

Aus der Neurologischen Universitätsklinik Tübingen
Abteilung Neurologie mit interdisziplinärem Schwerpunkt
Neuroonkologie

**Retrospektive vergleichende longitudinale Analyse
eines Patientenkollektivs mit multiplen rezidivierenden
Meningeomen der WHO-Grade I-III**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Korn, Martin Sebastian

2022

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. Dr. G. Tabatabai

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Singer

Tag der Disputation: 08.06.2022

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Meningeome.....	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Morphologie.....	2
1.1.3 Klassifikation	2
1.1.4 Klinik.....	4
1.1.5 Diagnostik.....	5
1.1.6 Therapie.....	6
1.2 Genetik und Exomanalyse bei Meningeomen.....	9
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	12
2 Material und Methoden	14
2.1 Patientenkollektiv.....	14
2.2 Proben.....	21
2.2.1 DNA-Isolierung und Qualitätskontrolle.....	22
2.3 Exomanalyse.....	22
2.4 Bioinformatische Datenauswertung.....	23
2.4.1 Downstream Datenanalyse und Visualisierung von SNV.....	23
2.4.2 Kopienanzahlvariationenanalyse.....	24
2.4.3 HLA Typisierung und MHC-I Peptid Voraussage.....	24
2.4.4 Tumormutationslast (TMB).....	25
2.5 Immunohistochemische Färbung.....	25
3 Ergebnisse	27
3.1 Heterogenes Verteilungsmuster der Einzelnukleotid-Varianten.....	27
3.2 Kopienzahlvariationen in der Studienkohorte.....	33
3.3 Vorausgesagte Peptid Präsentation und Tumormutationslast.....	35
3.4 Immunohistochemische Untersuchung von Patienten mit NF2 Mutationen	39
4 Diskussion	46
4.1 Heterogenität in Einzelnukleotid-Varianten und Tumorsubklonen.....	47
4.2 Kopienzahlvarianten bei rezidivierenden Meningeomen.....	48

4.3 NF2 und andere bisher bekannte charakteristische Mutationen bei Meningeomen.....	49
4.4 Neoepitope als Angriffspunkt für Immuntherapien.....	50
4.5 Grenzen und Schlussfolgerung.....	51
5 Zusammenfassung	52
6 Literaturverzeichnis.....	54
7 Erklärung des Eigenanteils.....	64
8 Danksagung.....	65

Tabellenverzeichnis

Zuordnung WHO Grad zum histologischen Subtypen.....	3
Klinische Daten Patientenkollektiv.....	15
HLA-Subtypen des Patientenkollektivs.....	36
Scoring Abbildung 20.....	45
Scoring Abbildung 21.....	45

Abbildungsverzeichnis

Klinischer Verlauf MEN01	16
Klinischer Verlauf MEN02.....	17
Klinischer Verlauf MEN03.....	17
Klinischer Verlauf MEN04.....	18
Klinischer Verlauf MEN06.....	18
Klinischer Verlauf MEN07.....	19
Klinischer Verlauf MEN08.....	19
Klinischer Verlauf MEN09.....	20

Klinischer Verlauf MEN10.....	21
Anzahl der mutierten Gene pro Tumorprobe	28
Verschiedene SNV Arten pro Patient/Probe.....	29
Wiederholtes Auftreten von SNVs im Krankheitsverlauf eines Patienten.....	30
Auftreten von SNVs in allen Proben eines Patienten.....	31
Verteilung der SNVs auf die Chromosomen	32
CNV Verteilung auf die Chromosomen.....	34
Vorausgesagte Neopeptide pro Tumorprobe.....	37
Tumormutationslast der Tumorproben.....	38
NF2 Mutationen bei MEN01, MEN02 und MEN07.....	40
Mutationen im PI3K/AKT/mTOR Signalweg bei MEN09.....	41
Repräsentative immunohistochemische Färbung von pAKT, pmTOR und pS6 der Tumorproben der Patienten MEN01, MEN03, MEN07.....	43
Repräsentative immunohistochemische Färbung von pAKT, pmTOR und pS6 der Tumorproben des Patienten MEN09.....	44

Abkürzungsverzeichnis

ZNS	Zentrales Nervensystem
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation)
HPF	Haupt Gesichtsfeld
CT	Computertomographie
DVT	Digitale Volumetomographie
MRT	Magnetresonanztomografie
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
DOTATATE	gallium-68-labeled dodecanetraacetic acid–tyrosine-3-octreotate
DOTATOC	DOTA-(Tyr ³)-octreotide
SPECT	Singlephotonen-Emissionscomputertomographie
SUV	standardized uptake value
PRRT	Peptidvermittelte Radiorezeptorthherapie
DNS/DNA	Desoxyribonukleinsäure/Deoxyribonucleic acid
Gy	Grey
OS	Overall Survival
PFS	Progressionsfreies Intervall (Progression-free survival)
SNV	Einzelnukeotid-Variante (Single Nucleotide Variation)
SNP	Einzelnukeotid-Polymorphismus (Single Nucleotide Polymorphism)
CNV	Kopienzahlvariation (Copy Number Variation)
WES	Whole Exome Sequenzierung
NGS	Next Generation Sequencing
HLA	Humanes Leukozytenantigen System (Human Leukocyte Antigens)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
TMB	Tumormutationslast (Tumor Mutational Burden)
TMA	Tissue-Mikroarray
CC2	Cell Conditioning 2
ROC	Receiver operating characteristic

1 Einleitung

1.1 Meningeome

Meningeome sind extraaxiale Tumore, deren Zellen eine große Ähnlichkeit mit den Deckzellen der Arachnoidea mater haben. Diese Deckzellen sind die Ursprungszellen der Meningeome. (Kepes, 1986, Drummond et al., 2004)

Die Meningeome sind mit einem Anteil von 36% die häufigsten Tumore des zentralen Nervensystems(ZNS) und mit anteilig 54% auch die häufigsten nicht malignen Tumore des zentralen Nervensystems. (Ostrom et al., 2015)

Entstehen können Meningeome intrakraniell, intraspinal sowie in seltenen Fällen an ektopen Lokalisationen. Die häufigsten Lokalisationen bei Meningeomen sind die Konvexität (38,3%), suprasellär (8,4%), die Keilbeinflügel (7,3%), das Tentorium (5,8%) und der Kleinhirnbückenwinkel (5,6%). (Wang et al., 2013)

1.1.1 Epidemiologie

Die Inzidenz beträgt 7.86 pro 100,000 Einwohner und steigt mit dem Alter der Patienten an. Am niedrigsten ist sie in der Gruppe der 0- bis 14-Jährigen, während sie in der Gruppe der 65-Jährigen und älter am höchsten ist. Im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten des ZNS erkranken Frauen 2,5 mal häufiger an Meningeomen als Männer. Deutlich weniger signifikant ist der Geschlechterunterschied bei atypischen und anaplastischen Meningeomen verglichen mit den benignen Meningeomen (Ostrom et al., 2015)

Für das gehäufte Auftreten wird ein Zusammenhang mit den weiblichen Sexualhormonen über Progesteron- und Östrogenrezeptoren vermutet, konnte aber noch nicht eindeutig nachgewiesen werden. (Korhonen et al., 2006, Zong et al., 2014) Die genauen funktionellen Auswirkungen der von Meningeomen häufig ausgebildeten Progesteron- und Östrogenrezeptoren werden noch untersucht. (Wiemels et al., 2010) Auch die in einigen Fällen auftretende Wachstumsbeschleunigung des Meningeoms während der Schwangerschaft

wird mit diesen Hormonen in Verbindung gebracht. (Smith et al., 2005) In neueren Veröffentlichungen wird diese Sichtweise jedoch angezweifelt (Lusis et al., 2012) und die Hypothese aufgestellt, dass Prolaktin für diese Wachstumsbeschleunigung verantwortlich sei. (Laviv et al., 2016)

1.1.2 Morphologie

Mikroskopisch zeigen sich Meningeome bei einer geringen Vergrößerung als Anordnung runder bis länglicher Zellen, welche mit unterschiedlichen interzellulären Verbindungskomplexen verknüpft sind. (Jaskolski et al., 2012) Wirbelförmige Anordnungen der Zellen sind typisch. Makroskopisch stellen sich Meningeome meist rundlich und an der Dura anhaftend dar. Die Vaskularisierung von Meningeomen ist variabel, ebenso kann die Konsistenz sehr unterschiedlich sein und zwischen weich bis knochig liegen. (Drummond et al., 2004)

1.1.3 Klassifikation

Nach der aktuell gültigen Klassifikation der Tumore des zentralen Nervensystems der Weltgesundheitsorganisation (WHO) werden Meningeome in 3 Grade eingeteilt. (Louis et al., 2016) Hierbei machen Meningeome vom WHO Grad I mit 80% den deutlich größten Anteil aus, Meningeome vom WHO Grad II kommen in 15-20% und Meningeome vom WHO Grad III in 1-3% der Fälle vor. In der folgenden Tabelle werden die histologischen Subtypen im Verhältnis zum WHO Grad dargestellt. (Riemenschneider et al., 2006)

WHO Grad	Histologischer Subtyp
I	meningothelial, fibrös, transitional, psammomatös, angiomatös, mikrozystisch, sekretorisch, lymphoplasmazellreich, metaplastisch
II	atypisch, klarzellig, chondroid
III	anaplastisch, rhabdoid, papillär

Tabelle 1: Zuordnung WHO Grad zum histologischen Subtypen

Die am häufigsten diagnostizierten histologischen Subtypen bei Meningeomen vom WHO Grad I sind meningothelial, fibrös und transitional. Definiert werden sie durch ihren histologischen Subtypen und die Abwesenheit von Kriterien des anaplastischen Meningeoms. Sie können in die Dura mater, den Schädelknochen und in extrakranielle Kompartimente wie die Orbita oder in Weichgewebe infiltrieren. Abzugrenzen hiervon ist die Invasion des Hirnparenchyms, welche als Kriterium für atypische und anaplastische Meningeome gilt. Auch ein ansonsten benignes Meningeom wird bei Hirninfiltration als WHO Grad II definiert. Andere Kriterien für ein atypisches Meningeom sind vier bis 19 Mitosen pro 10 Haupt Gesichtsfelder (HPF) oder ein chondroider oder klarzelliger histologischer Typ. Weiteres Kriterium ist die Anwesenheit von mindestens drei von fünf histologischen Besonderheiten: erhöhte Zelldichte, auffällige Nucleoli, blattartiges Wachstum, Nekrosen und kleine Zellen mit großem Kern. Das anaplastische Meningeom weist zusätzlich ein destruktives Wachstum, zentrale Nekrosen mögliche Metastasierung und über 20 Mitosen pro HPF auf. Die Rezidivrate nach 5 Jahren bei Meningeomen vom WHO Grad I beträgt 5%. Bei Meningeomen vom WHO Grad II liegt sie hingegen bei 40% und bei Meningeomen vom WHO Grad III bei 50-80%. (Perry et al., 1997, Perry et al., 1999, Backer-Grondahl et al., 2012)

Die 5- und 10-Jahresüberlebensraten für Meningeome vom WHO Grad II betragen 78,4% und 53,3%. Für Meningeome vom WHO Grad III betragen diese Überlebensraten 44% und 14,2%. (Durand et al., 2009)

Für WHO Grad I Meningeome betragen die 5- und 10 Jahresüberlebensraten

91,5% beziehungsweise 81,4%. Nach 20 Jahren liegt die Überlebensrate bei 53,4%. Diese Werte fallen geringer aus als die normale Lebenserwartung der jeweiligen Altersgruppen. (van Alkemade et al., 2012)

Ein gesicherter Risikofaktor für die Entstehung von Meningeomen ist ionisierende Strahlung. Sowohl Überlebende der Atombombenexplosionen auf Hiroshima und Nagasaki, welche einer hohen Dosis ausgesetzt waren (Preston et al., 2002) als auch israelische Kinder deren Kopfhaut zur Behandlung von Tinea capitis mit gering dosierter Radiotherapie behandelt wurde (Sadetzki et al., 2002), weisen ein deutlich erhöhtes Risiko für Meningeome auf. In diesem Zusammenhang wird auch über zahnärztliche Röntgendiagnostik als Risikofaktor diskutiert, in bisherigen Studien kam es allerdings zu widersprüchlichen Ergebnissen. Aufgrund stark gesunkener Strahlendosen sind ältere Studien wenig aussagekräftig. Allerdings werden auch neue bildgebende Verfahren mit höherer Strahlenbelastung wie das Computertomographie (CT) oder Digitale Volumentomographie (DVT) vermehrt eingesetzt, weshalb das Thema weiterhin Relevanz hat. (Preston-Martin et al., 1989, Rodvall et al., 1998, Claus et al., 2012)

Ebenso ist die genetische Disposition wie zum Beispiel bei der Neurofibromatose 2 ein Risikofaktor. Als weitere Risikofaktoren werden Übergewicht (Shao et al., 2014), die Verwendung von Handys (Carlberg and Hardell, 2015), vorangegangene Schädel-Hirn-Traumata (Kuan et al., 2014), Rauchen (Fan et al., 2013a) und Hormonersatztherapien (Fan et al., 2013b, Schildkraut et al., 2014) diskutiert, deren Relevanz bisher nicht eindeutig nachgewiesen ist.

1.1.4 Klinik

Charakteristisch für diese Tumore ist ein meist langsames und gut abgegrenztes Wachstum, welches die anliegenden Hirnareale verdrängt und folglich auch den Hirndruck erhöhen kann. Meningeome können ein massives begleitendes Ödem auslösen. In seltenen anaplastischen Meningeomen kann

es auch zur Infiltration des Hirnparenchyms kommen und eine hohe Proliferationsrate vorhanden sein. (Louis et al., 2016)

Durch das häufig langsame und nicht infiltrative Wachstum werden Meningeome oft erst bei beträchtlicher Größe oder gar nicht symptomatisch. In Autopsien konnten bei 2,5% der Fälle ein zuvor symptomloses Meningeom festgestellt werden. (Nakasu et al., 1985)

Durch das langsame Wachstum setzen die Symptome schleichend ein, wodurch sie vom Patienten möglicherweise nicht wahrgenommen werden. Früh symptomatisch werden kleine Tumore dann, wenn sie ungünstig lokalisiert sind wie zum Beispiel am medialen Keilbeinflügel. Je nach Lokalisationen können Meningeome charakteristische Defizite erzeugen, welche durch Kompression der anliegenden Hirnareale entstehen. Abhängig von der Tumorgöße und dem begleitenden Ödem kann es auch zu Symptomen eines erhöhten Hirndrucks kommen. Allerdings können Kopfschmerzen auch bei kleinen Tumoren ohne erhöhten Hirndruck entstehen, was wahrscheinlich auf eine Reizung der Dura mater zurückzuführen ist. Eine weitere, häufige Möglichkeit der klinischen Symptomatik sind epileptische Anfälle. (Drummond et al., 2004)

1.1.5 Diagnostik

Die sichere Diagnose von einem Meningeom kann nur mittels einer histologischen Untersuchung erfolgen. Oft kann man aber durch Bildgebung mit CT und Magnetresonanztomografie (MRT) schon eine zuverlässige Verdachtsdiagnose stellen. Hierfür ist das MRT aufgrund der überlegenen Darstellung des Weichgewebes besser geeignet, wobei die CT zur zusätzlichen Darstellung von einer möglichen Knocheninfiltration oder von Hyperostosen zum Einsatz kommt. Dies führt zu einer Verbesserung des Operationsergebnisses und die Radiotherapie wird besser planbar. (Saloner et al., 2010b, Fathi and Roelcke, 2013)

In der CT stellt sich ein Meningeom, wenn man es mit dem Gehirn vergleicht, isodens dar. Manchmal kann es aber auch hyperdens oder leicht hypodens

erscheinen. Im MRT ist ein Meningeom mit ähnlicher Signalstärke wie die Großhirnrinde dargestellt. (Saloner et al., 2010a) In der T1-Gewichtung mit Kontrastmittel kann das Meningeom wegen der aufgehobenen Blut-Hirn-Schranke stark hervorgehoben werden. Das begleitende Ödem hingegen kann in der T2-Gewichtung gut dargestellt werden. Ebenso können durale Ausläufer im MRT gut dargestellt werden. Die so gewonnenen Informationen verbessern die Planung der Operation. Typische Signaländerungen zwischen T1 und T2 im MRT können eine Abgrenzung zu anderen Tumoren oder Läsionen ermöglichen. (Fathi and Roelcke, 2013)

Während die diagnostische Angiographie als Bildgebungsverfahren eher selten eingesetzt wird, ist sie in schwierigen Fällen zur operativen Planung und präoperativen Embolisation sehr nützlich. Eine solche präoperative Embolisation kann bei stark durchbluteten Tumoren das intraoperative und postoperative Risiko einer Blutung minimieren. (Jason Rockhill et al., 2007)

Eine weitere diagnostische Möglichkeit stellt die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) dar, welche zusätzlich molekulare Informationen bietet. Zur Diagnostik von Meningeomen werden hauptsächlich gallium-68-labeled dodecanetetraacetic acid-tyrosine-3-octreotate (DOTATATE) und DOTA-(Tyr³)-octreotide (DOTATOC) Radionucleotide verwendet. (Cornelius et al., 2012, Rachinger et al., 2015) Beide haben eine große Affinität zu Somatostatinrezeptoren vom Subtyp 2. Diese Rezeptoren sind häufig in Meningeomen enthalten. Diese PET Verfahren können eine bessere Trennung von Meningeom und normalem Gewebe ermöglichen (Rachinger et al., 2015) und sind die Grundlage für eine Somatostatin-Rezeptor-Therapie. (Sommerauer et al., 2016, Hanscheid et al., 2012)

1.1.6 Therapie

Um die richtige Behandlungsart für einen Patienten zu finden sind Symptome, Größe, Lokalisation des Meningeoms, das Alter und der gesundheitliche Zustand des Patienten relevant. Letztendlich muss auch der Patientenwunsch,

nach umfassender Aufklärung, respektiert werden.

Die wichtigste Behandlungsmethode für diesen Tumor ist die komplette chirurgische Entfernung. Eine Simpson Grad I Resektion ist mit der größten Progressionsfreiheit und Überlebensrate verbunden. (Jason Rockhill et al., 2007) Nach kompletter Entfernung des Meningeoms liegt die rezidivfreie Überlebensrate bei 93% nach 5 Jahren, 80% nach 10 Jahren und 68% nach 15 Jahren. Während nach einer Teilresektion des Tumors die Überlebensrate ohne Rezidiv 63% nach 5 Jahren, 45% nach 10 Jahren und 9% nach 15 Jahren beträgt. (René O. Mirimanoff et al., 1985)

Allerdings kann eine Komplettresektion in manchen Fällen nicht erreicht werden. Deshalb muss dann über eine anschließende Beobachtung, Radiotherapie oder in seltenen Fällen einer systemischen Therapie nach Teilresektion in interdisziplinärer Herangehensweise nachgedacht werden. Als Standard hat sich die Radiotherapie bei Meningeomen im Falle von einem Resttumor oder einem nicht resektablen Tumor bei Erstdiagnose als auch bei nicht resektablen rezidivierenden oder progressiven Tumoren durchgesetzt. Ebenso standardmäßig bei WHO Grad II und Grad III. Der Zweck einer Radiotherapie ist die Erhaltung der neurologischen Funktionen bei Verlängerung eines rezidivfreien Überlebens. Zur Anwendung kommen fraktionierte externe Strahlentherapie, stereotaktische Radiochirurgie oder Schwerionenbestrahlung. (Fathi and Roelcke, 2013) Durch Bestrahlung von Meningeomen kann teilweise eine Größenreduktion erreicht werden, wobei eine komplette Remission mittels Bestrahlung nicht machbar ist. (Astner et al., 2010, Kondziolka et al., 2008)

Mit einer Radiotherapie geht immer die Gefahr von Komplikationen einher, welche gegen das Risiko eines symptomatischen Rezidivs und das Alter des Patienten abgewägt werden müssen. Andererseits können bei Schädelbasistumoren mit stereotaktischer Radiochirurgie gute Ergebnisse mit geringer Morbidität erzielt werden. (Flannery et al., 2010, Attia et al., 2012)

Zudem besteht die Möglichkeit einer systemischen Therapie mit Zytostatika oder einer zielgerichteten Therapie. Das Tumorwachstum soll bei der

zielgerichteten Therapie durch Inhibition von Hormonrezeptoren, der Angiogenese oder eines Signalwegs unterdrückt oder umgekehrt werden. Hierbei handelt es sich um keine Standardtherapie, sondern wird bei Patienten mit ansonsten ausgeschöpftem Behandlungspotential, im Sinne einer individualisierten Therapie, angewendet. (Fathi and Roelcke, 2013) Der Anteil der Meningeome, die Somatostatinrezeptoren ausbilden, liegt bei 70%, weshalb sie für eine zielgerichtete Therapie von Interesse sind. (Schulz et al., 2000) Ebenso sind diese Rezeptoren interessant, weil sie mittels Singlephotonen-Emissionscomputertomographie(SPECT) und PET dargestellt werden können. (Henze et al., 2005) Eine Somatostatin-Rezeptor-Therapie wird mit einem radioaktiv markierten Peptid welches an die Somatostatinrezeptoren bindet durchgeführt. Die Wirkung kommt durch konzentrierte Abgabe von Betastrahlung im Tumorgewebe zustande. Abhängig ist die Wirksamkeit von der Aufnahme der Peptide durch den Tumor. (Marincek et al., 2015) Diese Aufnahmefähigkeit kann schon diagnostisch durch beispielsweise ein DOTATATE-PET bestimmt werden, da der standardized uptake value (SUV) in diesem DOTATATE-PET direkt mit der späteren Aufnahmefähigkeit zusammenhängt. (Hanscheid et al., 2012)

Weitere Versuche eine systemische Therapieoption zu finden sind in Entwicklung. So wurde zum Beispiel in vitro eine Wirksamkeit von Trabectedin in Kombination mit Hydroxyurea, Cisplatin und Doxorubicin festgestellt. Trabectedin ist besonders wirkungsvoll bei Meningeomen eines hohen WHO Grades. Die Wirkung entfaltet es durch Induktion der Apoptose der Meningeomzellen. Eine synergistische Wirkung mit Hydroxyurea, Cisplatin und Doxorubicin tritt auf. (Preusser et al., 2012) In einer retrospektiven Studie wurden Patienten mit vorbehandelten Meningeomen untersucht. Durch die Gabe von Bevacizumab konnte ein progressionsfreier Zeitraum von 6 Monaten erreicht werden. (Lou et al., 2012) In einer anderen Studie wurde die Gabe von Bevacizumab mit Everolimus kombiniert und damit ein progressionsfreier Intervall von durchschnittlich 22 Monaten erreicht. (Shih et al., 2016) Beide Studien waren auf Patienten mit WHO Grad II und III Meningeomen

ausgerichtet und die Teilnehmerzahl war gering. Die bisherigen Ergebnisse, welche allgemein durch systemische Therapie bei Meningeomen erzielt werden konnten, sind höchstens als mäßig zu bezeichnen. (Furtner et al., 2016)

Aufgrund des sehr langsamen Wachstums ist es möglich asymptomatische und kleine Meningeome nicht zu behandeln, sondern in regelmäßigen Abständen zu beobachten um ein Größenwachstum frühzeitig festzustellen. (Shigetoshi Yano et al., 2006)

1.2 Genetik und Exomanalyse bei Meningeomen

Meningeome scheinen, verglichen mit anderen Tumorarten, nur eine geringe Anzahl von somatischen Mutationen in bekannten krebsassoziierten Genen aufzuweisen. (Brastianos et al., 2013) Des Weiteren steigt die Häufigkeit von chromosomalen Auffälligkeiten zusammen mit dem histologischen Grad eines Meningeoms. Bei Meningeomen vom WHO Grad I wurden bei 33% der Verlust eines Chromosomenarmes, bei 9% der Verlust von 2 Chromosomenarmen und bei 14% der Verlust von 3 oder mehr Chromosomenarmen festgestellt. Im Vergleich dazu fehlen bei Meningeomen vom WHO Grad II in 25% der Fälle 2 Chromosomenarme und in 65% der Fälle 3 oder mehr Chromosomenarme. Alle Meningeome vom WHO Grad III wiesen einen Verlust von 3 oder mehr Chromosomenarmen auf. (Lee et al., 2010)

Das häufigste zytogenetische Ereignis bei Meningeomen ist eine Monosomie 22. Eine Veränderung auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 tritt am zweit häufigsten auf. (Zang, 2001) Zusätzlich kommen bei anaplastischen Meningeomen Allelverluste der Chromosomen 6p, 9p21, 10 und 14q vor, während bei atypischen Meningeomen die Chromosomen 1p, 6q, 9q, 10q, 14q, 17p, und 18q betroffen sind. (Shibuya, 2015)

Auch hier können Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Patienten festgestellt werden. So tritt eine Deletion von 1p36 bei Männern in 48% der Fälle und bei Frauen nur bei 16% auf. 14% der weiblichen Patienten wiesen einen Verlust vom X-Chromosom auf, während bei 26% der männlichen

Patienten ein Verlust vom Y-Chromosom auftritt. (Tabernerero et al., 2007) Ein weiterer Geschlechterunterschied konnte in der verringerten Expression von ELAVL4 festgestellt werden. (Stawski et al., 2013)

Bei dem NF2-Gen handelt es sich um ein Tumorsuppressorgen, das auf dem Chromosom 22q12 lokalisiert ist und für das Protein Merlin (moesin-ezrin-radixin-like protein) codiert. (Petrilli and Fernandez-Valle, 2016, Evans, 2009) (Rouleau et al., 1993) Aufgebaut ist das Protein Merlin aus drei Domänen. Am N-Terminus befindet sich eine FERM Domäne. Proteine, welche diese Domäne enthalten, stellen eine Verbindung des Aktin-Cytoskeletts mit den Plasmamembranproteinen dar. Darauf folgen eine alpha-Helix Domäne und einen C-Terminale Domäne. (Trofatter et al., 1993) Merlin kann in verschiedenen Konformationen mit verschiedenen Aktivierungszuständen vorliegen. Diese werden über posttranslationale Modifikationen gesteuert. (Tang et al., 2007)

Das Fehlen oder eine starke Reduzierung von Merlin konnte mittels Western blot in 78,6% der sporadisch aufgetretenen Schwannome, in 37,5% der sporadisch aufgetretenen Ependydome und in 84% der sporadisch aufgetretenen Meningeome nachgewiesen werden. (Gutmann et al., 1997)

Der Verlust von Merlin tritt auch in bösartigen Tumoren auf. Hierbei ist das Mesothliom mit einer Inzidenz von 41% (Sekido et al., 1995) und das Glioblastom mit einer Inzidenz von 32% (Morales et al., 2010) zu nennen. In anderen häufigen malignen Tumoren ist das Auftreten einer NF2-Mutation gering. Durch Mutation des NF2-Gens und somit der Inaktivierung von Merlin kann es zur Entwicklung von gut- und bösartigen Schwannomen und Meningeomen sowie von Ependydomen kommen. Deswegen kann vermutet werden, dass es sich bei solch einer Mutation um ein frühes Ereignis einer Tumorentstehung oder auch um einen gewebespezifischen Prozess handeln könnte. (Sekido et al., 1995, Petrilli and Fernandez-Valle, 2016)

Die genauen Funktionen von Merlin sind noch nicht nachgewiesen, allerdings sind einige Signalwege bekannt an denen Merlin beteiligt ist. Zunächst inhibiert Merlin das Wachstum einer Zelle, indem es sowohl an ihren CD44-Rezeptor

bindet als auch dessen Funktion negativ reguliert. Weiterhin inhibiert Merlin den PI3K/mTORC1/Akt Signalweg und spielt auch eine Rolle in der Aktivierung des Hippo-Signalwegs. (Petrilli and Fernandez-Valle, 2016)

Bei Patienten mit Neurofibromatose Typ 2 tritt mit hoher Wahrscheinlichkeit mindestens ein Meningeom in ihrem Leben auf. (Smith et al., 2011)

In fast allen Meningeomen bei NF2-Patienten liegt ein funktionsloses NF2-Gen vor. Auch Meningeome, welche nicht mit der Neurofibromatose 2 assoziiert sind, tragen häufig eine Mutation des NF2-Gens. Diese Häufigkeit hängt auch vom histologischen Typ des Tumors ab. So weisen fibröse oder transitionale Meningeome zu 80% eine NF2-Mutation auf, während meningotheliale Subtypen nur zu 20% eine solche tragen. (Riemenschneider et al., 2006) Auch anaplastische und atypische Meningeome erreichen ein ähnlich hohes Auftreten von NF2-Mutationen, das vergleichbar mit dem der fibrösen und transitionalen histologischen Subtypen ist. (Shibuya, 2015)

TRAF7, AKT1, SMO, KLF4, PIK3CA, BAP1 und POLR2A sind Gene, welche mutiert in Verbindung mit Meningeomen gebracht werden. TRAF7 codiert für eine apoptosefördernde Ubiquitin-E3-Ligase, AKT1 für einen Schlüsseffektor des PI3K Signalwegs, SMO für einen negativen Regulator des Hedgehog-Signalwegs, KLF4 für 3 C2H2 Zinkfinger-Motive, PIK3CA für Teile von PI3K, BAP1 für das BRCA associated protein-1 und POLR2A für die größte Untereinheit der RNA-Polymerase II.

PIK3CA, AKT1 und KLF4 treten öfters in Kombination mit TRAF7 auf. (Clark et al., 2013, Abedalthagafi et al., 2016) TRAF7, AKT1, SMO, KLF4, PIK3CA, BAP1 und POLR2A Mutationen wurden nur festgestellt, wenn keine NF2-Mutation vorliegt. TRAF7, SMO, BAP1 und POLR2A kommen nur exklusiv voneinander vor. Sie stellen also getrennte Subtypen von Meningeomen dar. (Clark et al., 2013, Brastianos et al., 2013, Clark et al., 2016b, Shankar and Santagata, 2017)

Die Mutation E17K im AKT1-Gen wurde in verschiedenen Tumorentitäten festgestellt und löst in diesen eine Aktivierung von AKT1 aus. In Tumoren des zentralen Nervensystem hingegen treten AKT1E17K-Mutationen nur bei

Meningeomen auf. (Sahm et al., 2013)

Das Mutationsprofil eines Meningeoms hängt auch mit der anatomischen Lage und den histologischen Subtypen zusammen. So liegen Meningeome mit einem funktionslosen NF2-Gen oder Verlust des 22. Chromosoms am häufigsten in den Gehirnhälften, im Kleinhirn oder im Rückgrat. Bei Tumoren der Schädelbasis treten Meningeome mit einem funktionslosen NF2-Gen oder Verlust des 22. Chromosoms vor allem lateral oder posterior auf, während Meningeome mit anderen Mutationen sich größtenteils an der medianen Schädelbasis entwickeln. (Clark et al., 2013) Weiterhin treten Meningeome mit einer AKT1-Mutation bevorzugt an basalen und spinalen Lokalisationen auf (Sahm et al., 2013) während SMO-mutierte Meningeome häufig über der Lamina cribrosa vorkommen. (Brastianos et al., 2013) Bei Vorliegen einer POLR2A Mutation treten Meningeome häufiger in der Region um das Tuberculum sellae auf. (Clark et al., 2016b)

Auch zur Histologie können Aussagen getroffen werden. Sekretorische Meningeome können beispielsweise über Mutationen in den Genen TRAF7 und KLF4 charakterisiert werden. (Reuss et al., 2013, Clark et al., 2013, Abedalthagafi et al., 2016) Bei Meningeomen welche eine Mutation des AKT1-Gens aufweisen werden vermehrt meningotheleale und translationale histologische Subtypen festgestellt. (Sahm et al., 2013) Meningeome mit einem rhabdoiden histologischen Erscheinungsbild weisen öfters BAP1 Mutationen auf. (Shankar and Santagata, 2017) SMARCE1 ist eine weitere Mutation welche im Bezug zum histologischen Subtypen relevant ist. Bei klarzelligem Meningeomen konnten SMARCE1 Mutationen sowohl bei spinaler als auch bei kranialer Lokalisation nachgewiesen werden. (Smith et al., 2014)

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die bisher bekannten und oben beschriebenen häufigen genetischen Mutationen wurden von Brastianos et al. und Clark et al. mittels Exomsequenzierung des Tumormaterials und einem Vergleich mit der normalen

Desoxyribonukleinsäure(DNS) der Patienten gewonnen. (Brastianos et al., 2013, Clark et al., 2013) Auch wurden schon Studien (Balasubramanian et al., 2017) und case reports (Juratli et al., 2015) zum longitudinalen Verlauf von Meningeomen durchgeführt. Allerdings gibt es nur wenige Untersuchungen der genetischen Veränderungen rezidivierender Meningeome im longitudinalen Verlauf. Das Ziel dieser Arbeit ist ein besseres Verständnis der Tumorbilogie rezidivierender Meningeome unabhängig von deren WHO Grad zu gewinnen.

2 Material und Methoden

Es handelt sich hierbei um eine retrospektive Arbeit, welcher das Ethikvotum erteilt wurde. (Aktenzeichen 827/2016BO2)

2.1 Patientenkollektiv

Das hier verwendete Patientenkollektiv besteht aus 9 Patienten. Insgesamt wurden 37 Tumorproben dieser Patienten untersucht. Alle ausgewählte Patienten leiden an rezidivierenden, intrakraniellen Meningeomen vom WHO Grad I - III. Aufgenommen wurden die Patienten unabhängig von histologischen Subtypen und der Lokalisation des Tumors im Gehirn. Bei 7 Patienten liegt nur eine Meningeommanifestation vor, die anderen Patienten weisen zwei auf. Das Geschlecht betreffend setzt sich das Kollektiv aus 2 Männern und 7 Frauen zusammen. Das durchschnittliche Alter bei Stellen der Erstdiagnose beträgt 51 Jahre. Die jüngste Patientin war zu diesem Zeitpunkt 36 und die älteste 74 Jahre alt. Die durchschnittliche Erkrankungsdauer beträgt 14 Jahre, wobei zwei der 9 Patienten verstorben sind. Die längsten Erkrankungsverläufe liegen bei der Patientin MEN01 mit 27 Jahren und beim Patienten MEN09 mit 20 Jahren vor. MEN06 war nur 3 Jahre und einen Monat erkrankt. Weiterhin beträgt die durchschnittliche Anzahl der Resektionen 4,5 pro Patient. Besonders häufig reseziert wurde bei MEN09 mit 11 Resektionen. Das Progressionsfreie Intervall(PFS) nach der ersten Resektion liegt bei 46 Monaten in diesem Kollektiv. Besonders lange Intervalle liegen bei MEN01 und MEN03 mit jeweils über 70 Monaten vor. Eine stereotaktische Radiotherapie wurde bei 6 Patienten in diesem Kollektiv durchgeführt. Eine Ganzhirnbestrahlung wurde nur bei dem Patienten MEN09, eine Cyberknife Bestrahlung nur bei MEN08 und eine Radionukleotid-Therapie nur bei den Patienten MEN03 und MEN01 durchgeführt. Ein PET wurde bei 5 der 9 Patienten gemacht. Bei Patient MEN09 liegt noch die Besonderheit anderer bösartiger Tumorerkrankungen und die Anwendung einer systemischen Therapie vor.

	MEN01	MEN02	MEN03	MEN04	MEN06	MEN07	MEN08	MEN09	MEN10
Alter bei Erst-diagnose	42	67	66	36	47	74	45	41	41
Geschlecht	W	W	W	W	M	W	W	M	W
Lokalisation	spheno- petroclival	frontale Konvexität	frontal	spheno- orbital	clival	parietal	supra- & infra- tentorial, cerebellum	frontal & temporal	sphenoidal & temporal
WHO Grad	I	II, I	II	I	II	II	I→II	I→II→III	I
Subtyp	fibro- blastisch	atypisch → Subtyp unbekannt	atypisch	meningo- thelial → transitional	atypisch	atypisch	transitional → ab 2. Resektion atypisch	atypisch, ab 8. Resektion ana- plastisch	meningo- thelial
Anzahl der Menin- geome	1	1	2	1	1	1	2	2	1
Anzahl der Resek- tionen	5	2	3	4	3	2	6	11	4
OS	> 27 Jahre, am Leben	> 10 Jahre, am Leben	> 10 Jahre, am Leben	> 13 Jahre, am Leben	3 Jahre, tot	> 9 Jahre, am Leben	> 15 Jahre, am Leben	20 Jahre, tot	19 Jahre, am Leben
Ganzhirn- Photonen- Bestrah- lung	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	60 Gy, nach 2. Resektion	Nein
Photonen Strahlen- therapie	Fraktioniert ,Gesamt- dosis 54Gy	Nein	Fraktioniert, 24x2.5 Gy, Gesamt- dosis 60 Gy	Einzeldosis 14 Gy + fraktioniert, Gesamt- dosis 50.4 Gy	Nein	Dosis unbekannt	Fraktioniert, 30 x 2.0 Gy, Gesamt- dosis 60 Gy	Nein	Gesamt- dosis 13 Gy + orbitale Bestrah- lung , Gesamt- dosis 54Gy
Schwer- ionen- bestrah- lung	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	51 GyE	51 GyE nach 8. Resektion	Nein
Cyber- knife	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	15 Gy	Nein	Nein
PET	max. SUV bis zu 4.9	Nein	max. SUV 4.1	keine max.SUV gemessen, focal erhöhte Somato- statin Aufnahme	Nein	Nein	max. SUV 2.5	max. SUV 1.5 (1 st PET) & 3.0 (2 nd PET)	Nein
PRRT	Ja	Nein	Nein	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Andere systemische Therapien	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Ja, Everolimus & Lapatinib	Nein
Nachweis anderer Tumore	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Ja, Blasen- und Colon- karzinom	Nein

Tabelle 2: Klinische Daten Patientenkollektiv

Abkürzungen: Gy, Grey; OS, overall survival; PET, Positronen Emissions Therapie; PRRT, Peptidvermittelte Radiorezeptorthherapie; SUV, standardized uptake value

Bei MEN01 handelt es sich um eine Patientin, bei der mit 42 Jahren die Erstdiagnose eines WHO Grad I Meningeoms in sphenopetroclivaler Lokalisation gestellt wurde.(Abbildung 1) In den darauffolgenden 23 Jahren wurde der Tumor der Patientin fünf Mal reseziert. Im Verlauf kam es zu keiner Veränderung des WHO Grades und des fibroplastischen Subtyps. Einer fraktionierte stereotaktische Bestrahlung wurde MEN01 drei Jahre nach der dritten Operation unterzogen. Nach erneutem Rezidiv wurde 7 Jahre nach der Radiotherapie für 21 Monate eine PRRT durchgeführt. Darauf folgend wurden noch zwei Rezidive festgestellt und reseziert. Mittlerweile lebt die Patientin schon 27 Jahre mit der Erkrankung.

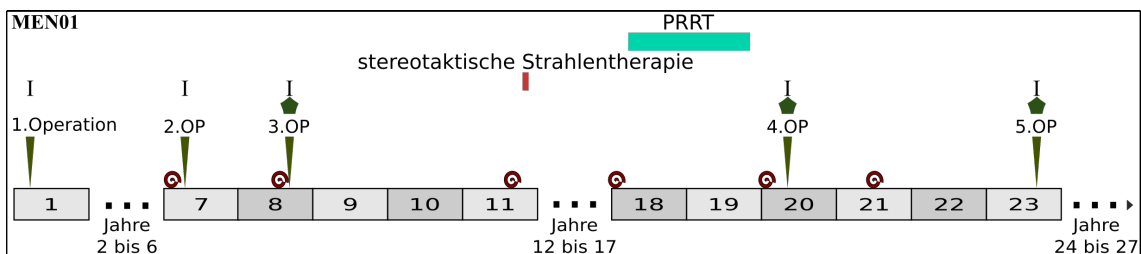


Abbildung 1: Klinischer Verlauf MEN01

Zeitlinie in Jahren; rote Kreise kennzeichnen Progress/Rezidiv; grüne Dreiecke kennzeichnen Resektionen, grüne Fünfecke verfügbare Tumorproben und festgestellter WHO Grad darüber; rote Balken zeigen Zeitabschnitt der Radiotherapie und türkise Balken Zeitabschnitt der PRRT

Bei der Patientin MEN02 wurde im Alter von 67 Jahren ein Meningeom in der frontalen Konvexität festgestellt.(Abbildung 2) Fünf Jahre später wurde eine Resektion dieses Meningeoms vorgenommen, welches als WHO Grad II (atypischer Subtyp) klassifiziert wurde. Noch einmal drei Jahre später wurde eine zweite Resektion durchgeführt. In der entsprechenden Histologie hat sich der WHO Grad auf 1 verringert.

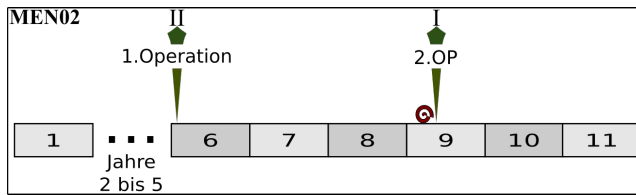


Abbildung 2: Klinischer Verlauf MEN02

Zeitlinie in Jahren; rote Kreise kennzeichnen Progress/Rezidiv; grüne Dreiecke kennzeichnen Resektionen, grüne Fünfecke verfügbare Tumorproben und festgestellter WHO Grad darüber

Bei der Patientin MEN03 wurde im Alter von 66 Jahren ein Meningeom links frontal diagnostiziert.(Abbildung 3) In den folgenden 8 Jahren wurde bei MEN03 drei Mal eine Resektion vorgenommen. Die histologische Untersuchung ergab bei allen Resektionen einen WHO Grad II (atypisch). Bei der 2. Resektion wurde zusätzlich ein WHO Grad I Meningeom entfernt. Ein Jahr nach der zweiten Operation wurde aufgrund eines Rezidivs dieses einer Radiotherapie unterzogen. Im darauffolgenden Jahr wurde die letzte Operation durchgeführt. Danach kam es erneut zu einem Rezidiv.

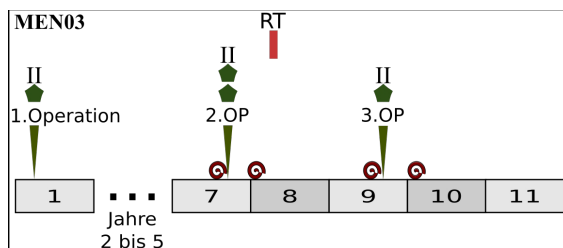


Abbildung 3: Klinischer Verlauf MEN03

Zeitlinie in Jahren; rote Kreise kennzeichnen Progress/Rezidiv; grüne Dreiecke kennzeichnen Resektionen, grüne Fünfecke verfügbare Tumorproben und festgestellter WHO Grad darüber; rote Balken zeigen Zeitabschnitt der Radiotherapie

Bei der Patientin MEN04 wurde erstmals, im Alter von 36 Jahren, ein WHO Grad I Meningeom links sphenoorbital diagnostiziert.(Abbildung 4) Die erste Resektion erfolgte ein Jahr später und in den nächsten 12 Jahren noch drei weitere. Alle histologischen Untersuchungen ergaben einen WHO Grad I. Der histologische Subtyp änderte sich von einem meningothelialen zu einem transitionalen. Zwei Jahre nach der ersten Operation wurde aufgrund eines

Rezidiv eine stereotaktische Einzelbestrahlung durchgeführt. Nach der dritten Operation wurde MEN04 einer fraktionierten Hochpräzisionsbestrahlung unterzogen. Nach der letzten Operation kam es zum erneuten Rezidiv.

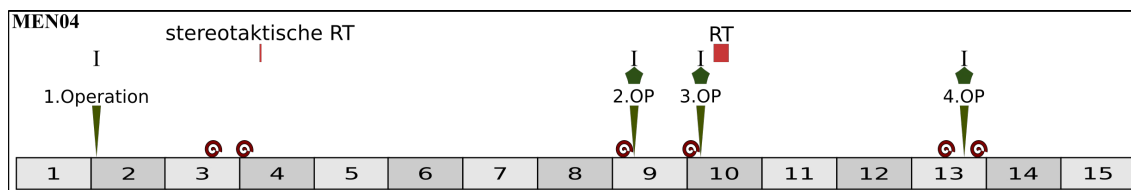


Abbildung 4: Klinischer Verlauf MEN04

Zeitlinie in Jahren; rote Kreise kennzeichnen Progress/Rezidiv; grüne Dreiecke kennzeichnen Resektionen, grüne Fünfecke verfügbare Tumorproben und festgestellter WHO Grad darüber; rote Balken zeigen Zeitabschnitt der Radiotherapie und türkise Balken Zeitabschnitt PRRT

Bei dem Patienten MEN06 wurde erstmals, im Alter von 47 Jahren, ein clivales WHO Grad II Meningeom diagnostiziert.(Abbildung 5) In den folgenden 37 Monaten wurde der Patient drei mal operiert, wobei sich der histologische Grad nicht geändert hat. Ein Monat nach der dritten Resektion verstarb der Patient.

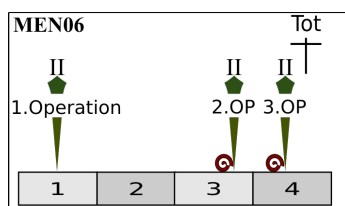


Abbildung 5: Klinischer Verlauf MEN06

Zeitlinie in Jahren; rote Kreise kennzeichnen Progress/Rezidiv; grüne Dreiecke kennzeichnen Resektionen, grüne Fünfecke verfügbare Tumorproben und festgestellter WHO Grad darüber; rote Balken zeigen Zeitabschnitt der Radiotherapie

Die Patientin MEN07 wurde mit 74 Jahren zum ersten Mal die Erkrankung mit einem WHO Grad II Meningeom am rechten Parietallappen diagnostiziert. (Abbildung 6) In den nächsten 9 Jahren wurde MEN07 zwei Resektionen unterzogen. Der histologische Befund hatte sich bei der zweiten Resektion nicht verändert. In den Jahren 2 und 3 nach dieser Resektion kam es nochmals zu Rezidiven.

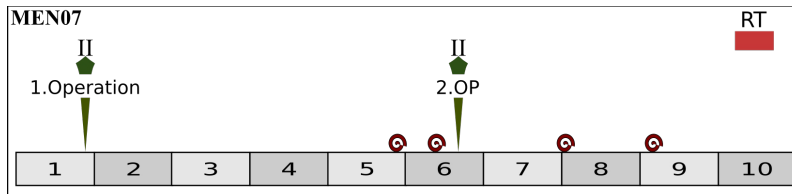


Abbildung 6: Klinischer Verlauf MEN07

Zeitlinie in Jahren; rote Kreise kennzeichnen Progress/Rezidiv; grüne Dreiecke kennzeichnen Resektionen, grüne Fünfecke verfügbare Tumorproben und festgestellter WHO Grad darüber; rote Balken zeigen Zeitabschnitt der Radiotherapie

Bei der Patientin MEN08 wurde im Alter von 45 Jahren ein Meningeom in supra/infratentorialer und zerebellärer Lokalisation diagnostiziert.(Abbildung 7) In den darauffolgenden 15 Jahren wurde die Patientin 6 Mal operiert. Zunächst hat es sich um ein transitionales Meningeom vom WHO Grad I gehandelt. Ab der zweiten und folgenden Resektionen wurde der Tumor als atypisch klassifiziert. Vier Jahre nach der ersten Resektion kam es zum Rezidiv mit darauffolgender Cyberknife Bestrahlung. Im auf die dritte Operation folgenden Jahr, wurde bei MEN08 eine stereotaktische fraktionierte Radiotherapie durchgeführt. Wiederum zwei Jahre später wurde die Patientin einer Schwerionenbestrahlung unterzogen. Die vorerst letzte Resektion wurde 15 Jahre nach Erstdiagnose durchgeführt.

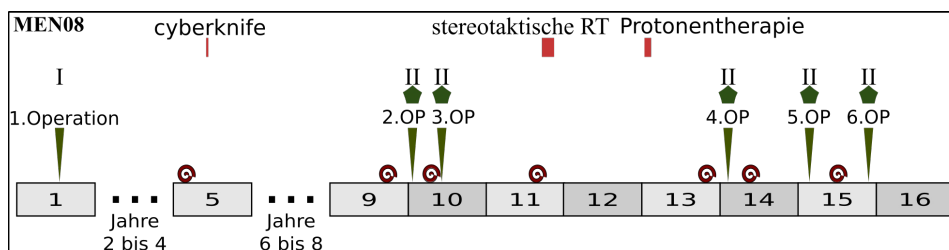


Abbildung 7: Klinischer Verlauf MEN08

Zeitlinie in Jahren; rote Kreise kennzeichnen Progress/Rezidiv; grüne Dreiecke kennzeichnen Resektionen, grüne Fünfecke verfügbare Tumorproben und festgestellter WHO Grad darüber; rote Balken zeigen Zeitabschnitt der Radiotherapie

Bei dem Patienten MEN09 wurde erstmals, im Alter von 41 Jahren, ein WHO Grad I Meningeom am linken Frontallappen diagnostiziert.(Abbildung 8) In den

darauffolgenden 20 Jahren verschlechterte sich der histologische Befund nach der 2. Operation zu atypisch und nach der 8. Operation zu anaplastisch. In diesen 19 Jahren wurde der Patient 11 Mal einer chirurgischen Resektion unterzogen. Weiterhin wurde bei MEN09 nach der 2. Operation eine Ganzhirnbestrahlung und nach der 8. Operation eine Schwerionenbestrahlung durchgeführt. Ein Somatostatin PET wurde nach der 9. und 10. Resektion durchgeführt. Allerdings lagen die standardized uptake values(SUV) bei 1,5 und bei 3,0 und waren nicht hoch genug für eine Radionukleotidtherapie. Nach 16 Jahren der Erkrankung hatte sich die Wachstumsgeschwindigkeit des Meningeoms stark erhöht, weshalb vier Resektionen in zwei Jahren nötig wurden. Nach der 10. Operation wurde eine Exomsequenzierung vorgenommen. Therapeutisch relevant waren hier Mutationen in NF2 und ALK. Immunhistochemische Untersuchungen ergaben eine Expression von mTOR und eine starke Expression von pS6. Darauf basierend wurde, nach Diskussion im Tumor Board, eine off-label Therapie mit dem mTor-Inhibitor Everolimus angefangen. Diese führte zu einer Stabilisierung des Tumorstadiums für 9,5 Monate. Nach dieser Periode wurde ein erneut beschleunigtes Tumorstadium festgestellt. Nach einer 11. Operation wurde die Behandlung palliativ weitergeführt. Der Patient verstarb im April 2016.

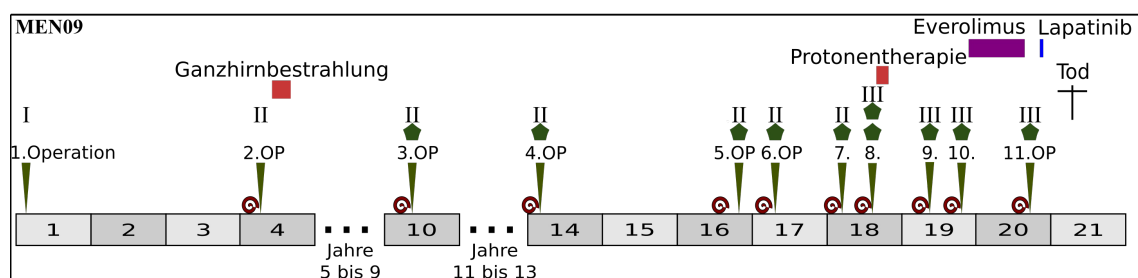


Abbildung 8: Klinischer Verlauf MEN09

Zeitlinie in Jahren; rote Kreise kennzeichnen Progress/Rezidiv; grüne Dreiecke kennzeichnen Resektionen, grüne Fünfecke verfügbare Tumorproben und festgestellter WHO Grad darüber; rote Balken zeigen Zeitabschnitt der Radiotherapie, violette Balken Zeitabschnitt Everolimus und blaue Balken Zeitabschnitt Lapatinib

Die Patientin MEN10 wurde mit 41 Jahren zum ersten Mal die Erkrankung mit einem WHO Grad I Meningeom diagnostiziert.(Abbildung 9) Die Erkrankung erstreckt sich bisher über 19 Jahre und in dieser Zeit wurde die Patientin vier mal operiert. Für dieses Meningeom wurde der histologische Subtyp meningothelial bestimmt. Im Verlauf wurde keine Veränderung des WHO Grad festgestellt. Nach der ersten, als auch der zweiten Operation wurde bei MEN10 eine Radiotherapie durchgeführt.

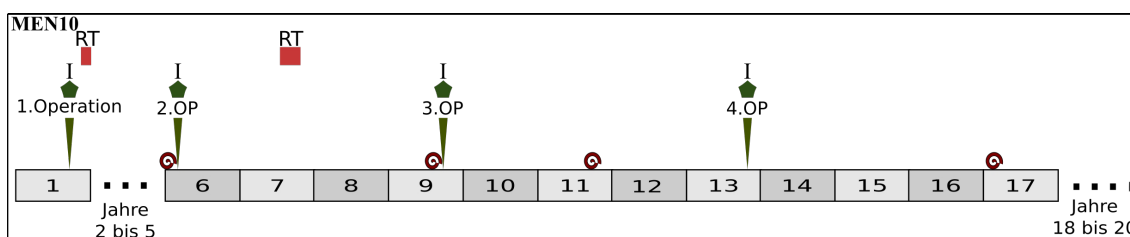


Abbildung 9: Klinischer Verlauf MEN10

Zeitlinie in Jahren; rote Kreise kennzeichnen Progress/Rezidiv; grüne Dreiecke kennzeichnen Resektionen, grüne Fünfecke verfügbare Tumorproben und festgestellter WHO Grad darüber; rote Balken zeigen Zeitabschnitt der Radiotherapie

Zur Visualisierung des klinischen Verlaufs wurde das Programm Inkscape (<https://inkscape.org/>) verwendet.

2.2 Proben

Es wurden 9 Vollblut-EDTA-Proben und 37 FFPE Tumorgewebeproben aus den Jahren von 1998 bis 2017 verwendet.

Für jeden Patienten wurden zwischen 2 und 9 Proben analysiert. Ausgeschlossen wurden hier zwei Proben welche unzureichende Qualität aufwiesen. Tumorproben aus den Jahren vor 1997 waren wegen Aufbewahrungsfristen nicht verfügbar.

2.2.1 DNA-Isolierung und Qualitätskontrolle

Sowohl die Blutproben als auch die Tumorgewebeproben wurden in klinisch indizierten Resektionen und mittels Standardverfahren gewonnen. Auf den Paraffinblöcken wurden Gewebeareale ausgewählt, welche unter dem Mikroskop ausreichend Tumoranteile zeigten(80%). Zur DNA Extraktion wurde das blackPREP FFPE Kit der Analytik Jena AG verwendet. Zur Gewinnung der Blut DNA wurde das innuPREP Blood DNA mini Kit von der Analytik Jena AG angewendet. Beide Verfahren wurden unter Berücksichtigung der Gebrauchsanweisungen und Herstellerangaben durchgeführt. DNA Quantität und Qualität wurden mit dem Qubit dsDNA BR Fluorometer(Thermo Fischer, Dreieich, Deutschland) und dem NanoDrop ND-8000(Thermo Fischer) bestimmt.

2.3 Exomanalyse

Es wurde eine vollständige Exomanalyse der isolierten DNA der 37 Tumorgewebeproben durchgeführt. Die aus den Blutproben gewonnene DNA wurde als Normalgewebereferenz herangezogen. Unter Berücksichtigung der Herstellerangaben wurden ILLUMINA HiSeq 3000 und HiSeq4000 zur Sequenzierung von 1 µg DNA pro Probe verwendet. Bei Gewebe- oder Blutproben mit einer verfügbaren DNA Menge zwischen 200ng und 1µg wurde ein spezielles Protokoll für wenig Eingabematerial benutzt. Zur Herstellung der Bibliotheken wurde SureSelectXT Library Prep Kit (Agilent, USA) verwendet. Zur in-solution-Anreicherung wurde SureSelectXT Human All Exon V6 (Agilent, USA) verwendet. 2x100bp wurden mit den Q30 Parametern 92.40, 93.99, 90.50, 92.92, 95.35 und 95.61 sequenziert.

Das Demultiplexen der sequenzierten Reads wurde mit dem Programm Illumina CASAVA (2.1.7) durchgeführt. Weggetrimmt wurden die Adapter mit Hilfe von Skewer (Version 0.1.116).(Jiang et al., 2014) Die so getrimmten Rohreads

wurden dann gegen ein menschliches Referenzgenom (hg-19 cegat) mittels dem Burrows-Wheeler Aligner (BWA-mem Version 0.7.2) abgeglichen. (Li and Durbin, 2009) Es wurden die pseudoautosomalen Regionen (PAR) des Y-Chromosoms (chrY:10001-2649520, chrY:59034050-59363566) auf dem Referenzgenom verdeckt. Damit wird sichergestellt, dass Reads welche auf diesen homologen Bereich der Chromosomen X und Y fallen, beim Mapping nicht verworfen werden. Denn Reads die mit demselben Mappingscore an mehreren Stellen des Genoms vorliegen, wurden verworfen. Außerdem wurden Reads die doppelt vorlagen und aller Wahrscheinlichkeit nach vom selben PCR-Amplicon herkommen mittels samtools (Version 0.1.18) entfernt. (Li et al., 2009b)

Das Erkennen der Varianten wurde mit dem Programm varscan (Version 2.4.2-cegat) (Koboldt et al., 2012) durchgeführt und technische Artefakte wurden aus der Liste gelöscht. Die danach noch verbleibenden Varianten wurden anhand verschiedener öffentlicher und interner Datenbanken analysiert.

2.4 Bioinformatische Datenauswertung

2.4.1 Downstream Datenanalyse und Visualisierung von SNV

Die Downstream Analyse und Visualisierung wurde in der R-Sprache (Version 3.4) (Team, 2016) mithilfe von Bioconductor Paketen wie BiomaRt (Durinck et al., 2009), ROCR (Sing et al., 2005), ggplot2 (Wickham, 2016), Pheatmap (Kolde, 2015) und tidyverse (Wickham) durchgeführt. Die kreisförmigen Abbildungen der Chromosomen wurden mit Circos (Krzywinski et al., 2009) erstellt. Die annotierten und gefilterten Varianten wurden einer Enrichment-Analyse unterzogen. Hierfür wurden Kontingenztabellen von numerischen Werten mit dem Exakten Test nach Fisher erstellt.

2.4.2 Kopienanzahlvariationenanalyse

Zur Identifikation von somatischen Kopienanzahlvariationen (CNV-Copy Number Variation) wurde Varscan2 (Koboldt et al., 2012) wie in der Varscan2 Dokumentation beschrieben verwendet. (<http://varscan.sourceforge.net/copy-number-calling.html>)

Samtools wurde benutzt um mpileup Dateien für alle Tumor-Kontroll Paare zu erstellen. Varscan2 copyCaller wurde verwendet um den GC-Gehalt anzupassen und vorläufige CNV Calls zu machen. DNACopy, ein Bioconductor Paket, wurde zur zirkulären, binären Segmentierung verwendet. Dieses Vorgehen dient zur Glättung und Segmentierung der vorläufigen Calls. (Seshan and Olshen, 2010) Die Segmente wurden mithilfe des Varscan2 Skripts mergeSegments.pl zusammengefügt. Es wurde ein angemessener Fold-Change Grenzwert festgelegt. So ist es möglich einen guten Kompromiss zwischen falsch positiven und tatsächlich positiven CNV Calls zu erhalten. Hierfür verwendet wurde eine Receiver operating characteristic (ROC) Herangehensweise. (Baskaran and Rödelsperger, 2015)

2.4.3 HLA Typisierung und MHC-I Peptid Voraussage

Um die HLA-Allele für jeden Patienten vorauszusagen, wurden Fastq Dateien der Blutproben benutzt. Yara mapper (Version 0.9.6) wurde in dessen Grundeinstellungen verwendet um zuvor qualitätskontrollierte Reads auf die HLA Regionen von Chromosom 6 zu mappen. (Siragusa et al., 2013) Die so gewonnenen Ergebnisdaten im BMA Format wurden mit dem samtools Programm bam2fq zu fastq Daten konvertiert. (Li et al., 2009a) Diese fastq Dateien wurden als Eingabe für OptiType (Szolek et al., 2014) verwendet um die HLA Allele zu bestimmen. Cbc wurde dabei als pyomo unterstützter ILP Solver verwendet. (Hart et al., 2011) OptiType benutzt einen ganzzahligen, linearen Programmalgorithmus um die 4 Stellen des HLA Typs unter Verwendung von NGS Daten zu bestimmen. Die Ausgaben von OptiType

wurden mit individuell angefertigten R Scripten analysiert.

Für die Voraussage der MHC-I Peptide wurde ein Epitome Prediction Workflow in FRED2 (Schubert et al., 2016) verwendet. Als Eingabe braucht FRED2 annotierte, gefilterte SNVs und die Ergebnisse der HLA Typisierung. Der Epitome Prediction Workflow konstruiert Peptide aus 8 bis 11 Aminosäuren mittels eines Schiebefensterprotokolls über der mutierten Position. Dann werden diese Peptide mit dem Programm Ensembl (84) und einer Human Proteome Reference (UniProt *UP000005640*) gefiltert. Danach werden Transkript Informationen basierend auf der Human Reference Database Version GRCh37 mit BioMart (<http://feb2014.archive.ensembl.org>) abgerufen und die HLA Bindung von Peptiden mit SYFPEITHI (Rammensee et al., 1999), netMHC (version 4.0) (Andreatta and Nielsen, 2015) und netMHCpan (version 3.0) (Nielsen and Andreatta, 2016) vorausgesagt. Nur Peptide die als echte Liganden von allen Programmen vorausgesagt wurden, wurden verwendet.

2.4.4 Tumormutationslast (TMB)

Die Tumormutationslast wurde berechnet indem die Anzahl der codierenden SNVs (synonyme und nicht synonyme SNVs) durch die Zahl der Mbs pro Exom geteilt wurde.

2.5 Immunohistochemische Färbung

Die für die DNA Isolierung auf den Paraffinblöcken ausgewählten Tumorregionen wurden ebenfalls für die Immunohistochemische Färbung herangezogen, um die Proteinexpression zu visualisieren. Diese Regionen wurden auf 4 Mikrometer geschnitten, entparaffiniert und mit einem automatisierten immunohistochemischen System (Benchmark XT, Ventana Medical Systems, Straßburg, Frankreich), mittels indirekter, biotinfreier Antikörpererkennung (Optiview DAB IHC detection kit; Roche, Basel, Schweiz), gefärbt.

Die Immunohistochemie wurde mit folgenden Einstellungen durchgeführt: CC2 Vorbehandlung für 32 Minuten und primäre Antikörperinkubation für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Folgende Antikörper wurden verwendet: Phospho-Akt (Ser473, 736E11, 1:50 verdünnt), Phospho-mTOR (Ser2448, 1:100) und phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser 235/236, 1:200, Vorbehandlung: 24 min) hergestellt von Cell Signaling (Denver, USA).

Beim Scoring der mTOR Immunohistochemie wurde basierend auf der prozentualen positiven Expression zwischen 0 (<10% der Zellen positiv), 1 (10-25% der Zellen positiv), 2 (25-50% der Zellen positiv), 3 (50-75% der Zellen positiv) und 4 (>75% der Zellen positiv) und Intensität der Färbung 0 (keine braune Färbung), 1 (hellste Braunfärbung der untersuchten Proben), 2 (untere Zwischenstufe), 3 (obere Zwischenstufe) und 4 (dunkelste Braunfärbung der untersuchten Proben) unterschieden. Beide Scores wurden zu einem Endergebnis zusammengefasst, welches mit Werten zwischen 0 und 8 ausgedrückt wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Heterogenes Verteilungsmuster der Einzelnukleotid-Varianten

Um longitudinale genetische Merkmale der in dieser Arbeit untersuchten Meningeome und mutierte Gene, die an der Rezidivneigung beteiligt sind festzustellen, wurde eine Exomanalyse durchgeführt. Bei einem Vergleich der so gewonnenen Daten von EDTA-Blut und Tumorgewebe wurden somatische Einzelnucleotid-Varianten bestimmt.

Betrachtet man die Gesamtheit der SNVs, synonyme und nicht synonyme SNVs zusammengenommen, ist diese heterogen auf die Tumorproben verteilt. Die Anzahl schwankt zwischen 1956 SNVs in der Probe MEN10-1 und 102 SNVs in der Probe MEN07-2. Durchschnittlich wurden 350 SNVs pro Tumorprobe festgestellt.

Auch die Anzahl der mutierten Gene ist uneinheitlich verteilt. (Abbildung 10) Hier liegt die Spanne der betroffenen Gene zwischen 52 und 378.

Das Verhältnis der Anzahl der SNVs zu der Anzahl mutierter Gene ist linear. So ist bei 80% nur ein SNV pro mutiertes Gen zu finden. Nur selten sind mehrere SNVs pro Gen zu finden.

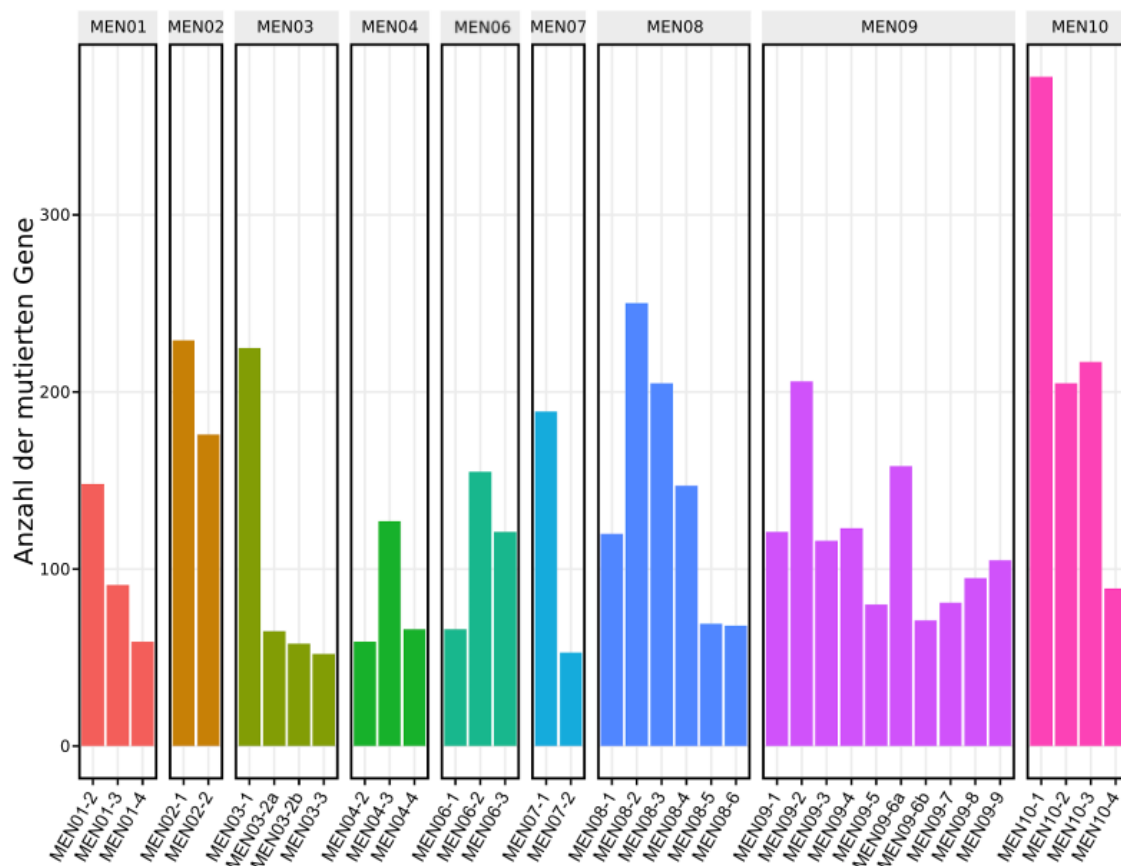


Abbildung 10: Anzahl der mutierten Gene pro Tumorprobe

Auf der x-Achse aufgetragen sind alle untersuchten Tumorproben in zeitlicher Staffelung pro Patient von links nach rechts. Die y-Achse zeigt die Anzahl der mutierten Gene.

Tendenziell nimmt die Zahl der betroffenen Gene mit späteren Resektionen ab, was mit einem Verlust von Tumor Subklonen erklärt werden könnte. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Anzahl der SNVs oder mutierter Gene und Schwere des klinischen Verlaufs festgestellt werden. Auch konnte kein Einfluss von Behandlungsmaßnahmen, wie Bestrahlungstherapie oder Chemotherapie, auf die Anzahl der SNVs nachgewiesen werden.

Weiter wurde der Anteil verschiedener Arten von Punktmutationen in den jeweiligen Tumorproben untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt.

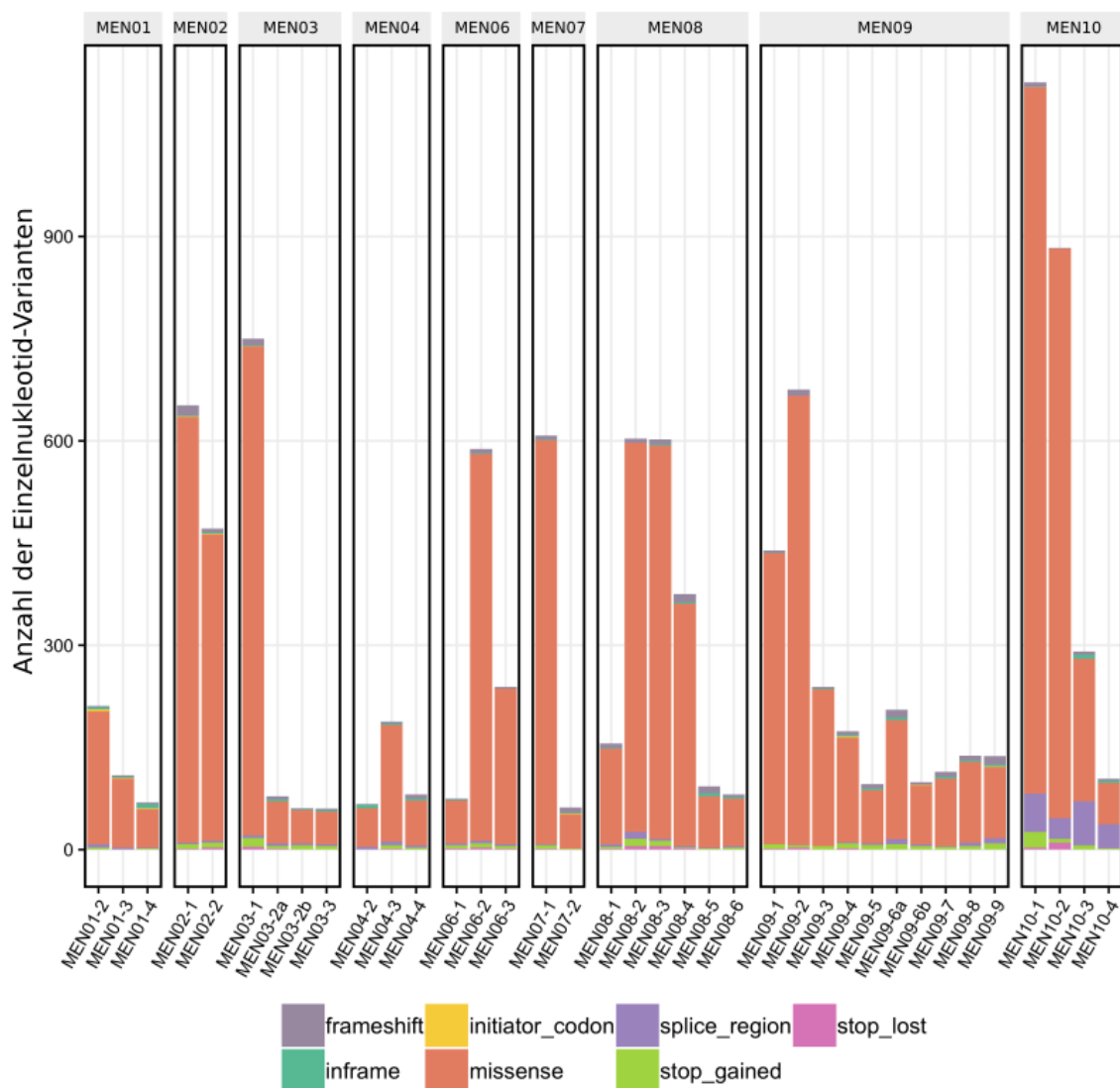


Abbildung 11: Verschiedene SNV Arten pro Patient/Probe

Auf der x-Achse aufgetragen sind alle untersuchten Tumorproben in zeitlicher Staffelung pro Patient von links nach rechts. Die y-Achse zeigt die Anzahl verschiedener nicht synonymen SNVs.

Ausgenommen in Abbildung 11 sind synonyme Mutationen. Auch die nicht synonymen SNVs sind in ihrer Anzahl heterogen auf die Tumorproben verteilt. Das Muster der Punktmutationsarten ist bei fast allen Proben sehr ähnlich. Missense Mutationen machen den größten Anteil aus. Frameshift und stop gained Mutationen kommen auch in allen Proben vor. MEN10 weist darüber hinaus in allen Tumorproben einen relativ großen Anteil an Splice region Mutationen auf.

Als Nächstes wurde ein wiederholtes Auftreten von SNVs im Krankheitsverlauf der Patienten untersucht.(Abbildung 12) Hierfür wurden die SNVs in drei Gruppen gegliedert. SNVs die in nur einer Tumorprobe vorkommen, SNVs die in mehr als einer Probe vorkommen und SNVs die in allen Proben vorkommen.

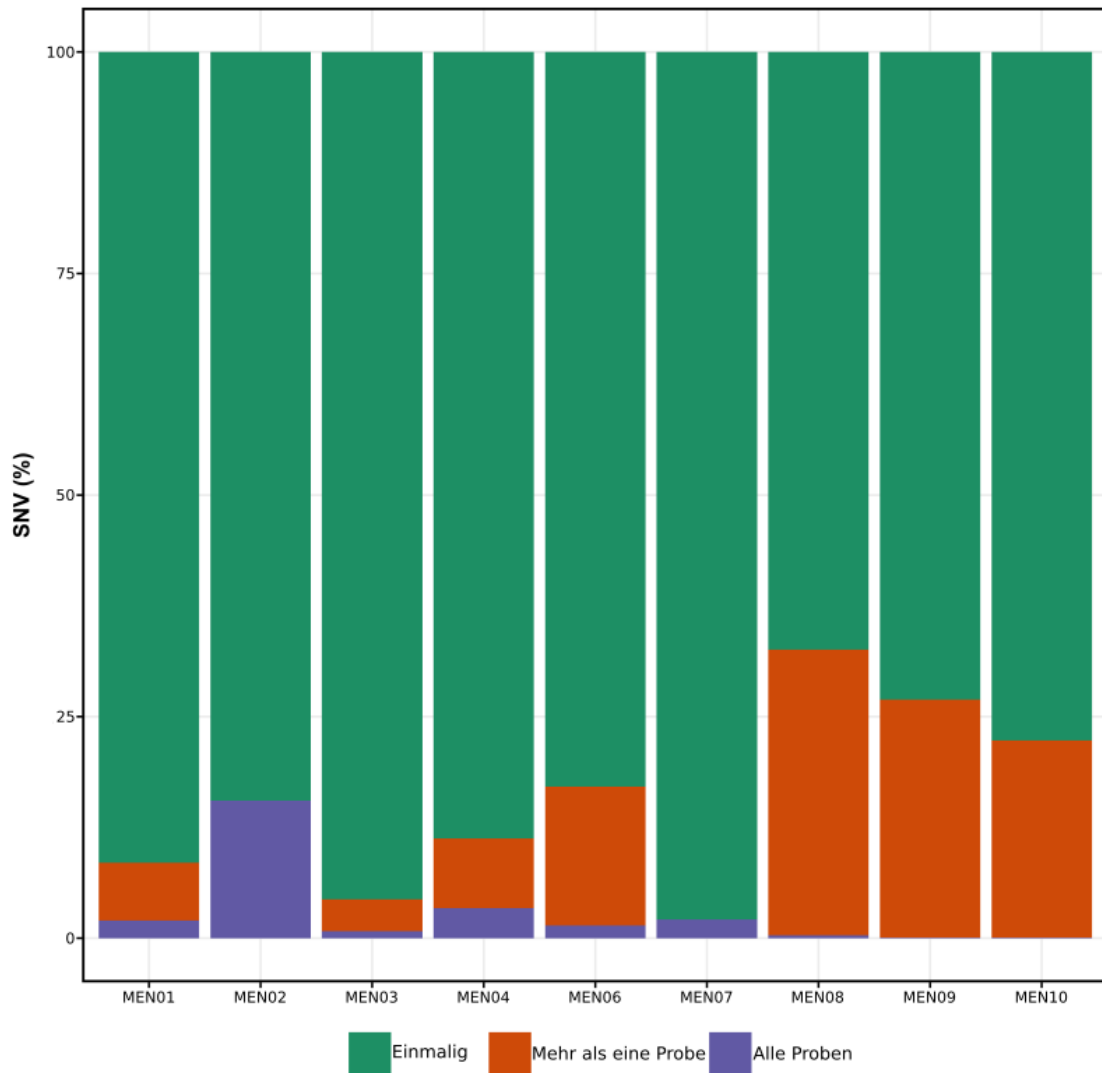


Abbildung 12: Wiederholtes Auftreten von SNVs im Krankheitsverlauf eines Patienten
 Auf der x-Achse aufgetragen sind alle Patienten des Kollektivs. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil der SNVs bezogen auf die Häufigkeit des Auftretens.

Als Ergebnis zeigt sich, dass der Großteil aller gefundenen SNVs einmalig in der jeweiligen Tumorprobe auftrat. (65%) Weniger häufig waren SNVs in mehr als einer Gewebeprobe aber nicht in allen Proben eines Patienten aufzufinden.

Während Mutationen, welche in allen Proben des jeweiligen Patienten vorkommen selten sind.

Die Abbildung 13 zeigt als nächsten Schritt mutierte Gene welche in allen untersuchten Tumorproben des jeweiligen Patienten vorkommen.

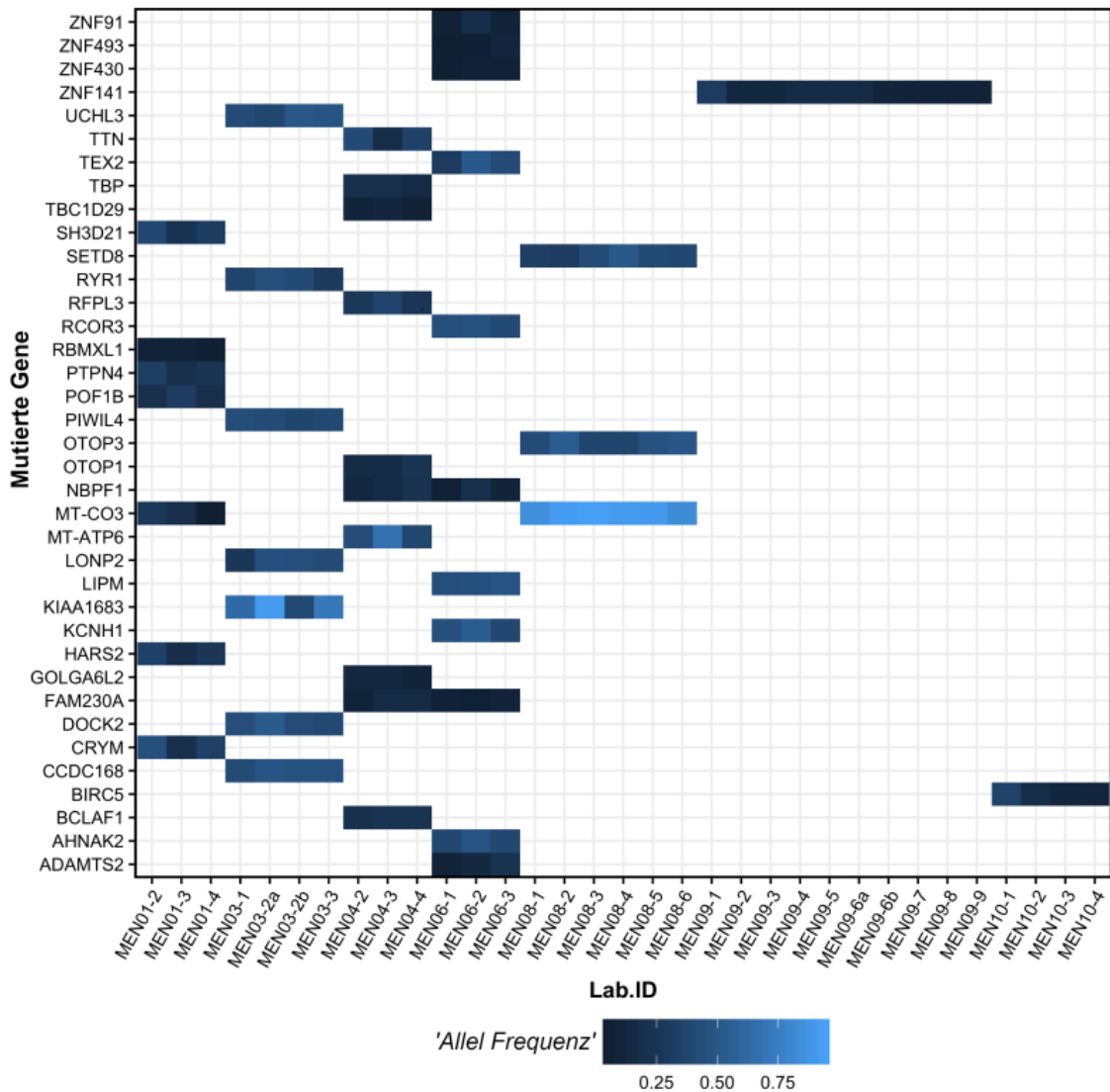


Abbildung 13: Auftreten von SNVs in allen Proben eines Patienten

Auf der x-Achse aufgetragen sind alle untersuchten Tumorproben in zeitlicher Staffelung pro Patient von links nach rechts. Die y-Achse zeigt verschiedene mutierte Gene und ihre Allel Frequenz in der jeweiligen Probe.

Durch farbliche Abstufung wird die Allel Frequenz in den Proben dargestellt. Insgesamt wurden 45 solcher Gene gefunden. Allerdings treten bei

unterschiedlichen Patienten nur wenige auch wiederholt auf. Es treten aber beispielsweise bei den Patienten MEN04 und MEN06 zu jeder Resektion Mutationen im NBPF1 Gen auf.

Weiterhin wurde die Verteilung der SNVs auf die Chromosomen analysiert.

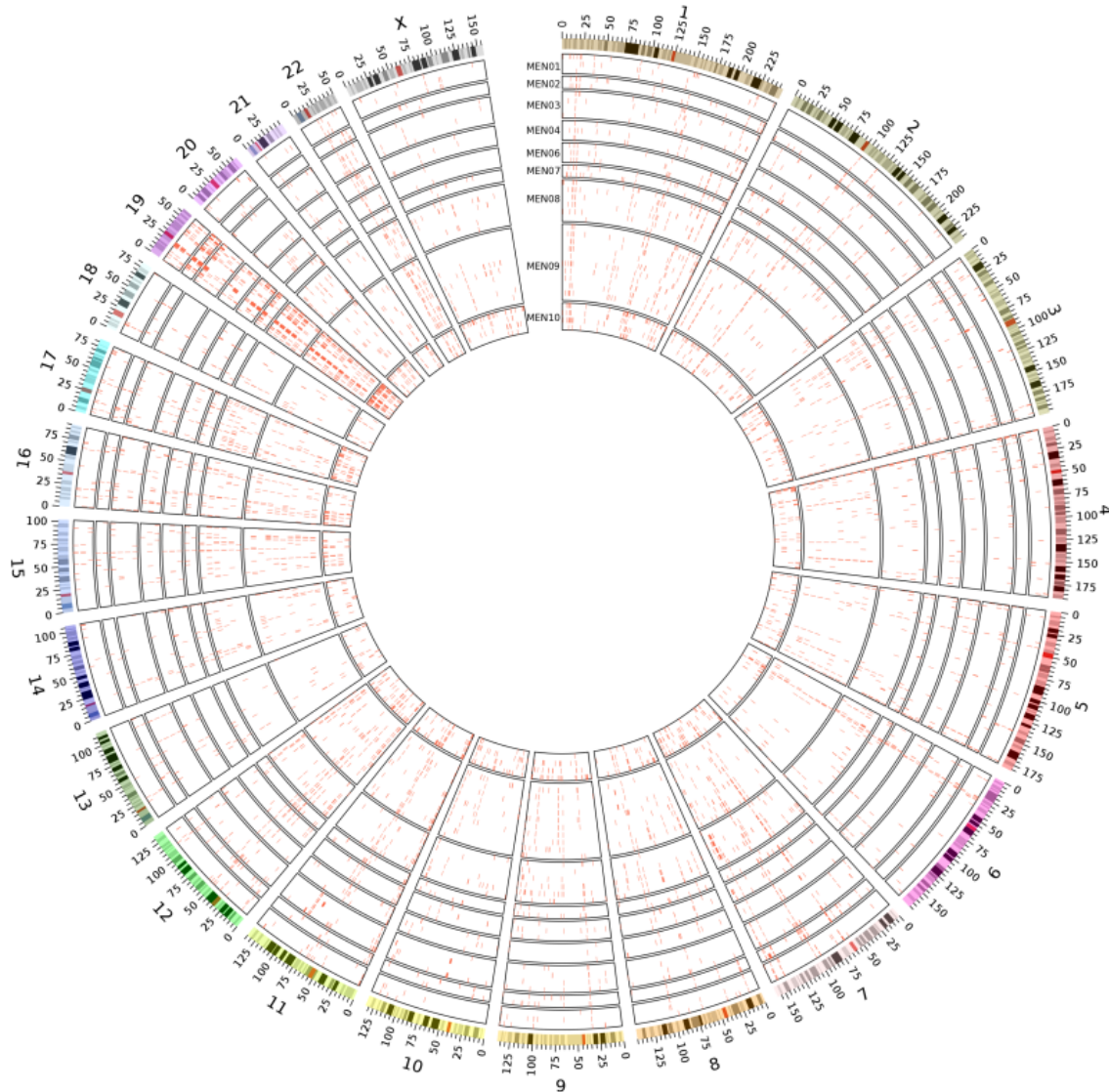


Abbildung 14: Verteilung der SNVs auf die Chromosomen

Das Diagramm zeigt die chromosomale Verteilung der SNVs für jeden Patienten.

Abbildung 14 stellt die Verteilung der SNVs auf die Chromosomen dar. Die SNVs sind mit wenigen Ausnahmen gleichmäßig auf allen Chromosomen verteilt zu finden. Eine Ausnahme bildet das Chromosom 19, welches schon visuell eine stärkere Anreicherung von SNVs vermuten lässt. Tatsächlich waren

SNVs im Chromosom 19 in 4 Tumorpben signifikant angereichert. Auch die Chromosomen 8, 12 und 22 zeigen in machen Proben eine signifikante Anreicherung von SNVs.

3.2 Kopienzahlvariationen in der Studienkohorte

CNVs sind eine weiteres wichtiges Charakteristikum von genomischen Veränderungen in Tumoren und wurden als nächstes betrachtet.

Es wurde mittels VarScan2 eine Analyse der Kopienzahlvariationen (CNV) durchgeführt.(Abbildung 15)

Insgesamt wurden 7141 CNV gefunden, welche mindestens ein komplettes Gen überlappen. Teilweise überlappte Gene wurden verworfen, da es schwer ist die genauen Grenzen eines CNV Ereignisses mittels Exomdaten zu bestimmen. Dabei war in 6191 Fällen die Kopienzahl verringert und in 950 Fällen die Kopienzahl erhöht. Die Anzahl der von Genverlusten betroffenen Tumorproben war in dem Chromosom 1 mit 20 betroffenen Proben und Chromosom 22 mit 24 betroffenen Proben signifikant erhöht.

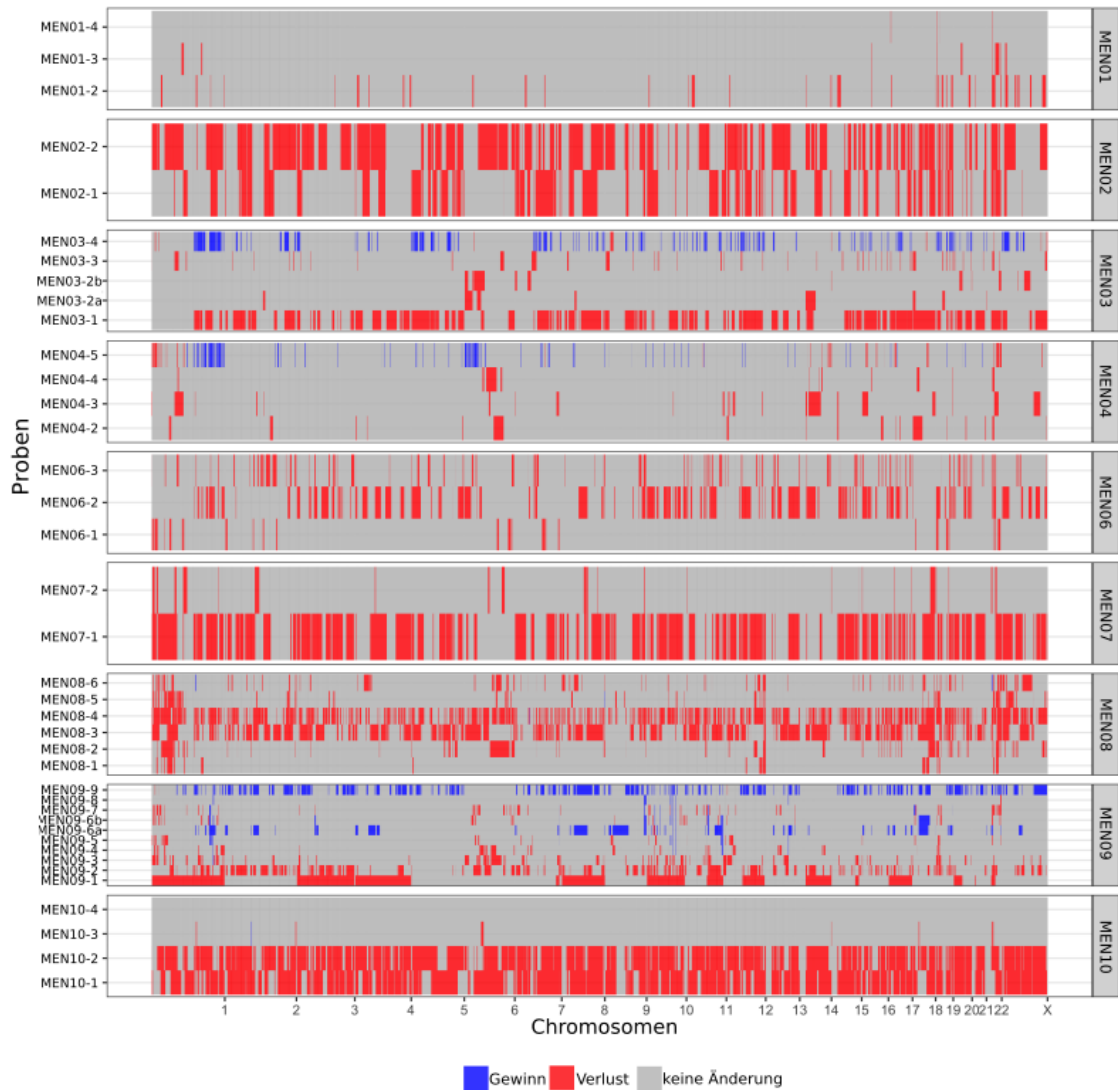


Abbildung 15: CNV Verteilung auf die Chromosomen

Auf der x-Achse aufgetragen sind die Chromosomen. Die Markierungen kennzeichnen das Ende eines Chromosoms. Farblich gekennzeichnet ist ein Gewinn (blau), Verlust (rot) oder keine Veränderung (grau) der CNVs. Die y-Achse zeigt die Patienten der Kohorte und die einzelnen Tumorproben.

In der Probe MEN09-1 wurde eine geringere Kopienzahl auf den Chromosomenarmen 1p, 3p, 4p, 4q, 8p, 10p, 17p, 18p und auf 14q festgestellt. Weiter wurde in der Tumorprobe MEN09-1 auf dem Chromosomenarm 1q mit 907 betroffenen Genen der größte Verlust der Kohorte gefunden.

Wie bei den SNVs ist die Verteilung der CNVs uneinheitlich. Übereinstimmend

mit den SNVs konnte eine Verringerung der CNV Ereignisse und betroffenen Gene durch CNV im zeitlichen Verlauf gezeigt werden.

3.3 Vorausgesagte Peptid Präsentation und Tumormutationslast

Bei der Untersuchung der SNVs und CNVs wurde ein außergewöhnlich heterogenes Verteilungsmuster festgestellt. Nun stellte sich die Frage welche Neoepitope von den Tumorzellen exklusiv an ihrer Oberfläche präsentiert werden. Bei Neoepitopen handelt es sich um Peptide welche nicht im normalen Humangenom vorkommen, sondern durch tumorspezifische Veränderungen der DNA entstanden sind. Diese können auf MHC-I Komplexen der Tumorzelle präsentiert werden.

Zunächst wurden die HLA-Typen der Patientenkohorte untersucht. Diese HLA-Typen wurden durch Korrelation der Blut Exomdaten mit allen bekannten HLA-Allelen mithilfe von Optitype bestimmt. Mit der Information der HLA-Typen wurden Voraussagen über die Neoepitope, welche auf der Tumorzelloberfläche präsentiert werden, gemacht.

HLA Allel Typ	MEN01	MEN02	MEN03	MEN04	MEN06	MEN07	MEN08	MEN09	MEN10
A*31:01	+								
A*32:01	+		+						
B*27:05	+								+
B*51:01	+			+			+		
C*02:02	+								+
C*14:02	+						+		
A*02:01		+	+	+	+	+	+	+	+
B*08:01		+							
B*40:01		+							
C*03:04		+							
C*15:02		+		+					
B*13:02			+					+	
B*57:01			+	+					+
C*03:03			+				+	+	
C*07:01			+	+		+			
B*39:01					+				
B*44:03					+				
C*04:01					+				
C*12:03					+				
A*68:01						+			
B*14:02						+			
B*18:01						+			
C*08:02						+			
A*24:02							+		
B*15:01							+	+	
A*30:01								+	
C*06:02								+	+

Tabelle 3: HLA-Subtypen des Patientenkollektivs

In der Tabelle 3 sind die HLA-Allele der Kohorte aufgelistet. Auch sie weisen ein heterogenes Verteilungsmuster auf. Die meisten Allele sind für den jeweiligen Patienten einzigartig. Das weltweit zu findende Allel A*02:01 wurde in 8 von 9 Patienten gefunden. Die Allele B*51, C*03 und C*07 wurden auch bei mehr als einem Patienten dieser Kohorte gefunden. Unter Verwendung der nicht

synonymen SNVs und den Allel-Typen wurden 8988 spezifische Neoepitope vorausgesagt. Die Verteilung dieser Neoepitope auf die Tumorproben ist im Abbildung 16 zu erkennen.

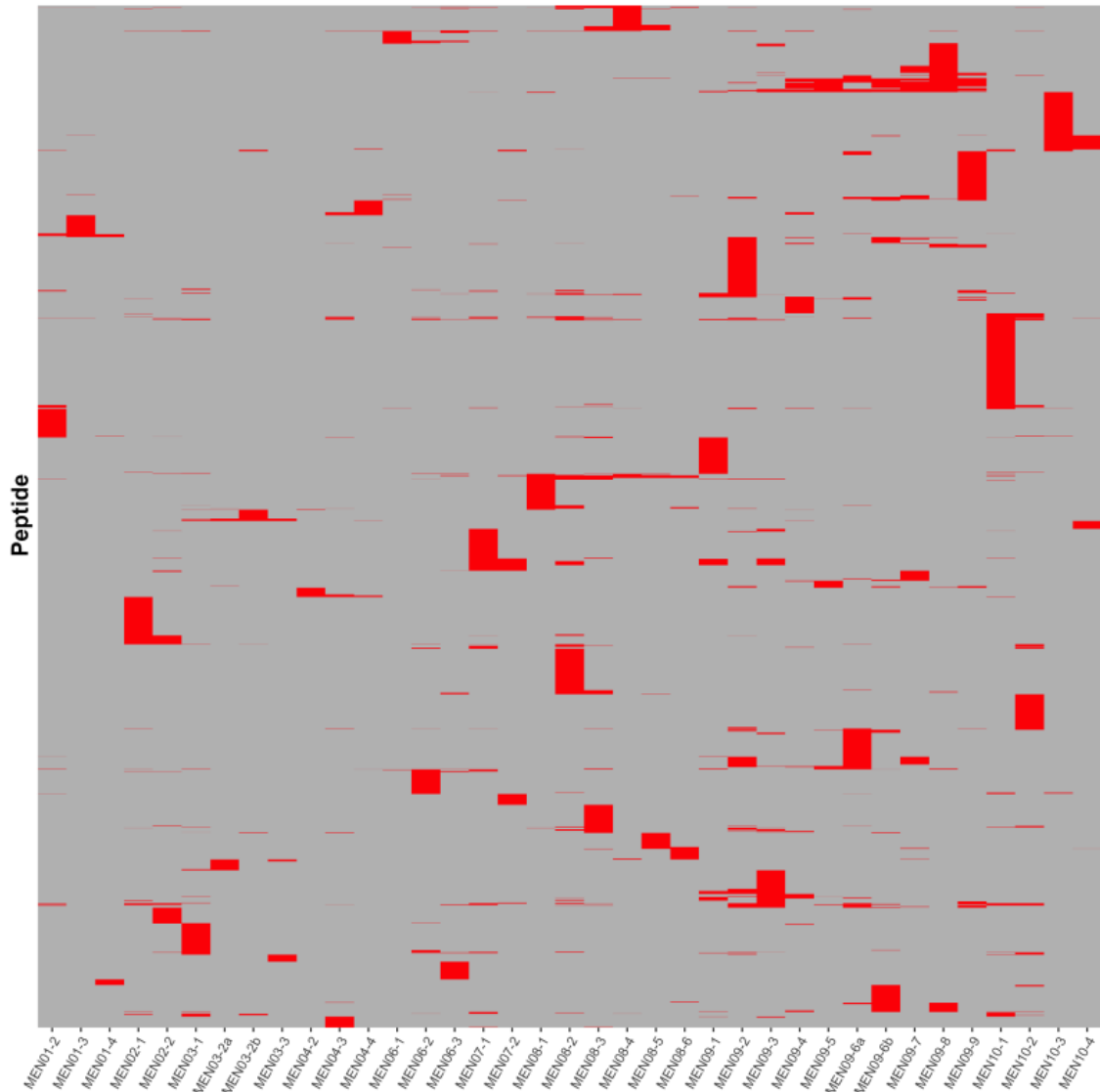


Abbildung 16: Vorausgesagte Neoepitope pro Tumorprobe

Auf der x-Achse aufgetragen sind alle untersuchten Tumorproben in zeitlicher Staffelung pro Patient von links nach rechts. Die y-Achse zeigt die präsentierten Peptide.

Die Probe MEN01-4 zeigt hierbei mit 75 die geringste Anzahl Peptide und die Probe MEN10-1 mit 973 die größte Anzahl. Weniger als die Hälfte der somatischen SNVs wird als Neoepitop an der Zelloberfläche präsentiert. Bei machen Patienten tritt kein Neoepitop wiederholt bei einer anderen Resektion

auf. Dies zeigt die dynamische Natur der Neoepitop Präsentation von Tumorzellen. Allerdings wurden ungefähr 20% der Neoepitope wiederholt in allen Tumorproben der Patienten MEN02 und MEN07 festgestellt. Auch die Patienten MEN01, MEN08 und MEN10 zeigen wiederholtes Auftreten von Neoepitopen. Kein Neoepitop wurde in allen Tumorproben festgestellt.

Weiter wurde die Tumormutationslast bestimmt.(Abbildung 17) Eingeteilt wurde die TMB in niedrig mit $TMB \leq 3$, mittel mit $3 < TMB \leq 10$ und hoch mit $TMB > 10$.

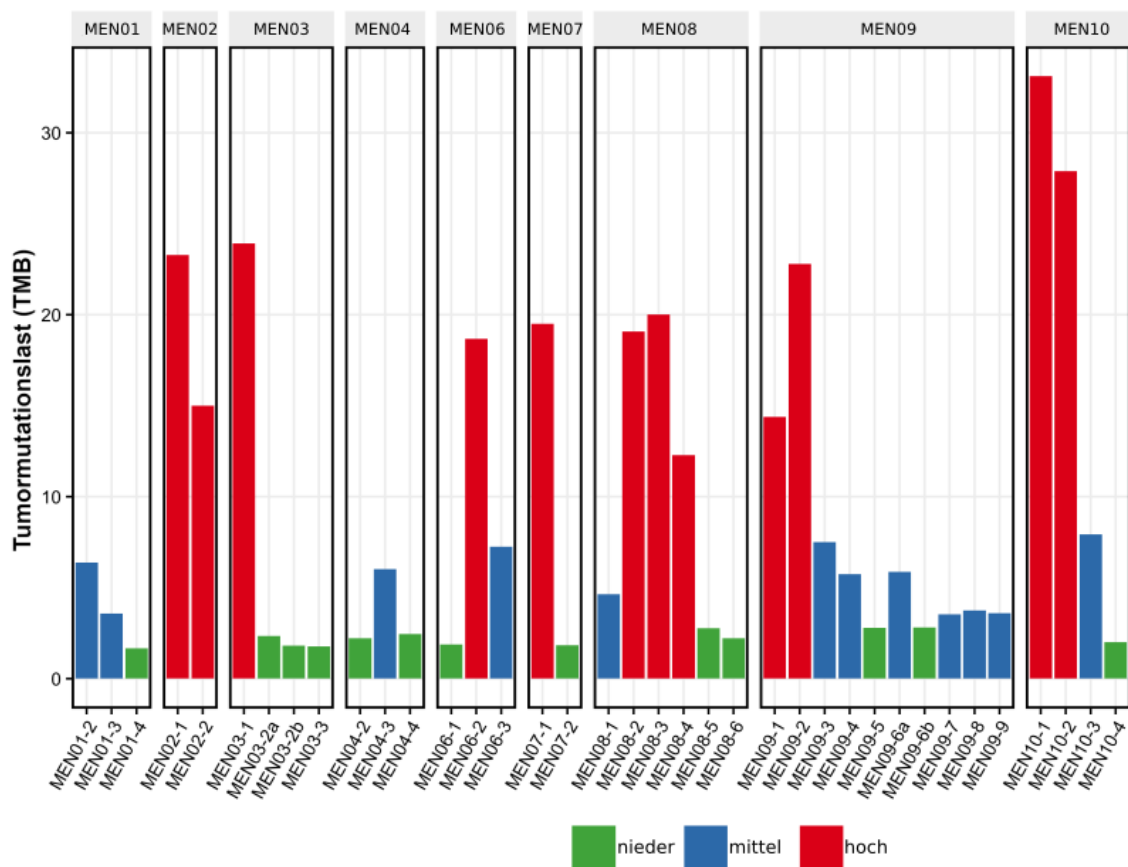


Abbildung 17: Tumormutationslast der Tumorproben

Auf der x-Achse aufgetragen sind alle untersuchten Tumorproben in zeitlicher Staffelung pro Patient von links nach rechts. Die y-Achse zeigt die Tumormutationslast.

In zeitlich früheren Resektionen der Krankheitsgeschichte ist meistens ein als hoch eingestufte TMB vorhanden. Ausnahmen bilden hier die Patienten MEN04, MEN06 und MEN08, welche zur ersten Resektion einen niedrigen oder mittleren TMB aufweisen. Trotz dessen ist allgemein eine Reduktion der TMB im Behandlungsverlauf zu erkennen.

3.4 Immunohistochemische Untersuchung von Patienten mit NF2 Mutationen

Die immunohistochemische Untersuchung wurde durchgeführt um die Proteinexpression und mögliche Änderungen der Aktivität im mTOR Signalweg zu visualisieren.

Mutationen im NF2-Gen wurden in der Vergangenheit häufig in Meningeomen gefunden und ihnen wurde eine wichtige Rolle zugeschrieben. Mittels WES konnten bei 3 Patienten (MEN01, MEN03, MEN07) der Kohorte NF2-Mutationen festgestellt werden.(Abbildung 18)

Bei keinem der Patienten wurde in allen Tumorproben eine NF2-Mutation gefunden.(Abbildung 18)

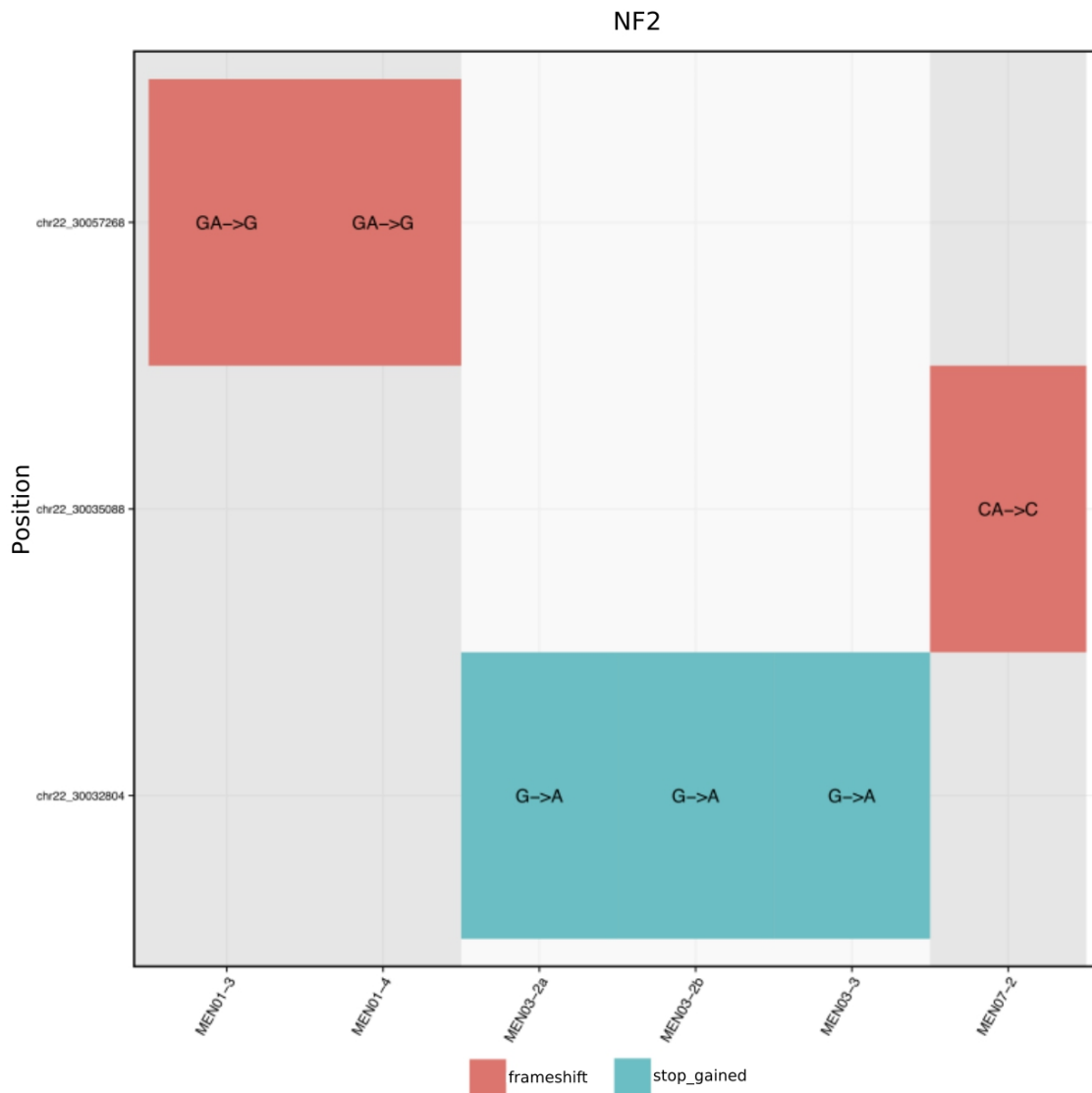


Abbildung 18: NF2 Mutationen bei MEN01, MEN02 und MEN07

Auf der x-Achse aufgetragen sind Tumorproben mit NF2-Mutation. Farblich gekennzeichnet ist die Art der Mutation. Die y-Achse zeigt die Position der Mutation.

Weitere somatische Mutationen, welche den PI3K/AKT/mTOR Signalweg beeinflussen, wurden beim Patienten MEN09 nachgewiesen. Es handelt sich unter anderen um DEPDC5, ALK und RICTOR. Eine NF2-Mutation konnte bei diesem Patienten mit WES nicht festgestellt werden.(Abbildung 19)

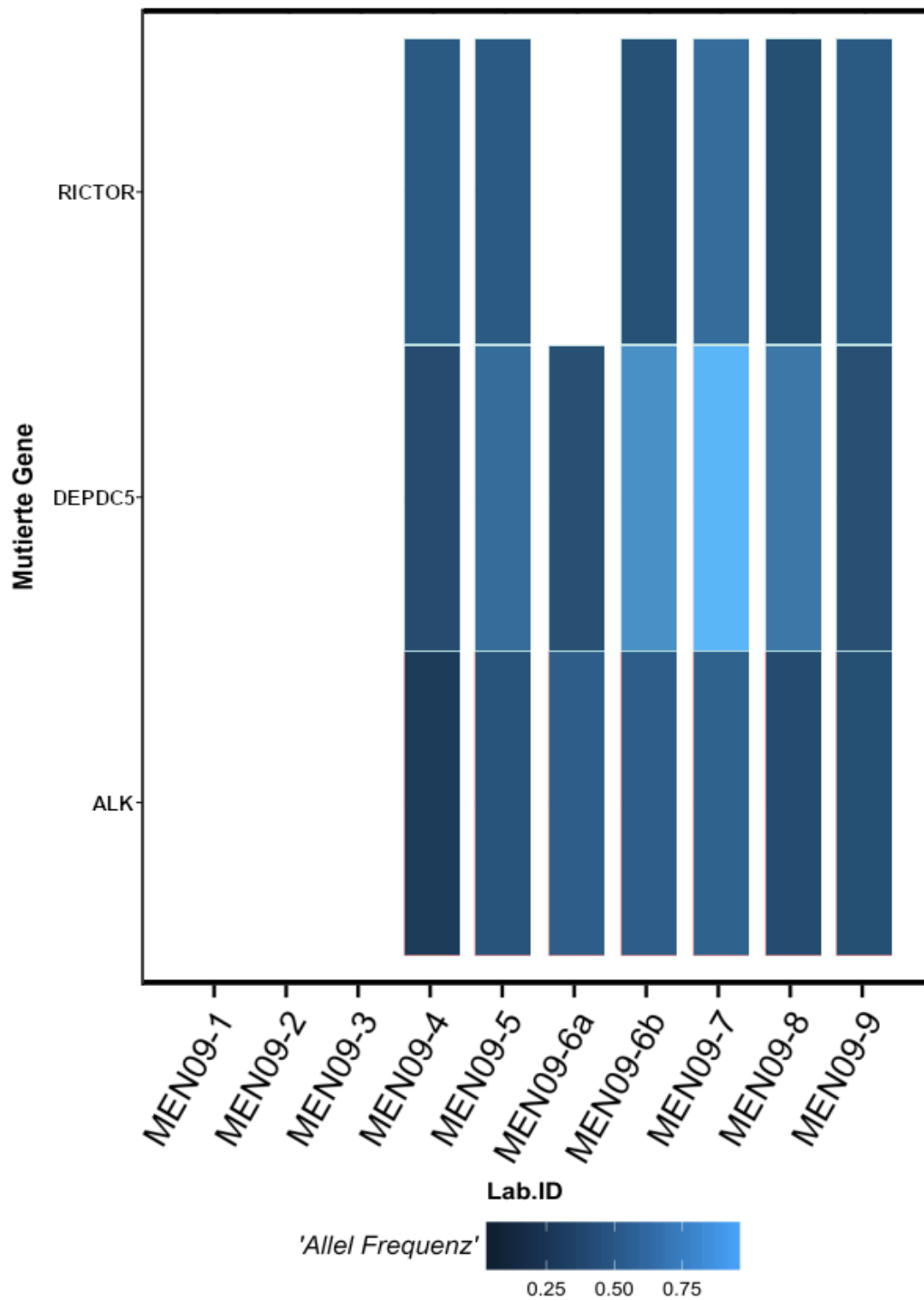


Abbildung 19: Mutationen im PI3K/AKT/mTOR Signalweg bei MEN09

Auf der x-Achse aufgetragen sind die Tumorproben des Patienten MEN09 in zeitlicher Staffelung von links nach rechts. Die y-Achse zeigt die mutierten Gene im PI3K/AKT/mTOR Signalweg und ihre Allel Frequenz in der jeweiligen Probe.

Es wurde eine immunohistochemische Untersuchung aller Tumorproben der Patienten mit Mutationen in NF2 / dem PI3K/AKT/mTOR Signalweg durchgeführt, um zu bestimmen, ob sich diese Mutationen tatsächlich in einer veränderten mTOR Signalwegaktivierung niederschlagen.(Abbildung 20, Abbildung 21)

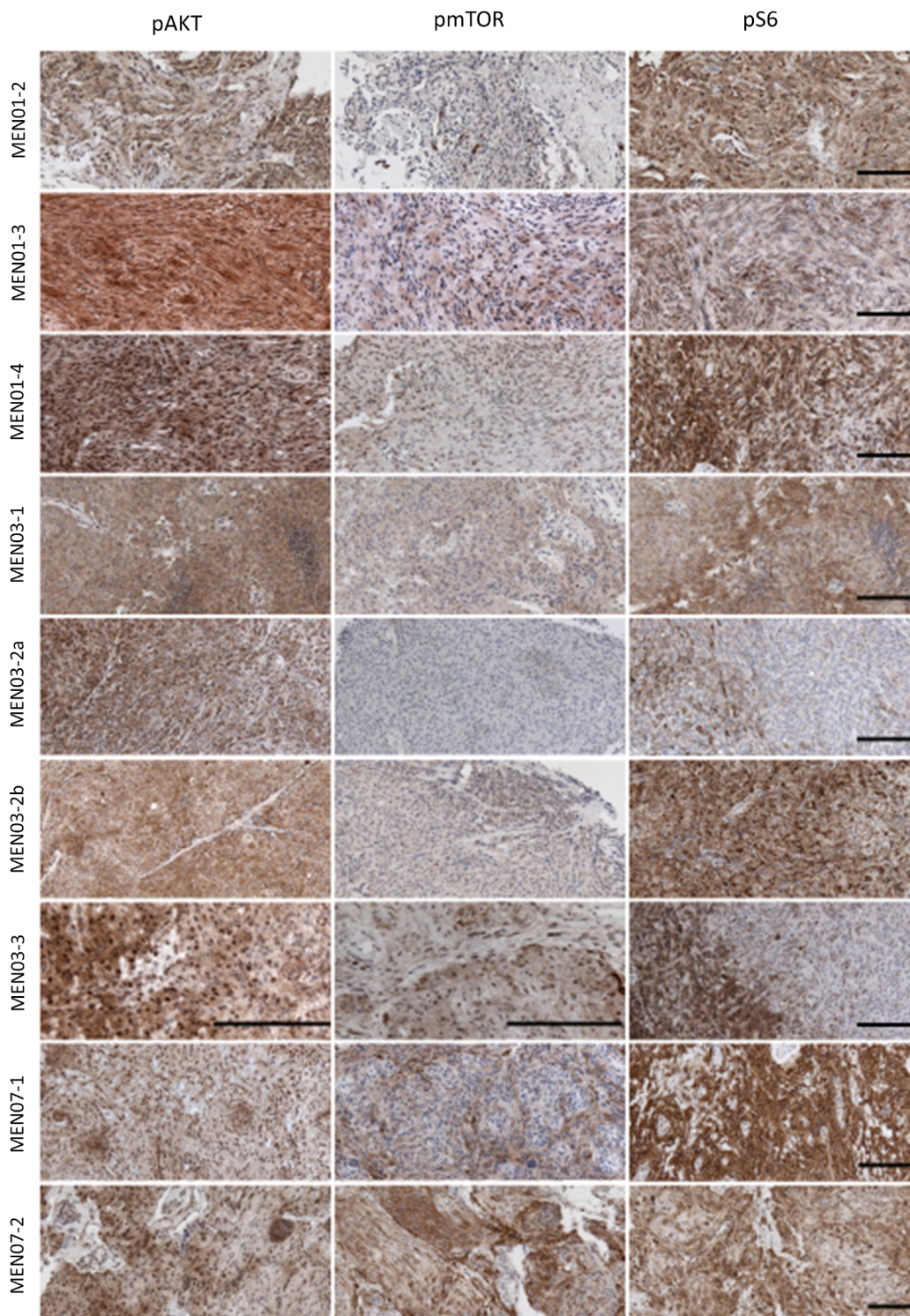


Abbildung 20: Repräsentative immunohistochemische Färbung von pAKT, pmTOR und pS6 der Tumorpoben der Patienten MEN01, MEN03, MEN07; Größenbalken=100 µm

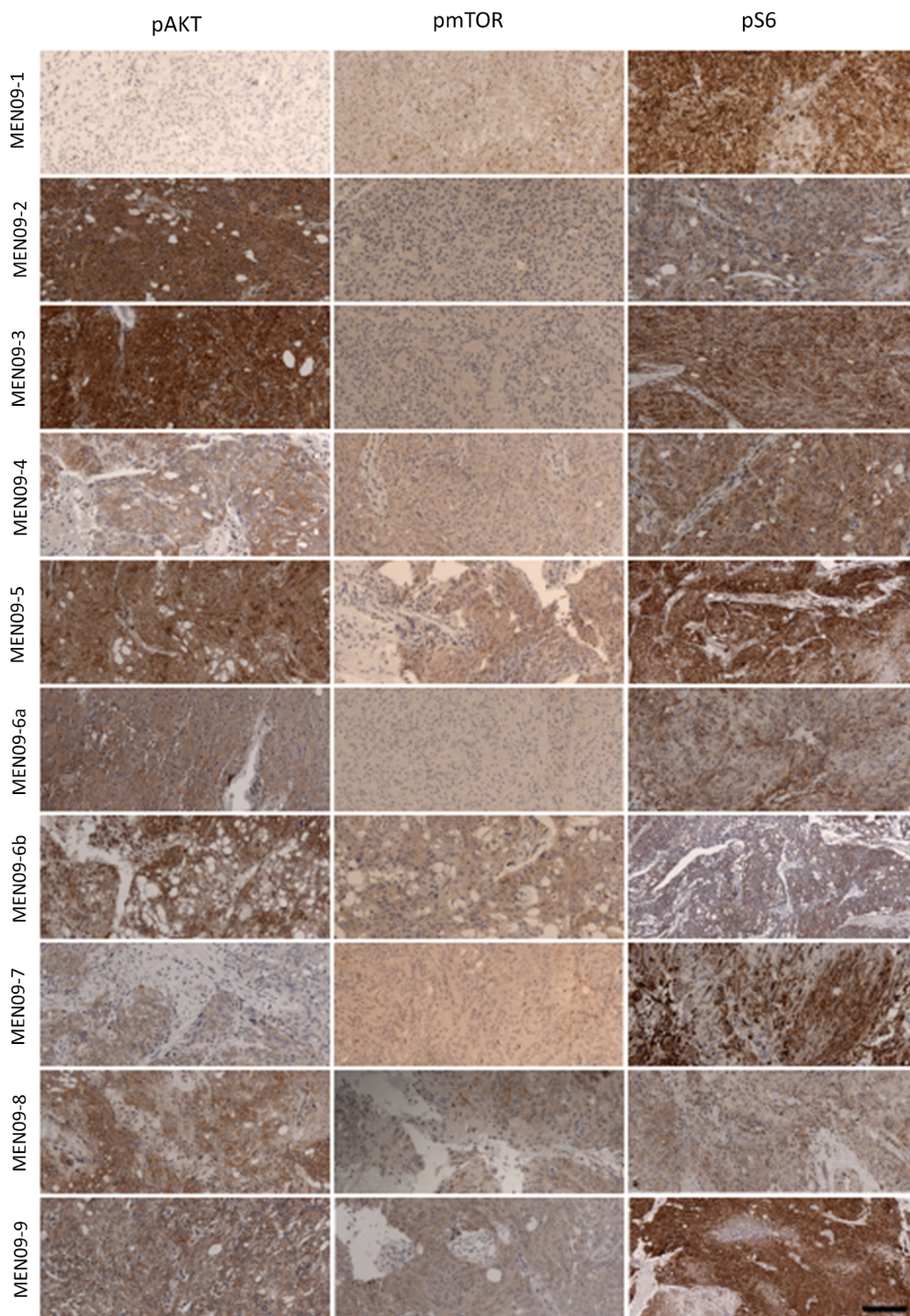


Abbildung 21: Repräsentative immunohistochemische Färbung von pAKT, pmTOR und pS6 der Tumorproben des Patienten MEN09; Größenbalken=100 µm

Probe	p-AKT Score	p-mTOR Score	p-S6 Score
MEN01-02	6	3	7
MEN01-03	5	4	7
MEN01-04	4	2	5
MEN03-01	5	0	5
MEN03-02a	5	0	7
MEN03-02b	6	1	8
MEN03-03	3	3	5
MEN07-01	5	4	5
MEN07-02	5	3	8

Tabelle 4: Scoring Abbildung 20

Probe	p-AKT Score	p-mTOR Score	p-S6 Score
MEN09-01	0	4	8
MEN09-02	5	2	3
MEN09-03	6	2	4
MEN09-04	5	3	7
MEN09-05	6	3	4
MEN09-06a	6	0	3
MEN09-06b	5	6	6
MEN09-07	2	4	5
MEN09-08	6	3	5
MEN09-09	5	6	6

Tabelle 5: Scoring Abbildung 21

Die Expression von phospho-AKT, phospho-mTOR und phospho-S6 ribosomales Protein ist heterogen auf Patienten und Tumorproben verteilt. (Tabelle 4, Tabelle 5) Ein Unterschied vor und nach NF2-Mutation lässt sich nicht nachweisen.

4 Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass in dieser Kohorte von 9 Patienten welche unter rezidivierenden Meningeomen leiden, ein heterogenes Verteilungsmuster der genomischen Veränderungen auf die 37 Tumorproben vorhanden ist. Sowohl alle Einzelnukleotid-Varianten, als auch die nicht synonymen Einzelnukleotid-Varianten sind ungleich über die Patienten und Tumorproben verteilt. Bei den nicht synonymen Punktmutationen handelt es sich hauptsächlich um Missens-, Frameshift- und stop gained-Mutationen. Der größte Teil der Einzelnukleotid-Varianten trat jeweils nur in einer einzigen Probe auf. Nur wenige Gene waren zu allen Resektionen eines Patienten betroffen. Es wurden 45 solcher Gene identifiziert.

Die Verteilung der Einzelnukleotid-Varianten auf die Chromosomen ist gleichmäßig. Ausnahmen bilden hier mit einer verstärkten Anreicherung die Chromosomen 8, 12, 19 und 22.

Die Kopienzahlvariationen folgen dem gleichen heterogenen Muster wie die Einzelnukleotid-Varianten. In den meisten Fällen kam es zu einem Verlust von Kopienzahlen. Genverluste wurden in 20 Proben auf Chromosomen 1 und in 24 Proben auf Chromosom 22 gefunden.

NF2-Mutationen wurden bei den Patienten MEN01, MEN03 und MEN07 gefunden. Weitere Mutationen im PI3K/AKT/mTOR Signalweg wurden beim Patienten MEN09 festgestellt. Das NF2 Gen war hier nicht betroffen. Die immunhistologische Färbung auf phospho-AKT, phospho-mTOR und phospho-S6 ergab eine uneinheitliche Verteilung auf Proben und Patienten.

Weniger als die Hälfte der somatischen Einzelnukleotid-Varianten wird als Neoepitop an der Zelloberfläche präsentiert. Bei machen Patienten tritt kein Neoepitop erneut bei einer anderen Resektion auf. Kein Neoepitop wurde in allen untersuchten Proben gefunden.

Einen Analyse des Tumormutationslast ergab häufig hohe Erstwerte und eine tendenzielle Reduktion im Krankheitsverlauf.

4.1 Heterogenität in Einzelnukleotid-Varianten und Tumorsubklonen

Die mutierten Gene, welche in der hier beschriebenen Kohorte innerhalb eines Patienten in zeitlich getrennten Resektionen vorkommen, sind zu 65% einzigartig. Eine Ausnahme bildet hier das Gen NBPF1, welches bei 2 Patienten in allen Proben gefunden wurde. NBPF1 wurde das erste Mal in einem Neuroblastom entdeckt und später als Tumorsuppressor Gen identifiziert. (Andries et al., 2015) Es könnte möglicherweise zu einer Rezidivneigung von Meningeomen beitragen. Davon abgesehen weisen die hier untersuchten Meningeome eine hohe genomische Heterogenität auf. Auch Bi et al. fanden in einer Gruppe von 11 Patienten, mit mindestens zwei Resektionen, eine hohe Heterogenität mit 23% übereinstimmenden Mutationen zwischen einem jeweiligen Probenpaar. (Bi et al., 2017) Der Vergleich mit anderen malignen Tumorarten wie Neuroblastomen (Padovan-Merhar et al., 2016), Kolorektalen Tumoren (Lim et al., 2015), klarzelligen Nierenkarzinomen (Gerlinger et al., 2014), Gliomen (Bai et al., 2016), Prostatakarzinomen (Kumar et al., 2016) und hepatozellulären Karzinomen (Xu et al., 2019) zeigt die hohe Heterogenität in rezidivierenden Meningeomen. Bei anderen malignen Tumoren kann es durch den Selektionsdruck einer Therapie zu einem Rezidiv durch ein Subklon mit Mutationen kommen, welche eine Resistenz gegen die Therapiemaßnahmen bieten. (Nowell, 1976, Ding et al., 2013) In der Patientenkohorte wurden Resektionen, Radiotherapien und Chemotherapien durchgeführt. Aber es konnte kein Einfluss auf die Genetik darauffolgender Tumorrezidive festgestellt werden. Diese Behandlungsmaßnahmen scheinen einen geringeren Selektionsdruck auf die hier beschriebenen Meningeome auszuüben, als es bei anderen malignen Tumorarten der Fall ist. Dazu passt die große genetische Variabilität der jeweiligen Rezidive. Auch die Untersuchung der Tumormutationslast, die eine Reduktion im Krankheitsverlauf aufweist, passt in dieses Bild. Es ist also nicht von einem dominanten Subklon, welcher durch neue Mutationen an Heterogenität gewinnt, sondern von mehreren Subklonen welche die Behandlungsmaßnahmen überdauern auszugehen. Bei einem

dominanten Subklon mit einer solchen genetischen Heterogenität wäre eine ansteigende Tumormutationslast im Krankheitsverlauf zu erwarten. Die histologischen Untersuchungen von Bi et al. eines Tumors in einer Resektionsreihe zeigen auch eine große räumliche Heterogenität im Tumorgenom dieses einen Meningeoms. Weiter wurden in der Studie phylogenetische Stammbäume angefertigt, welche auch zu dem Schluss führen, dass es sich bei verschiedenen Rezidiven um räumlich getrennte, unresezierte Bereiche und nicht um einen dominanten Subklon handelt. (Bi et al., 2017)

4.2 Kopienzahlvarianten bei rezidivierenden Meningeomen

Bei Betrachtung der CNVs waren signifikant mehr Tumorproben mit Veränderungen der Chromosomen 1 und 22 betroffen. In der Vergangenheit wurden wiederholt strukturelle Veränderungen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 1 mit starker Rezidivneigung in Verbindung gebracht. So wurde von Ketter et al. bei einem Verlust von Chromosomarm 1p eine signifikant erhöhte Neigung zu Rezidiven gezeigt. (Ketter et al., 2001) Zu demselben Ergebnis kamen Linsler et al. für den Verlust von 1p36, während eine Monosomie des Chromosoms 22 keinen Einfluss auf die Rezidivneigung hatte. (Linsler et al., 2014)

Im Speziellen wurde in der Probe MEN09-1 der Verlust von Kopienzahlen auf 1p, 1q, 3p, 4p, 4q, 8p, 10p, 17p, 18p und 14q gefunden. Eine Assoziation des Verlusts vom Chromosomenarm 14q aber auch 1p und 10p mit WHO Grad II Meningeomen versus benigne Meningeomen wurde von Harmanci et al. beschrieben. (Harmanci et al., 2017) Zur Resektion der Probe MEN09-1 waren diese chromosomalen Veränderungen unter anderem auch vorhanden, aber der Tumor wurde noch als WHO Grad I eingestuft. Zur zweiten Resektion 4 Jahre später wurde allerdings schon ein Progress zum WHO Grad II Meningeom verzeichnet.

4.3 NF2 und andere bisher bekannte charakteristische Mutationen bei Meningeomen

Die bisher beschriebenen häufigsten Driver-Mutationen bei Meningeomen traten in der hier beschriebenen Kohorte von Patienten mit rezidivierenden Meningeomen verschiedener WHO Grade nur selten auf. Aus der Gruppe der nicht NF2 mutierten Meningeome (Clark et al., 2013, Clark et al., 2016a, Abedalthagafi et al., 2016) traten höchstens sporadisch Mutationen auf.

Veränderungen im NF2-Gen sind unabhängig vom WHO Grad die häufigst festgestellte Mutation in Meningeomen. Häufig findet sich neben diesen Mutationen ein Verlust des Chromosoms 22, welches die zweite Kopie des NF2-Gens beherbergt. (Mawrin and Perry, 2010, Brastianos et al., 2013, Clark et al., 2013) Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass diese NF2-Inaktivierung ein frühes Ereignis in der Tumorgenese von Meningeomen darstellt. NF2-Mutationen konnten in der hier untersuchten Kohorte bei 3 Patienten festgestellt werden. Diese NF2-Mutationen zeigten sich erst später im Krankheitsverlauf und traten entsprechend nicht zu jeder Resektion auf. Für diese Patienten scheint eine Inaktivierung des NF2-Gens kein frühes Ereignis in der Tumorentstehung zu sein. Ähnliches bezüglich rezidivierender Meningeome wurde von Bi et al. beschrieben. In der Studie wurden bei einem Patienten in 5 Resektionen drei verschiedene Mutationen im NF2-Gen gefunden, während die Kopienzahlvariationen konstant blieben. (Bi et al., 2017)

Die immunohistochemische Färbung der Proben der Patienten mit NF2-Mutation und des Patienten MEN09 mit anderen Mutationen die den PI3K/AKT/mTOR Signalweg betreffen, zeigt ein heterogenes Ergebnis. Auch Proben vor der nachgewiesenen NF2-Mutation zeigen ein ähnliches Muster. Das könnte für die geographisch-räumliche Heterogenität von Meningeomen sprechen, die sich auch in einer makroskopisch ungleichen Anfärbung zeigt. Aber auch eine andersartige frühzeitige Veränderung im PI3K/AKT/mTOR Signalweg, welche nicht mit den hier verwendeten Methoden nachgewiesen werden kann, ist denkbar.

4.4 Neoepitope als Angriffspunkt für Immuntherapien

Nicht-synonyme Punktmutationen können für tumorspezifische Peptide codieren, welche auf MHC-Proteinkomplexen als Neoepitope präsentiert werden. Wenn sich diese genug von körpereigenen Peptiden unterscheiden können sie von T-Zellen als körperfremd erkannt werden. (Schumacher and Schreiber, 2015)

Die vorhergesagte Anzahl dieser Neoepitope wurde in Melanomen (Snyder et al., 2014), nicht kleinzellige Bronchialkarzinome (Rizvi et al., 2015), kolorektalen Karzinomen (Le et al., 2015) und ausgewählten neurologischen Tumoren (Johanns et al., 2016, Bouffet et al., 2016) als positiver Faktor für die Wirksamkeit von Immuntherapien bestimmt. Ein räumlich heterogener Tumor könnte die angreifbaren Neoepitope nur in einem Subklon enthalten, was den Behandlungserfolg mindert. (McGranahan et al., 2016) In der hier untersuchten Patientengruppe gab es bei manchen Patienten keine wiederholt auftretenden Neoepitope, was die dynamische Natur der Neoepitop Präsentation in Tumorzellen zeigt. Vergleichbar sind die Ergebnisse von Bi et al. wobei hier auch eine große Varianz in der Neoepitop Präsentation gefunden wurde. Die Anzahl der Neoepitope war zeitlich konstant. (Bi et al., 2017)

Dem entgegengestellt waren bei den Patienten MEN02 und MEN07 ungefähr 20% der präsentierten Neoepitope in allen Proben nachzuweisen, was eine geringere Heterogenität als bei SNVs oder CNVs darstellt. Du et al. konnten in einer Studie zeigen, dass Meningeome PD-L1 exprimieren und von T-Lymphozyten infiltriert sind. (Du et al., 2015) PD-L1 ist ein Oberflächenprotein, dass an der Hemmung der Immunantwort beteiligt und ein vielversprechender Kandidat für Immuntherapie ist. (Le et al., 2015) Eine individuelle Immuntherapie ist bei manchen Patienten mit rezidivierenden Meningeomen in Zukunft also möglicherweise eine Option.

4.5 Grenzen und Schlussfolgerung

Die geringe Größe der Patientenkohorte macht eine statistische Auswertung der Daten bezogen auf den WHO Grad des Tumors, Geschlecht des Patienten usw. nicht aussagekräftig. Deswegen wurden solche Auswertungen nicht durchgeführt. Auch sind die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse unter Berücksichtigung der Kohortengröße zu beurteilen.

Weiter sind die Auswahl der Tumorausschnitte und das Scoring der immunohistochemischen Färbung trotz aller Vorkehrungen subjektive Verfahren.

Diese Arbeit kann die hohe Heterogenität von Meningeomen nicht nur in der räumlich-geographischen Dimension sondern auch in zeitlich getrennten Rezidiven zeigen.

Trotz der hohen Heterogenität in der Neoepitop-Präsentation, ist diese bei machen Patienten geringer als in SNVs und CNVs, was in Zukunft eine individuelle Immuntherapie möglich erscheinen lässt.

Des weiteren sind die Ergebnisse dieser Arbeit eine Bestätigung der von Bi et al. gemachten Beobachtungen. So ist auch hier bei verschiedenen Rezidiven von räumlich getrennten, unresezierten Bereichen und nicht von einem dominanten Subklon auszugehen.

Bei zwei der Patienten konnten zu jeder Resektion Mutationen im Tumorsuppressor Gen NBPF1 gefunden werden. Dieses Gen könnte eine Rolle in der Rezidivneigung von Meningeomen spielen.

Weiter ist auch offen, welche Rolle Mutationen im NF2-Gen in Meningeomrezidiven spielen. Weitere Untersuchungen sind nötig um die Relevanz dieser Gene zu bestätigen oder zu widerlegen.

In Zukunft könnten weitere Studien durchgeführt werden, in denen die Epigenetik und das Transkriptom von rezidivierenden Meningeomen untersucht werden. Dies würde zum Verständnis und genaueren Charakterisierung der Tumorbiologie beitragen.

5 Zusammenfassung

Das Meningeom ist der am häufigsten diagnostizierte Tumor des zentralen Nervensystems. Im Vordergrund der Therapie steht die chirurgische Resektion und adjuvante Radiotherapie. Die gezielte Chemotherapie kommt noch selten zum Einsatz. Den selteneren rezidivierenden Meningeomen wurde weniger Beachtung geschenkt, während in der Genetik von Meningeomen bezogen auf den WHO Grad und histologischen Subtypen in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht wurden. In dieser Arbeit wurden rezidivierende Meningeome auf longitudinale genetische Charakteristika untersucht und untereinander verglichen. Das Ziel dieser Arbeit ist ein besseres Verständnis der Tumorbilogie dieser Meningeome.

Die Patientenkohorte besteht aus 9 Patienten mit verschiedenen klinischen Verläufen. 37 Tumorproben dieser Patienten wurden untersucht. Die diagnostizierten histologischen Subtypen und WHO Grade sind uneinheitlich. Mittels Exomanalyse und bioinformatischer Datenauswertung wurden alle verfügbaren Tumorproben analysiert und mit der aus Blutproben gewonnenen Normalgewebereferenz verglichen. Weiter wurden durch immunhistochemische Färbung bei Patienten mit betroffenem PI3K/AKT/mTOR Signalweg repräsentative Ausschnitte der Tumorproben auf pAKT, pmTOR und pS6 gefärbt und ausgewertet.

Der größte Teil der Einzelnukleotid-Varianten trat jeweils nur in einer einzigen Probe auf. Die Kopienzahlvariationen folgen dem gleichen heterogenen Muster. Es wurden das Gene NBPF1 identifiziert, welches häufiger betroffen war und auch in anderen Tumorarten eine Rolle spielt. Bei Untersuchung der CNVs waren signifikant mehr Tumorproben mit Veränderungen der Chromosomen 1 und 22 betroffen. Dies wurde in der Vergangenheit schon mit einer erhöhten Rezidivneigung in Zusammenhang gebracht.

Die immunhistologische Färbung auf phospho-AKT, phospho-mTOR und phospho-S6 ergab eine uneinheitliche Verteilung auf Proben und Patienten.

Zusammengenommen ist die große Heterogenität der Meningeome in dieser Arbeit gut zu erkennen.

In Zukunft sollten weitere Studien unter Berücksichtigung der Epigenetik und des Transkriptoms durchgeführt werden um die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse zu präzisieren und gemeinsame Charakteristika von rezidivierenden Meningeomen zu evaluieren.

6 Literaturverzeichnis

- ABEDALTHAGAFI, M., BI, W. L., AIZER, A. A., MERRILL, P. H., BREWSTER, R., AGARWALLA, P. K., LISTEWNIK, M. L., DIAS-SANTAGATA, D., THORNER, A. R., VAN HUMMELEN, P., BRASTIANOS, P. K., REARDON, D. A., WEN, P. Y., AL-MEFTY, O., RAMKISSOON, S. H., FOLKERTH, R. D., LIGON, K. L., LIGON, A. H., ALEXANDER, B. M., DUNN, I. F., BEROUKHIM, R. & SANTAGATA, S. 2016. Oncogenic PI3K mutations are as common as AKT1 and SMO mutations in meningioma. *Neuro Oncol*, 18, 649-55.
- ANDREATTA, M. & NIELSEN, M. 2015. Gapped sequence alignment using artificial neural networks: application to the MHC class I system. *Bioinformatics*, 32, 511-517.
- ANDRIES, V., VANDEPOELE, K., STAES, K., BERX, G., BOGAERT, P., VAN ISTERDAEL, G., GINNEBERGE, D., PARTHOENS, E., VANDENBUSSCHE, J., GEVAERT, K. & VAN ROY, F. 2015. NBP1, a tumor suppressor candidate in neuroblastoma, exerts growth inhibitory effects by inducing a G1 cell cycle arrest. *BMC Cancer*, 15, 391.
- ASTNER, S. T., THEODOROU, M., DOBREI-CIUCHENDEA, M., AUER, F., KOPP, C., MOLLS, M. & GROSU, A.-L. 2010. Tumor Shrinkage Assessed by Volumetric MRI in the Long-Term Follow-Up after Stereotactic Radiotherapy of Meningiomas. *Strahlentherapie und Onkologie*, 186, 423-429.
- ATTIA, A., CHAN, M. D., MOTT, R. T., RUSSELL, G. B., SEIF, D., DANIEL BOURLAND, J., DEGUZMAN, A. F., ELLIS, T. L., MCMULLEN, K. P., MUNLEY, M. T., TATTER, S. B. & SHAW, E. G. 2012. Patterns of failure after treatment of atypical meningioma with gamma knife radiosurgery. *J Neurooncol*, 108, 179-85.
- BACKER-GRONDAHL, T., MOEN, B. H. & TORP, S. H. 2012. The histopathological spectrum of human meningiomas. *Int J Clin Exp Pathol*, 5, 231-42.
- BAI, H., HARMANCI, A. S., ERSON-OMAY, E. Z., LI, J., COSKUN, S., SIMON, M., KRISCHEK, B., OZDUMAN, K., OMAI, S. B., SORENSEN, E. A., TURCAN, S., BAKIRCIGLU, M., CARRION-GRANT, G., MURRAY, P. B., CLARK, V. E., ERCAN-SENCICEK, A. G., KNIGHT, J., SENCAR, L., ALTINOK, S., KAULEN, L. D., GULEZ, B., TIMMER, M., SCHRAMM, J., MISHRA-GORUR, K., HENEGARIU, O., MOLITERNO, J., LOUVI, A., CHAN, T. A., TANNHEIMER, S. L., PAMIR, M. N., VORTMEYER, A. O., BILGUVAR, K., YASUNO, K. & GUNEL, M. 2016. Integrated genomic characterization of IDH1-mutant glioma malignant progression. *Nat Genet*, 48, 59-66.
- BALASUBRAMANIAN, S. K., SHARMA, M., SILVA, D., KARIVEDU, V., SCHMITT, P., STEVENS, G. H., BARNETT, G. H., PRAYSON, R. A., ELSON, P., SUH, J. H., MURPHY, E. S. & CHAO, S. T. 2017. Longitudinal experience with WHO Grade III (anaplastic) meningiomas at a single institution. *J Neurooncol*, 131, 555-563.
- BASKARAN, P. & RÖDELSPERGER, C. 2015. Microevolution of duplications and deletions and their impact on gene expression in the nematode *Pristionchus pacificus*. *PLoS one*, 10, e0131136.
- BI, W. L., GREENWALD, N. F., ABEDALTHAGAFI, M., WALA, J., GIBSON, W. J., AGARWALLA, P. K., HOROWITZ, P., SCHUMACHER, S. E., ESAULOVA, E., MEI, Y., CHEVALIER, A., DUCAR, M., THORNER, A. R., VAN HUMMELEN, P., STEMMER-RACHAMIMOV, A., ARTYOMOV, M., AL-MEFTY, O., DUNN, G. P., SANTAGATA, S., DUNN, I. F. & BEROUKHIM, R. 2017. Genomic landscape of high-grade meningiomas. *NPJ Genom Med*, 2.

- BOUFFET, E., LAROUCHE, V., CAMPBELL, B. B., MERICO, D., DE BORJA, R., ARONSON, M., DURNO, C., KRUEGER, J., CABRIC, V., RAMASWAMY, V., ZHUKOVA, N., MASON, G., FARAH, R., AFZAL, S., YALON, M., RECHAVI, G., MAGIMAIRAJAN, V., WALSH, M. F., CONSTANTINI, S., DVIR, R., ELHASID, R., REDDY, A., OSBORN, M., SULLIVAN, M., HANSFORD, J., DODGSHUN, A., KLAUBER-DEMORE, N., PETERSON, L., PATEL, S., LINDHORST, S., ATKINSON, J., COHEN, Z., LAFRAMBOISE, R., DIRKS, P., TAYLOR, M., MALKIN, D., ALBRECHT, S., DUDLEY, R. W., JABADO, N., HAWKINS, C. E., SHLIEN, A. & TABORI, U. 2016. Immune Checkpoint Inhibition for Hypermutant Glioblastoma Multiforme Resulting From Germline Biallelic Mismatch Repair Deficiency. *J Clin Oncol*, 34, 2206-11.
- BRASTIANOS, P. K., HOROWITZ, P. M., SANTAGATA, S., JONES, R. T., MCKENNA, A., GETZ, G., LIGON, K. L., PALESCANDOLO, E., VAN HUMMELEN, P., DUCAR, M. D., RAZA, A., SUNKAVALLI, A., MACCONAILL, L. E., STEMMER-RACHAMIMOV, A. O., LOUIS, D. N., HAHN, W. C., DUNN, I. F. & BEROUKHIM, R. 2013. Genomic sequencing of meningiomas identifies oncogenic SMO and AKT1 mutations. *Nat Genet*, 45, 285-9.
- BURNS, M. B., LACKEY, L., CARPENTER, M. A., RATHORE, A., LAND, A. M., LEONARD, B., REFSLAND, E. W., KOTANDENIYA, D., TRETAKOVA, N., NIKAS, J. B., YEE, D., TEMIZ, N. A., DONOHUE, D. E., MCDUGLE, R. M., BROWN, W. L., LAW, E. K. & HARRIS, R. S. 2013. APOBEC3B is an enzymatic source of mutation in breast cancer. *Nature*, 494, 366-70.
- CARLBERG, M. & HARDELL, L. 2015. Pooled analysis of Swedish case-control studies during 1997-2003 and 2007-2009 on meningioma risk associated with the use of mobile and cordless phones. *Oncol Rep*, 33, 3093-8.
- CLARK, V. E., ERSON-OMAY, E. Z., SERIN, A., YIN, J., COTNEY, J., OZDUMAN, K., AVSAR, T., LI, J., MURRAY, P. B., HENEGARIU, O., YILMAZ, S., GUNEL, J. M., CARRION-GRANT, G., YILMAZ, B., GRADY, C., TANRIKULU, B., BAKIRCIOGLU, M., KAYMAKCALAN, H., CAGLAYAN, A. O., SENCAR, L., CEYHUN, E., ATIK, A. F., BAYRI, Y., BAI, H., KOLB, L. E., HEBERT, R. M., OMA, S. B., MISHRA-GORUR, K., CHOI, M., OVERTON, J. D., HOLLAND, E. C., MANE, S., STATE, M. W., BILGUVAR, K., BAEHRING, J. M., GUTIN, P. H., PIEPMEIER, J. M., VORTMEYER, A., BRENNAN, C. W., PAMIR, M. N., KILIC, T., LIFTON, R. P., NOONAN, J. P., YASUNO, K. & GUNEL, M. 2013. Genomic analysis of non-NF2 meningiomas reveals mutations in TRAF7, KLF4, AKT1, and SMO. *Science*, 339, 1077-80.
- CLARK, V. E., HARMANCI, A. S., BAI, H., YOUNGBLOOD, M. W., LEE, T. I., BARANOSKI, J. F., ERCAN-SENCICEK, A. G., ABRAHAM, B. J., WEINTRAUB, A. S., HNISZ, D., SIMON, M., KRISCHEK, B., ERSON-OMAY, E. Z., HENEGARIU, O., CARRION-GRANT, G., MISHRA-GORUR, K., DURAN, D., GOLDMANN, J. E., SCHRAMM, J., GOLDBRUNNER, R., PIEPMEIER, J. M., VORTMEYER, A. O., GUNEL, J. M., BILGUVAR, K., YASUNO, K., YOUNG, R. A. & GUNEL, M. 2016a. Recurrent somatic mutations in POLR2A define a distinct subset of meningiomas. *Nat Genet*, 48, 1253-9.
- CLARK, V. E., HARMANCI, A. S., BAI, H., YOUNGBLOOD, M. W., LEE, T. I., BARANOSKI, J. F., ERCAN-SENCICEK, A. G., ABRAHAM, B. J., WEINTRAUB, A. S., HNISZ, D., SIMON, M., KRISCHEK, B., ERSON-OMAY, E. Z., HENEGARIU, O., CARRIÓ-GRANT, G., MISHRA-GORUR, K., DURÁN, D., GOLDMANN, J. E., SCHRAMM, J., GOLDBRUNNER, R., PIEPMEIER, J. M., VORTMEYER, A. O., GÜNEL, J. M., BILGÜVAR, K., YASUNO, K., YOUNG, R. A. & GÜNEL, M. 2016b. Recurrent somatic

- mutations in POLR2A define a distinct subset of meningiomas. *Nature genetics*, 48, 1253-1259.
- CLAUS, E. B., CALVOCORESSI, L., BONDY, M. L., SCHILDKRAUT, J. M., WIEMELS, J. L. & WRENSCH, M. 2012. Dental x-rays and risk of meningioma. *Cancer*, 118, 4530-7.
- CORNELIUS, J. F., LANGEN, K. J., STOFFELS, G., HANGGI, D., SABEL, M. & JAKOB STEIGER, H. 2012. Positron emission tomography imaging of meningioma in clinical practice: review of literature and future directions. *Neurosurgery*, 70, 1033-41; discussion 1042.
- DING, L., RAPHAEL, B. J., CHEN, F. & WENDL, M. C. 2013. Advances for studying clonal evolution in cancer. *Cancer Lett*, 340, 212-9.
- DRUMMOND, K. J., ZHU, J. J. & BLACK, P. M. 2004. Meningiomas: updating basic science, management, and outcome. *Neurologist*, 10, 113-30.
- DU, Z., ABEDALTHAGAFI, M., AIZER, A. A., MCHENRY, A. R., SUN, H. H., BRAY, M. A., VIRAMONTES, O., MACHAIDZE, R., BRASTIANOS, P. K., REARDON, D. A., DUNN, I. F., FREEMAN, G. J., LIGON, K. L., CARPENTER, A. E., ALEXANDER, B. M., AGAR, N. Y., RODIG, S. J., BRADSHAW, E. M. & SANTAGATA, S. 2015. Increased expression of the immune modulatory molecule PD-L1 (CD274) in anaplastic meningioma. *Oncotarget*, 6, 4704-16.
- DURAND, A., LABROUSSE, F., JOUVET, A., BAUCHET, L., KALAMARIDÈS, M., MENEI, P., DERUTY, R., MOREAU, J. J., FÈVRE-MONTANGE, M. & GUYOTAT, J. 2009. WHO grade II and III meningiomas: a study of prognostic factors. *Journal of Neuro-Oncology*, 95, 367-375.
- DURINCK, S., SPELLMAN, P. T., BIRNEY, E. & HUBER, W. 2009. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nat Protoc*, 4, 1184-91.
- EVANS, D. G. 2009. Neurofibromatosis type 2 (NF2): a clinical and molecular review. *Orphanet J Rare Dis*, 4, 16.
- FAN, Z., JI, T., WAN, S., WU, Y., ZHU, Y., XIAO, F. & ZHAN, R. 2013a. Smoking and risk of meningioma: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol*, 37, 39-45.
- FAN, Z. X., SHEN, J., WU, Y. Y., YU, H., ZHU, Y. & ZHAN, R. Y. 2013b. Hormone replacement therapy and risk of meningioma in women: a meta-analysis. *Cancer Causes Control*, 24, 1517-25.
- FATHI, A.-R. & ROELCKE, U. 2013. Meningioma. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 13, 337.
- FLANNERY, T. J., KANO, H., LUNSFORD, L. D., SIRIN, S., TORMENTI, M., NIRANJAN, A., FLICKINGER, J. C. & KONDZIOLKA, D. 2010. Long-term control of petroclival meningiomas through radiosurgery. *J Neurosurg*, 112, 957-64.
- FURTNER, J., SCHOPF, V., SEYSTAHL, K., LE RHUN, E., RUDA, R., ROELCKE, U., KOEPPEN, S., BERGHOFF, A. S., MAROSI, C., CLEMENT, P., FAEDI, M., WATTS, C., WICK, W., SOFFIETTI, R., WELLER, M. & PREUSSER, M. 2016. Kinetics of tumor size and peritumoral brain edema before, during, and after systemic therapy in recurrent WHO grade II or III meningioma. *Neuro Oncol*, 18, 401-7.
- GERLINGER, M., HORSWELL, S., LARKIN, J., ROWAN, A. J., SALM, M. P., VARELA, I., FISHER, R., MCGRANAHAN, N., MATTHEWS, N., SANTOS, C. R., MARTINEZ, P., PHILLIMORE, B., BEGUM, S., RABINOWITZ, A., SPENCER-DENE, B., GULATI, S., BATES, P. A., STAMP, G., PICKERING, L., GORE, M., NICOL, D. L., HAZELL, S., FUTREAL, P. A., STEWART, A. & SWANTON, C. 2014. Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nat Genet*, 46, 225-233.
- GUTMANN, D. H., GIORDANO, M. J., FISHBACK, A. S. & GUHA, A. 1997. Loss of merlin expression in sporadic meningiomas, ependymomas and schwannomas. *Neurology*, 49, 267-70.

- HANSCHIED, H., SWEENEY, R. A., FLENTJE, M., BUCK, A. K., LOHR, M., SAMNICK, S., KREISSL, M. & VERBURG, F. A. 2012. PET SUV correlates with radionuclide uptake in peptide receptor therapy in meningioma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 39, 1284-8.
- HARMANCI, A. S., YOUNGBLOOD, M. W., CLARK, V. E., COSKUN, S., HENEGARIU, O., DURAN, D., ERSON-OMAY, E. Z., KAULEN, L. D., LEE, T. I., ABRAHAM, B. J., SIMON, M., KRISCHEK, B., TIMMER, M., GOLDBRUNNER, R., OMAI, S. B., BARANOSKI, J., BARAN, B., CARRION-GRANT, G., BAI, H., MISHRA-GORUR, K., SCHRAMM, J., MOLITERNO, J., VORTMEYER, A. O., BILGUVAR, K., YASUNO, K., YOUNG, R. A. & GUNEL, M. 2017. Integrated genomic analyses of de novo pathways underlying atypical meningiomas. *Nat Commun*, 8, 14433.
- HART, W. E., WATSON, J.-P. & WOODRUFF, D. L. 2011. Pyomo: modeling and solving mathematical programs in Python. *Mathematical Programming Computation*, 3, 219.
- HENZE, M., DIMITRAKOPOULOU-STRAUSS, A., MILKER-ZABEL, S., SCHUHMACHER, J., STRAUSS, L. G., DOLL, J., MACKE, H. R., EISENHUT, M., DEBUS, J. & HABERKORN, U. 2005. Characterization of ⁶⁸Ga-DOTA-D-Phe¹-Tyr³-octreotide kinetics in patients with meningiomas. *J Nucl Med*, 46, 763-9.
- JASKOLSKI, D., PAPIERZ, T., LIBERSKI, P. P. & SIKORSKA, B. 2012. Ultrastructure of meningiomas: autophagy is involved in the pathogenesis of "intranuclear vacuoles". *Folia Neuropathol*, 50, 187-93.
- JASON ROCKHILL, MACIEJ MRUGALA & MARC C. CHAMBERLAIN 2007. Intracranial meningiomas: an overview of diagnosis and treatment. *Neurosurgical Focus*, 23, E1.
- JIANG, H., LEI, R., DING, S.-W. & ZHU, S. 2014. Skewer: a fast and accurate adapter trimmer for next-generation sequencing paired-end reads. *BMC Bioinformatics*, 15, 182.
- JOHANNIS, T. M., MILLER, C. A., DORWARD, I. G., TSIEN, C., CHANG, E., PERRY, A., UPPALURI, R., FERGUSON, C., SCHMIDT, R. E., DAHIYA, S., ANSSTAS, G., MARDIS, E. R. & DUNN, G. P. 2016. Immunogenomics of Hypermutated Glioblastoma: A Patient with Germline POLE Deficiency Treated with Checkpoint Blockade Immunotherapy. *Cancer Discov*, 6, 1230-1236.
- JURATLI, T. A., GEIGER, K. D., WEIGEL, P., VON DER HAGEN, M., DAUBNER, D., PINZER, T., HAHN, G., SCHACKERT, G. & KIRSCH, M. 2015. A five year-old child with clear cell petro-clival meningioma: case report with clinical and histopathological long-term follow-up. *Child's Nervous System*, 31, 2193-2198.
- KEPES, J. J. 1986. Presidential address: the histopathology of meningiomas. A reflection of origins and expected behavior? *J Neuropathol Exp Neurol*, 45, 95-107.
- KETTER, R., HENN, W., NIEDERMAYER, I., STEILEN-GIMBEL, H., KONIG, J., ZANG, K. D. & STEUDEL, W. I. 2001. Predictive value of progression-associated chromosomal aberrations for the prognosis of meningiomas: a retrospective study of 198 cases. *J Neurosurg*, 95, 601-7.
- KOBOLDT, D. C., ZHANG, Q., LARSON, D. E., SHEN, D., MCLELLAN, M. D., LIN, L., MILLER, C. A., MARDIS, E. R., DING, L. & WILSON, R. K. 2012. VarScan 2: Somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Research*, 22, 568-576.
- KOLDE, R. 2015. pheatmap: Pretty heatmaps [Software].
- KONDZIOLKA, D., MATHIEU, D., LUNSFORD, L. D., MARTIN, J. J., MADHOK, R., NIRANJAN, A. & FLICKINGER, J. C. 2008. Radiosurgery as definitive management of intracranial meningiomas. *Neurosurgery*, 62, 53-58.
- KORHONEN, K., SALMINEN, T., RAITANEN, J., AUVINEN, A., ISOLA, J. & HAAPASALO, H. 2006. Female predominance in meningiomas can not be explained by differences in progesterone, estrogen, or androgen

- receptor expression. *Journal of Neuro-Oncology*, 80, 1-7.
- KRZYWINSKI, M., SCHEIN, J., BIROL, I., CONNORS, J., GASCOYNE, R., HORSMAN, D., JONES, S. J. & MARRA, M. A. 2009. Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome research*, 19, 1639-1645.
- KUAN, A. S., CHEN, Y. T., TENG, C. J., WANG, S. J. & CHEN, M. T. 2014. Risk of meningioma in patients with head injury: a nationwide population-based study. *J Chin Med Assoc*, 77, 457-62.
- KUMAR, A., COLEMAN, I., MORRISSEY, C., ZHANG, X., TRUE, L. D., GULATI, R., ETZIONI, R., BOLOURI, H., MONTGOMERY, B., WHITE, T., LUCAS, J. M., BROWN, L. G., DUMPIT, R. F., DESARKAR, N., HIGANO, C., YU, E. Y., COLEMAN, R., SCHULTZ, N., FANG, M., LANGE, P. H., SHENDURE, J., VESSELLA, R. L. & NELSON, P. S. 2016. Substantial interindividual and limited intraindividual genomic diversity among tumors from men with metastatic prostate cancer. *Nat Med*, 22, 369-78.
- LAVIV, Y., OHLA, V. & KASPER, E. M. 2016. Unique features of pregnancy-related meningiomas: lessons learned from 148 reported cases and theoretical implications of a prolactin modulated pathogenesis. *Neurosurg Rev*.
- LE, D. T., URAM, J. N., WANG, H., BARTLETT, B. R., KEMBERLING, H., EYRING, A. D., SKORA, A. D., LUBER, B. S., AZAD, N. S., LAHERU, D., BIEDRZYCKI, B., DONEHOWER, R. C., ZAHEER, A., FISHER, G. A., CROCENZI, T. S., LEE, J. J., DUFFY, S. M., GOLDBERG, R. M., DE LA CHAPELLE, A., KOSHIJI, M., BHAIJEE, F., HUEBNER, T., HRUBAN, R. H., WOOD, L. D., CUKA, N., PARDOLL, D. M., PAPADOPOULOS, N., KINZLER, K. W., ZHOU, S., CORNISH, T. C., TAUBE, J. M., ANDERS, R. A., ESHLEMAN, J. R., VOGELSTEIN, B. & DIAZ, L. A., JR. 2015. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*, 372, 2509-20.
- LEE, Y., LIU, J., PATEL, S., CLOUGHESY, T., LAI, A., FAROOQI, H., SELIGSON, D., DONG, J., LIAU, L., BECKER, D., MISCHER, P., SHAMS, S. & NELSON, S. 2010. Genomic landscape of meningiomas. *Brain Pathol*, 20, 751-62.
- LI, H. & DURBIN, R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25, 1754-1760.
- LI, H., HANDSAKER, B., WYSOKER, A., FENNEL, T., RUAN, J., HOMER, N., MARTH, G., ABECASIS, G. & DURBIN, R. 2009a. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25, 2078-9.
- LI, H., HANDSAKER, B., WYSOKER, A., FENNEL, T., RUAN, J., HOMER, N., MARTH, G., ABECASIS, G., DURBIN, R. & GENOME PROJECT DATA PROCESSING, S. 2009b. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25, 2078-2079.
- LIM, B., MUN, J., KIM, J. H., KIM, C. W., ROH, S. A., CHO, D. H., KIM, Y. S., KIM, S. Y. & KIM, J. C. 2015. Genome-wide mutation profiles of colorectal tumors and associated liver metastases at the exome and transcriptome levels. *Oncotarget*, 6, 22179-90.
- LINSLER, S., KRAEMER, D., DRIESS, C., OERTEL, J., KAMMERS, K., RAHNENFUHRER, J., KETTER, R. & URBSCHAT, S. 2014. Molecular biological determinations of meningioma progression and recurrence. *PLoS One*, 9, e94987.
- LOU, E., SUMRALL, A. L., TURNER, S., PETERS, K. B., DESJARDINS, A., VREDENBURGH, J. J., MCLENDON, R. E., HERNDON, J. E., 2ND, MCSHERRY, F., NORFLEET, J., FRIEDMAN, H. S. & REARDON, D. A. 2012. Bevacizumab therapy for adults with recurrent/progressive meningioma: a retrospective series. *J Neurooncol*, 109, 63-70.
- 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. *Acta Neuropathologica*, 131, 803-820.
- LUSIS, E. A., SCHEITHAUER, B. W., YACHNIS, A. T., FISCHER, B. R., CHICOINE, M. R., PAULUS, W. & PERRY, A. 2012. Meningiomas in pregnancy: a clinicopathologic study of 17 cases. *Neurosurgery*, 71, 951-61.
- MARINCEK, N., RADOJEWSKI, P., DUMONT, R. A., BRUNNER, P., MULLER-BRAND, J., MAECKE, H. R., BRIEL, M. & WALTER, M. A. 2015. Somatostatin receptor-targeted radiopeptide therapy with 90Y-DOTATOC and 177Lu-DOTATOC in progressive meningioma: long-term results of a phase II clinical trial. *J Nucl Med*, 56, 171-6.
- MAWRIN, C. & PERRY, A. 2010. Pathological classification and molecular genetics of meningiomas. *J Neurooncol*, 99, 379-91.
- MCGRANAHAN, N., FURNESS, A. J., ROSENTHAL, R., RAMSKOV, S., LYNGAA, R., SAINI, S. K., JAMAL-HANJANI, M., WILSON, G. A., BIRKBAK, N. J., HILEY, C. T., WATKINS, T. B., SHAFI, S., MURUGAESU, N., MITTER, R., AKARCA, A. U., LINARES, J., MARAFIOTI, T., HENRY, J. Y., VAN ALLEN, E. M., MIAO, D., SCHILLING, B., SCHADENDORF, D., GARRAWAY, L. A., MAKAROV, V., RIZVI, N. A., SNYDER, A., HELLMANN, M. D., MERGHOUB, T., WOLCHOK, J. D., SHUKLA, S. A., WU, C. J., PEGGS, K. S., CHAN, T. A., HADRUP, S. R., QUEZADA, S. A. & SWANTON, C. 2016. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science*, 351, 1463-9.
- MORALES, F. C., MOLINA, J. R., HAYASHI, Y. & GEORGESCU, M. M. 2010. Overexpression of ezrin inactivates NF2 tumor suppressor in glioblastoma. *Neuro Oncol*, 12, 528-39.
- NAKASU, S., HIRANO, A. & SHIMURA, T. 1985. [Incidental meningioma. Autopsy study]. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 25, 928-32.
- NIELSEN, M. & ANDREATTA, M. 2016. NetMHCpan-3.0; improved prediction of binding to MHC class I molecules integrating information from multiple receptor and peptide length datasets. *Genome medicine*, 8, 33.
- NOWELL, P. C. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194, 23-8.
- OSTROM, Q. T., GITTLEMAN, H., FULOP, J., LIU, M., BLANDA, R., KROMER, C., WOLINSKY, Y., KRUCHKO, C. & BARNHOLTZ-SLOAN, J. S. 2015. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol*, 17 Suppl 4, iv1-iv62.
- PADOVAN-MERHAR, O. M., RAMAN, P., OSTROVNAYA, I., KALLETLA, K., RUBNITZ, K. R., SANFORD, E. M., ALI, S. M., MILLER, V. A., MOSSE, Y. P., GRANGER, M. P., WEISS, B., MARIS, J. M. & MODAK, S. 2016. Enrichment of Targetable Mutations in the Relapsed Neuroblastoma Genome. *PLoS Genet*, 12, e1006501.
- PERRY, A., SCHEITHAUER, B. W., STAFFORD, S. L., LOHSE, C. M. & WOLLAN, P. C. 1999. "Malignancy" in meningiomas: a clinicopathologic study of 116 patients, with grading implications. *Cancer*, 85, 2046-56.
- PERRY, A., STAFFORD, S. L., SCHEITHAUER, B. W., SUMAN, V. J. & LOHSE, C. M. 1997. Meningioma grading: an analysis of histologic parameters. *Am J Surg Pathol*, 21, 1455-65.
- PETRILLI, A. M. & FERNANDEZ-VALLE, C. 2016. Role of Merlin/NF2 inactivation in tumor biology. *Oncogene*,

35, 537-48.

- PRESTON-MARTIN, S., MACK, W. & HENDERSON, B. E. 1989. Risk factors for gliomas and meningiomas in males in Los Angeles County. *Cancer Res*, 49, 6137-43.
- PRESTON, D. L., RON, E., YONEHARA, S., KOBUE, T., FUJII, H., KISHIKAWA, M., TOKUNAGA, M., TOKUOKA, S. & MABUCHI, K. 2002. Tumors of the nervous system and pituitary gland associated with atomic bomb radiation exposure. *J Natl Cancer Inst*, 94, 1555-63.
- PREUSSER, M., SPIEGL-KREINECKER, S., LOTSCH, D., WOHRER, A., SCHMOOK, M., DIECKMANN, K., SARINGER, W., MAROSI, C. & BERGER, W. 2012. Trabectedin Has Promising Antineoplastic Activity in High-Grade Meningioma. *Cancer*, 118, 5038-5049.
- RACHINGER, W., STOECKLEIN, V. M., TERPOLILLI, N. A., HAUG, A. R., ERTL, L., POSCHL, J., SCHULLER, U., SCHICHOR, C., THON, N. & TONN, J. C. 2015. Increased ⁶⁸Ga-DOTATATE uptake in PET imaging discriminates meningioma and tumor-free tissue. *J Nucl Med*, 56, 347-53.
- RAMMENSEE, H.-G., BACHMANN, J., EMMERICH, N. P. N., BACHOR, O. A. & STEVANOVIĆ, S. 1999. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*, 50, 213-219.
- RENÉ O. MIRIMANOFF, DANIEL E. DOSORETZ, RITA M. LINGGOOD, ROBERT G. OJEMANN & ROBERT L. MARTUZA 1985. Meningioma: analysis of recurrence and progression following neurosurgical resection. *Journal of Neurosurgery*, 62, 18-24.
- REUSS, D. E., PIRO, R. M., JONES, D. T. W., SIMON, M., KETTER, R., KOOL, M., BECKER, A., SAHM, F., PUSCH, S., MEYER, J., HAGENLOCHER, C., SCHWEIZER, L., CAPPER, D., KICKINGEREDER, P., MUCHA, J., KOELSCHE, C., JÄGER, N., SANTARIUS, T., TARPEY, P. S., STEPHENS, P. J., ANDREW FUTREAL, P., WELLENREUTHER, R., KRAUS, J., LENARTZ, D., HEROLD-MENDE, C., HARTMANN, C., MAWRIN, C., GIESE, N., EILS, R., COLLINS, V. P., KÖNIG, R., WIESTLER, O. D., PFISTER, S. M. & VON DEIMLING, A. 2013. Secretory meningiomas are defined by combined KLF4 K409Q and TRAF7 mutations. *Acta Neuropathologica*, 125, 351-358.
- RIEMENSCHNEIDER, M. J., PERRY, A. & REIFENBERGER, G. 2006. Histological classification and molecular genetics of meningiomas. *The Lancet Neurology*, 5, 1045-1054.
- RIZVI, N. A., HELLMANN, M. D., SNYDER, A., KVISTBORG, P., MAKAROV, V., HAVEL, J. J., LEE, W., YUAN, J., WONG, P., HO, T. S., MILLER, M. L., REKHTMAN, N., MOREIRA, A. L., IBRAHIM, F., BRUGGEMAN, C., GASMI, B., ZAPPASODI, R., MAEDA, Y., SANDER, C., GARON, E. B., MERGHOUB, T., WOLCHOK, J. D., SCHUMACHER, T. N. & CHAN, T. A. 2015. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*, 348, 124-8.
- RODVALL, Y., AHLBOM, A., PERSHAGEN, G., NYLANDER, M. & SPANNARE, B. 1998. Dental radiography after age 25 years, amalgam fillings and tumours of the central nervous system. *Oral Oncol*, 34, 265-9.
- ROULEAU, G. A., MEREL, P., LUTCHMAN, M., SANSON, M., ZUCMAN, J., MARINEAU, C., HOANG-XUAN, K., DEMCZUK, S., DESMAZE, C., PLOUGASTEL, B. & ET AL. 1993. Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. *Nature*, 363, 515-21.
- SADETZKI, S., FLINT-RICHTER, P., BEN-TAL, T. & NASS, D. 2002. Radiation-induced meningioma: a descriptive study of 253 cases. *J Neurosurg*, 97, 1078-82.
- SAHM, F., BISSEL, J., KOELSCHE, C., SCHWEIZER, L., CAPPER, D., REUSS, D., BÖHMER, K., LASS, U., GÖCK, T., KALIS, K., MEYER, J., HABEL, A., BREHMER, S., MITTELBRONN, M., JONES, D. T. W.,

- SCHITTENHELM, J., URBSCHAT, S., KETTER, R., HEIM, S., MAWRIN, C., HAINFELLNER, J. A., BERGHOFF, A.-S., PREUSSER, M., BECKER, A., HEROLD-MENDE, C., UNTERBERG, A., HARTMANN, C., KICKINGEREDER, P., COLLINS, V. P., PFISTER, S. M. & VON DEIMLING, A. 2013. AKT1E17K mutations cluster with meningothelial and transitional meningiomas and can be detected by SFRP1 immunohistochemistry. *Acta Neuropathologica*, 126, 757-762.
- SALONER, D., UZELAC, A., HETTS, S., MARTIN, A. & DILLON, W. 2010a. Modern meningioma imaging techniques. *J Neurooncol*, 99, 333-40.
- SALONER, D., UZELAC, A., HETTS, S., MARTIN, A. & DILLON, W. 2010b. Modern meningioma imaging techniques. *Journal of Neuro-Oncology*, 99, 333-340.
- SCHILDKRAUT, J. M., CALVOCORESSI, L., WANG, F., WRENSCH, M., BONDY, M. L., WIEMELS, J. L. & CLAUS, E. B. 2014. Endogenous and exogenous hormone exposure and the risk of meningioma in men. *J Neurosurg*, 120, 820-6.
- SCHUBERT, B., WALZER, M., BRACHVOGEL, H.-P., SZOLEK, A., MOHR, C. & KOHLBACHER, O. 2016. FRED 2: an immunoinformatics framework for Python. *Bioinformatics*, 32, 2044-2046.
- SCHULZ, S., PAULI, S. U., SCHULZ, S., HANDEL, M., DIETZMANN, K., FIRSCHING, R. & HOLLT, V. 2000. Immunohistochemical determination of five somatostatin receptors in meningioma reveals frequent overexpression of somatostatin receptor subtype sst2A. *Clin Cancer Res*, 6, 1865-74.
- SCHUMACHER, T. N. & SCHREIBER, R. D. 2015. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science*, 348, 69-74.
- SEKIDO, Y., PASS, H. I., BADER, S., MEW, D. J., CHRISTMAN, M. F., GAZDAR, A. F. & MINNA, J. D. 1995. Neurofibromatosis type 2 (NF2) gene is somatically mutated in mesothelioma but not in lung cancer. *Cancer Res*, 55, 1227-31.
- SESHAN, V. E. & OLSHEN, A. B. 2010. DNACopy: a package for analyzing DNA copy data.
- SHANKAR, G. M. & SANTAGATA, S. 2017. BAP1 mutations in high-grade meningioma: implications for patient care. *Neuro-Oncology*, 19, 1447-1456.
- SHAO, C., BAI, L. P., QI, Z. Y., HUI, G. Z. & WANG, Z. 2014. Overweight, obesity and meningioma risk: a meta-analysis. *PLoS One*, 9, e90167.
- SHIBUYA, M. 2015. Pathology and Molecular Genetics of Meningioma: Recent Advances. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 55 Suppl 1, 14-27.
- SHIGETOSHI YANO, JUN-ICHI KURATSU & GROUP, T. K. B. T. R. 2006. Indications for surgery in patients with asymptomatic meningiomas based on an extensive experience. *Journal of Neurosurgery*, 105, 538-543.
- SHIH, K. C., CHOWDHARY, S., ROSENBLATT, P., WEIR, A. B., 3RD, SHEPARD, G. C., WILLIAMS, J. T., SHASTRY, M., BURRIS, H. A., 3RD & HAINSWORTH, J. D. 2016. A phase II trial of bevacizumab and everolimus as treatment for patients with refractory, progressive intracranial meningioma. *J Neurooncol*, 129, 281-8.
- SHINOHARA, M., IO, K., SHINDO, K., MATSUI, M., SAKAMOTO, T., TADA, K., KOBAYASHI, M., KADOWAKI, N. & TAKAORI-KONDO, A. 2012. APOBEC3B can impair genomic stability by inducing base substitutions in genomic DNA in human cells. *Sci Rep*, 2, 806.
- SING, T., SANDER, O., BEERENWINKEL, N. & LENGAUER, T. 2005. ROCr: visualizing classifier performance in R. *Bioinformatics*, 21, 3940-1.
- SIRAGUSA, E., WEESE, D. & REINERT, K. 2013. Fast and accurate read mapping with approximate seeds and multiple backtracking. *Nucleic Acids Res*, 41, e78.

- SMITH, J. S., QUINONES-HINOJOSA, A., HARMON-SMITH, M., BOLLEN, A. W. & MCDERMOTT, M. W. 2005. Sex steroid and growth factor profile of a meningioma associated with pregnancy. *Can J Neurol Sci*, 32, 122-7.
- SMITH, M. J., HIGGS, J. E., BOWERS, N. L., HALLIDAY, D., PATERSON, J., GILLESPIE, J., HUSON, S. M., FREEMAN, S. R., LLOYD, S., RUTHERFORD, S. A., KING, A. T., WALLACE, A. J., RAMSDEN, R. T. & EVANS, D. G. 2011. Cranial meningiomas in 411 neurofibromatosis type 2 (NF2) patients with proven gene mutations: clear positional effect of mutations, but absence of female severity effect on age at onset. *J Med Genet*, 48, 261-5.
- SMITH, M. J., WALLACE, A. J., BENNETT, C., HASSELBLATT, M., ELERT-DOBKOWSKA, E., EVANS, L. T., HICKEY, W. F., VAN HOFF, J., BAUER, D., LEE, A., HEVNER, R. F., BEETZ, C., DU PLESSIS, D., KILDAY, J. P., NEWMAN, W. G. & EVANS, D. G. 2014. Germline SMARCE1 mutations predispose to both spinal and cranial clear cell meningiomas. *J Pathol*, 234, 436-40.
- SNYDER, A., MAKAROV, V., MERGHOUB, T., YUAN, J., ZARETSKY, J. M., DESRICHARD, A., WALSH, L. A., POSTOW, M. A., WONG, P., HO, T. S., HOLLMANN, T. J., BRUGGEMAN, C., KANNAN, K., LI, Y., ELIPENAHILI, C., LIU, C., HARBISON, C. T., WANG, L., RIBAS, A., WOLCHOK, J. D. & CHAN, T. A. 2014. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med*, 371, 2189-2199.
- SOMMERAUER, M., BURKHARDT, J. K., FRONTZEK, K., RUSHING, E., BUCK, A., KRAYENBUEHL, N., WELLER, M., SCHAEFER, N. & KUHN, F. P. 2016. 68Gallium-DOTATATE PET in meningioma: A reliable predictor of tumor growth rate? *Neuro Oncol*, 18, 1021-7.
- STAWSKI, R., PIASKOWSKI, S., STOCZYNSKA-FIDELUS, E., WOZNIAK, K., BIENKOWSKI, M., ZAKRZEWSKA, M., WITUSIK-PERKOWSKA, M., JASKOLSKI, D. J., OCH, W., PAPIERZ, W., SIKORSKA, B., RIESKE, P. & LIBERSKI, P. P. 2013. Reduced expression of ELAVL4 in male meningioma patients. *Brain Tumor Pathol*, 30, 160-6.
- SZOLEK, A., SCHUBERT, B., MOHR, C., STURM, M., FELDHAHN, M. & KOHLBACHER, O. 2014. OptiType: precision HLA typing from next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, 30, 3310-6.
- TABERNERO, M. D., ESPINOSA, A. B., MAILLO, A., REBELO, O., VERA, J. F., SAYAGUES, J. M., MERINO, M., DIAZ, P., SOUSA, P. & ORFAO, A. 2007. Patient gender is associated with distinct patterns of chromosomal abnormalities and sex chromosome linked gene-expression profiles in meningiomas. *Oncologist*, 12, 1225-36.
- TANG, X., JANG, S. W., WANG, X., LIU, Z., BAHR, S. M., SUN, S. Y., BRAT, D., GUTMANN, D. H. & YE, K. 2007. Akt phosphorylation regulates the tumour-suppressor merlin through ubiquitination and degradation. *Nat Cell Biol*, 9, 1199-207.
- TEAM, R. C. 2016. R: A language and environment for statistical computing [Computer software manual]. Vienna, Austria.
- TROFATTER, J. A., MACCOLLIN, M. M., RUTTER, J. L., MURRELL, J. R., DUYAO, M. P., PARRY, D. M., ELDRIDGE, R., KLEY, N., MENON, A. G., PULASKI, K., HAASE, V. H., AMBROSE, C. M., MUNROE, D., BOVE, C., HAINES, J. L., MARTUZA, R. L., MACDONALD, M. E., SEIZINGER, B. R., SHORT, M. P., BUCKLER, A. J. & GUSELLA, J. F. 1993. A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell*, 72, 791-800.
- VAN ALKEMADE, H., DE LEAU, M., DIELEMAN, E. M., KARDAUN, J. W., VAN OS, R., VANDERTOP, W. P.,

- VAN FURTH, W. R. & STALPERS, L. J. 2012. Impaired survival and long-term neurological problems in benign meningioma. *Neuro Oncol*, 14, 658-66.
- WANG, D. J., XIE, Q., GONG, Y., MAO, Y., WANG, Y., CHENG, H. X., ZHONG, P., CHE, X. M., JIANG, C. C., HUANG, F. P., ZHENG, K., LI, S. Q., GU, Y. X., BAO, W. M., YANG, B. J., WU, J. S., XIE, L. Q., ZHENG, M. Z., TANG, H. L., ZHU, H. D., CHEN, X. C. & ZHOU, L. F. 2013. Histopathological classification and location of consecutively operated meningiomas at a single institution in China from 2001 to 2010. *Chinese Medical Journal*, 126, 488-493.
- WICKHAM, H. tidyverse: Easily Install and Load “Tidyverse” Packages (2017). URL <https://CRAN.R-project.org/package=tidyverse>. R package version, 1, 51.
- WICKHAM, H. 2016. *ggplot2: elegant graphics for data analysis*, Springer.
- WIEMELS, J., WRENSCH, M. & CLAUS, E. B. 2010. Epidemiology and etiology of meningioma. *Journal of Neuro-Oncology*, 99, 307-314.
- XU, L. X., HE, M. H., DAI, Z. H., YU, J., WANG, J. G., LI, X. C., JIANG, B. B., KE, Z. F., SU, T. H., PENG, Z. W., GUO, Y., CHEN, Z. B., CHEN, S. L., PENG, S. & KUANG, M. 2019. Genomic and transcriptional heterogeneity of multifocal hepatocellular carcinoma. *Ann Oncol*.
- ZANG, K. D. 2001. Meningioma: a cytogenetic model of a complex benign human tumor, including data on 394 karyotyped cases. *Cytogenet Cell Genet*, 93, 207-20.
- ZONG, H., XU, H., GENG, Z., MA, C., MING, X., SHANG, M., LI, K., HE, X., DU, H., ZHAO, J. & CAO, L. 2014. Reproductive factors in relation to risk of brain tumors in women: an updated meta-analysis of 27 independent studies. *Tumour Biol*, 35, 11579-86.

7 Erklärung des Eigenanteils

Die Arbeit wurde in der Abteilung Neurologie mit interdisziplinärem Schwerpunkt Neuroonkologie unter Betreuung von Prof. Dr. Dr. Ghazaleh Tabatabai durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Dr. Irina Gepfner-Tuma und Prof. Dr. Dr. Ghazaleh Tabatabai.

Die Auswahl der Patientenkohorte wurde von Dr. Irina Gepfner-Tuma und mir durchgeführt.

Die Erhebung der klinischen Daten erfolgte durch mich.

Die DNA Isolierung/Qualitätskontrolle und Exomanalyse wurde von der Firma CeGat, Zentrum für Genomik und Transkriptomik durchgeführt.

Die immunohistochemische Färbung wurde von Prof. Dr. Jens Schittenhelm durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte durch Parveen Baskaran, Zentrum für Quantitative Biologie (QbiC), Dr. Irina Gepfner-Tuma und mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Laichingen, den

8 Danksagung

Zuerst möchte ich Frau Professor Ghazaleh Tabatabai für die Überlassung des Themas und die freundliche und kompetente Betreuung danken.

Ebenfalls bedanke ich mich bei allen Personen welche zur Entstehung dieser Dissertation beigetragen haben. Insbesondere sind das Frau Dr. Irina Gepfner-Tuma, Herr Parveen Baskaran, Herr Professor Jens Schittenhelm und Frau Dr. Susanne Beck. Weiterhin die Mitarbeiter der Neurologie, des Zentrums für Quantitative Biologie und der Firma CeGat. Meinen Eltern, die mir mein Studium und somit auch diese Dissertation ermöglicht haben, gilt ein besonderer Dank.