vergeleken we de resultaten tussen drie soorten behandelstrategieën: de zogenaamde wait-and-see benadering, een biopsie of een vroege resectie. We vonden geen verschil in de totale overleving voor vroege resectie in vergelijking met de wait-and-see benadering (HR 0.92; 95% CI 0.43-2.01; $p = 0.85$). Biopsie als eerste behandelstrategie was geassocieerd met een aanzienlijk kortere totale overleving in vergelijking met wait-and-see (HR 2.69; 95% CI 1.19-6.06; $P = 0.02$).

In **hoofdstuk 7** geven we inzicht in de anatomische locatie van de door de WHO 2016 erkende subtypen van laaggradige gliomen. Dit door middel van het genereren van heatmaps van de anatomische locatie per WHO 2016 subgroep van de patiënten beschreven in **hoofdstuk 5**. We toonden dat elk subtype een verschillend patroon van anatomische verdeling heeft, maar ook dat er overlap bestaat tussen subtypen. *IDH* gemuteerde laaggradige gliomen komen vaker voor anterieur van de laterale hersenkamers, en *IDH* wildtype laaggradige gliomen zijn significant vaker gelokaliseerd in de basale kernen van de rechter hemisfeer.

Ten slotte bespreken we de belangrijkste bevindingen van **hoofdstukken 2 tot en met 7** en plaatsen deze in perspectief met recente literatuur in **hoofdstuk 8**.