

3. Lassen sich so genannte hot-spot-Regionen im *NF2*-Gen feststellen, in denen besonders viele Mutationen auftreten?

4. Besteht ein Zusammenhang zwischen einem Verlust an Heterozygotie (LOH) auf Chromosom 22 und *NF2* Mutationen?

3. Material und Methoden

3.1. Tumore

Das Tumormaterial stammt von Patienten, die in der Neurochirurgischen Klinik des Universitätskrankenhauses Charité–Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum, der Neurochirurgischen Klinik Bonn und des Universitätsklinikums Münster operiert wurden. Während der Operationen gewonnenes Tumormaterial wurde geteilt. Ein Teil wurde in Formalin fixiert, der Abteilung für Neuropathologie zur Diagnosestellung übergeben und zur histologischen Aufarbeitung in Paraffin eingebettet. Der andere Teil wurde im Operationssaal in flüssigen Stickstoff überführt und später in der Tumorbank der Klinik für Neuropathologie bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Alle Meningeome wurden von erfahrenen Neuropathologen (Prof. von Deimling, Prof. Paulus) histologisch untersucht und entsprechend der Kriterien der zweiten überarbeiteten WHO-Klassifikation histologisch klassifiziert und graduiert.

In die Studie wurden ausschließlich seltene Meningeome vom psammomatösen, angiomatösen, mikrozystischen, sekretorischen, lymphoplasmazytenreichen und metaplastischen Subtyp des WHO-Grades I, klarzellige und chordoide Meningeome des WHO-Grades II und rhabdoide sowie papilläre Meningeome des WHO-Grades III eingeschlossen.

In der Kontrollgruppe wurden transitionale und fibroblastische Meningeome in gleicher Weise untersucht. Dabei wurden fünf der fibroblastischen Meningeome zufällig aus der bereits auf *NF2* Mutationen untersuchten Gruppe ausgewählt.

Folgende Tumoren wurden eingeschlossen:

- 9 angiomatöse Meningeome (WHO-Grad I)
- 7 mikrozystische Meningeome (WHO-Grad I)
- 14 psammomatöse Meningeome (WHO-Grad I)
- 33 sekretorische Meningeome (WHO-Grad I)
- 2 lymphoplasmozytenreiche Meningeome (WHO-Grad I)
- 1 metaplastisches Meningeom (WHO-Grad I)
- 3 chordoide Meningeome (WHO-Grad II)
- 9 klarzellige Meningeome (WHO-Grad II)
- 1 papilläres Meningeom (WHO-Grad III)
- 1 rabdoides Meningeom (WHO-Grad III)

In die Kontrollgruppe wurden folgende Tumore eingeschlossen:

- 23 transitionale Meningeome (WHO-Grad I)
- 25 fibroblastische Meningeome (WHO-Grad I)
- 5 fibroblastische Meningeome, verblindet (ID:916,2068,2082,2312,3062)

3.2. Materialien

Geräte:

- ABI PRISM 377 DNA Sequencer (AB, Applied Biosystem)
- Abstandshalter, Gelkamm 0,75 µm Dicke, Klammern (SERVA)
- Agarosegel-Rahmen
- Bakterien Schüttler, TH 30, SM 30 (Edmund Bühler)
- Elektrophoresekammern, Blur Seq 400 (SERVA)
- Färberahmen (Eigenanfertigung)
- Filterpapier, 2316 (Schleicher&Schnell)

- Gefriermikrotom, HM560 (Microm)
- Geltdrockner, Model GD4534 (SCIE-PLAS); Drygel Sr., SLab Gel Dryer, Model SE1160 (Hoefer Scientific Instruments)
- Glasplatten (Eigenbau)
- Glasplatten, Abstandshalter (0.25 mm Dicke), Kamm , Klammern (AB)
- Membranfilter RC 58, Porengröße 0,2 µm (Schleicher&Schnell)
- Mikrotom, HM 335 E (Microm)
- Mini-Wasserbad (Julabo)
- PCR-Maschine, T Gradient (Biometra)
- PCR-Maschine, UNO-Thermoblock (Biometra®)
- Powersupply, Blue Power 3000 und Blue Pover 500 (SERVA)
- Powersupply
- Thermoblock, Thermomixer comfort (Eppendorf)
- UV-Tisch, Intas® UV-Systeme)
- Zentrifuge, Biofuge fresco (Heraeus Instruments)
- Zentrifuge, Biofuge pico (Heraeus Instruments)
- Zentrifuge, Megafuge 1 OR (Heraeus Instruments)

Reagenzien:

- 0,2% Silbernitratlösung, aus Silbernitrat (MERCK)
- 0,6 x TBE (60 ml 10xTBE auf 1 l Aqua dest.)
- 1% Salpetersäure, aus 65% Salpetersäure (MERCK)
- 10 x TBE-Puffer (62,0 g Tris Base, 27,5 g Borsäure, 9,5 g EDTA zu 1 l H₂O)
- 10% Essigsäure (MERCK)
- 100% Ethanol (MERCK)
- 100% Ethanol denaturiert mit Ethylmethylketon (Herbeter Arzneimittel)
- 10xPCR Buffer II, 1,5 ml (Applied Biosystems)
- 10xTBE-Puffe (auf 5 l Stammlösung: 540 g Trizma Base (SIGMA), 275 g Borsäure zur Analyse (MERCK), 200 ml EDTA 0,5 M, pH 8,0 (SIGMA)
- 3% NaCO₃-Lösung (MERCK) mit 0,05% Formaldehyd (MERCK)
- 30% Acrylamid-Lösung (BioRad)

- Acrylamid 4x, 40% Lösung (SERVA)
- Acrylamid 99% (SIGMA)
- Agarose (SIGMA)
- Agarose Standard
- Ampli Taq® DNA Polymeras, 250 Units, 5U/µl (Applied Biosystems)
- APS 10 % (0,1 g Ammonium Persulphate 98+% (SIGMA), 1 ml Aqua bidest.)
- Aqua ad iniectalilia (BRAUN)
- Big Dye® (ABI), 5xSequencing Buffer (ABI)
- Blut-Buffys, Institut für Humangenetik, Universitätsmedizin Berlin-Charité
- Buffer 1, Buffer 2, Buffer 3, Proteinase K
- Dichlordimethylsilan 5% (190 ml Chloroform (J.T.Backer), 10 ml Dichlordimethylsilane 99% (ALDRICH))
- dNTP Mix, 2 mM, 1 ml (Fermentas)
- Ethanol pro Analysis (MERCK)
- Ethidiumbromid (SIGMA)
- Harnstoff (MERCK)
- Invisorb®BloodGiga Kit 100 (InViTec)
- LOH-Standardpuffer (5 µl pUC 19, 75 µl Aqua bidest, 80 µl LOH Dye)
- MgCl₂ Solution, 25mM, 1,5 ml (Applied Biosystems)
- Mikrosatellitenmarker
- Millipore Aufreinigungs Kit, PCR 96 Cleanup Plates, montage™ lifescience kits, Genomics
- N,N-Methylen-bis-Acrylamid 2x, 2% Lösung (SERVA)
- N,N-Methylen-bis-Acrylamid 99+% (SIGMA)
- Oligo Primer (MWG-Biotech AG), Verdünnung 1:10
- PCR Master Mix, 2X, 1,25 ml (Promega Corporation, Madison, U.S.A.)
- pUC 19/ Msp I (HpaII) Marker, 23 (MBI Fermentas), Verdünnung: 1 µl Marker 23, 1 µl Loading Dye Solution, 4 µl Aqua dest.
- QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN), Buffer ATL, Proteinase K, Buffer AL, Buffer AW1, Buffer AW2, Buffer AE, QIAmp spin column
- QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), Buffer QG, Buffer PE (plus 100% Ethanol), Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5), QIAquick spin column,

Diffusions Puffer (aus 0.5 M Ammoniumacetat, 10 mM Magnesiumacetat, 1 mM EDTA (ph 8,0) und 0.1% SDS (sodiumdodecylphosphate), Natriumacetat 3 M, pH 5,0

- Sephadex DNA Gerade G 50 fine (SIGMA) (55mg je Ansatz plus 700 µl Aqua dest.), Sephadex-Röhrchen, Sammelröhrchen
- Sequenzierladepuffer
- SSCP-Marker (5 µl pUC 19 Marker 23, 80 µl SSCP-Standardpuffer, 75 µl Aqua dest.)
- SSCP-Standardpuffer (90% Formamid, 10% 10xTBE, 1mM EDTA (SIGMA), 0,01% SDS, 0,25% Bromphenolblau (SIGMA), 0,25% Xylencyanol (SIGMA), 0,06 M NaOH)
- TEMED (SIGMA)
- Xylol (MERCK)

Computerprogramme:

- ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer DATA Collection, Version 2.1 (©Perkin Elmer Corp.)
- Basic Logic Alignment Search Tool, blast 2 seq (NCBI)
- Chromas 1,45©Conor McCarthy
- EditSeq™ 5.00 © DNASTAR Inc.
- Generunner, Version 3.05 (©Hastings Software Inc.)
- Primer 3 © Whitehead Institute for Biomedical Research, MIT
- SeqMan™II 5.00 © DNASTAR Inc.
- GenScan (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>)
- NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2>)
- GeneSplicer (http://www.tigr.org/tdb/GeneSplicer/gene_spl.html)

3.3. Methoden

3.3.1. HE-Färbung

Aus 0,6 µM dicken Gewebeschnitten wurden Übersichtsfärbungen mit Hämatoxylin-Eosin angefertigt. Das basophile Zytoplasma, Zellkerne und Kalk stellen sich hierbei blau, eosinophiles Zytoplasma und Bindegewebsfasern rot dar.

Folgende Arbeitsschritte wurden durchgeführt:

Gegebenenfalls Trockenschrank, 10 min bei 60°C, um Paraffin zu entfernen

Xylol, 2x5 min

Absteigende Alkoholreihe (2x 100%, 96%, 80%, 70%)

Hämalaun, 5-10 min

Bläuen in Leitungswasser

Eosin, 1 min

Spülen in Leitungswasser

Aufsteigende Alkoholreihe (80%, 96%, 2x100%)

Die Objektträger wurden mit Xylol eingedeckt.

3.3.2. Primer

Mit Hilfe des Internet-Programms Primer3 und des Programms Oligo 4.0 wurden 20 und 22 bp lange Oligomere entwickelt, die jeweils komplementär zum forward und reverse Strang der einzelnen Exone des NF2 Gens sind und ein Produkt einschließen, das nicht länger als 230 bp ist. Es wurde auf annähernd gleiche Annealingtemperaturen der Paare geachtet und darauf, dass sie nicht komplementär zueinander sind. Die Oligos wurden bei der MWG-Biotech AG bestellt.

Folgende Primer wurden verwendet: Tabelle 2: SSCP-Primer und Bedingungen

Ex	Primernr.	SP, ASP	Sequenz	Temp. C°	Mg (mM)	Product bp
1	1753	SP	5'- CTAAAGGGCTCAGAGTGCAG - 3'	62,9	1	209
1	1754	ASP	5'- CTGTCACCGCAGCAGTCG - 3'			
2	1787	SP	5' - CCCATTGTTTTGTTATTGC - 3'	58,5	1	178
2	1788	ASP	5' - CCCACCAGTTTCATCGAGTT - 3'			
3	1755	SP	5' - GGTAGCACAGGAGGAAGTGC - 3'	58,5	1	204
3	1756	ASP	5' - GGGGTACCCTTGACTGATGT - 3'			
4	1757	SP	5' - TCATGTCTCCCTTGTTGCTC - 3'	58,5	1	156
4	1758	ASP	5' - CAAATTAACGCCAGGAAAA - 3'			
5	1759	SP	5' - GAATCTCAATCGCCTGCTCT - 3'	58,5	1	180
5	1760	ASP	5' - CAAGTCCTTTGGTTAGCTTT - 3'			
6	2016	SP	5' -AAAAGTGGCAAACAATACCAAA -3'	56,2	1	190
6	2017	ASP	5' -GCCCATAAAGGAATGTAAACCA -3'			
7	1763	SP	5' - GCTCTCCACCCATCTCACTT - 3'	66,4	1,5	198
7	1764	ASP	5' - TTTAGCAGTCTGGCCCTCAC - 3'			
8	1765	SP	5' - TCAGCTGGCGCTTACAGTAG - 3'	58,5	1	227
8	1766	ASP	5' - GCAGACAGGGAAAGATCTGC - 3'			
9	1767	SP	5' - TTGTGGAATTTCCAATTGCT - 3'	58,5	1	174
9	1768	ASP	5' - GTAATGAAAACCAGGATCTC - 3'			
10	1769	SP	5' - CTTTTTGTCTGCTTCTGTGG - 3'	59,4	1	179
10	1770	ASP	5' - ACATCATCAGTAAAACAAG - 3'			
11	1771	SP	5' - GCATCTTTGGGCCCTTGTGG - 3'	58,5	1	216
11	1772	ASP	5' - CAGCCCCTCAGAAATCACCA - 3'			
12a	1773	SP	5' - CAGCACATGATCCCCTTCA - 3'	60,9	1	174
12a	1774	ASP	5' - CGAATCGCTGTGGCCTTGAT - 3'			
12b	1775	SP	5' - GCAGCGCATCAAGGCCACAG - 3'	60,9	1	163
12b	1776	ASP	5' - CGGCCCTTCGCCAGCCTCCT - 3'			
13	1777	SP	5' - GCTACCTGCCCTCTTCTGTG - 3'	58,5	1	215
13	1778	ASP	5' - CGGGAGGAAAGAGAACATCT - 3'			
14	1779	SP	5' - CCCAAGCTCCTAATCCGAAA - 3'	58,5	1	204
14	1780	ASP	5' - TAGTTCACAGCTGCCACAG - 3'			
15a	1781	SP	5' - ATGCATGATACCCTCTTGCC - 3'	58,5	1	151
15a	1782	ASP	5' - TCGGAGTTCTCATTGTGCAG - 3'			
15b	1783	SP	5' - CTCAATGAACTCAAGACAGA - 3'	56,2	1	152
15b	1784	ASP	5' - GCAAATACAAGAAAGAGAC - 3'			
16	1785	SP	5' - GGCACTTATGGCATTGTTGA - 3'	58,5	1	200
16	1786	ASP	5' - GGACAGAGACAGGCAAGCTC - 3'			

Tab. 2 Legende: SP=SensePrimer, ASP=AntiSensePrimer, Ex=Exon, Temp.=Temperatur, bp=Basenpaare

Zur Optimierung der Primer wurden mit verschiedenen Buffys Gradienten-PCRs angefertigt und zur Auswertung Agarosegele verwendet. Anschließend konnte aus drei unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen und sechs Temperaturen die optimale Kombination ausgesucht werden.

3.3.3. DNA-Extraktion aus Paraffin- und Gefrierschnitten

Vorbereitung des Materials:

Aus der Tumorbank wurden die jeweiligen Paraffinblöcke herausgesucht. War genügend gefrorenes Gewebe bei -20°C eingelagert worden, wurde dieses zur Extraktion herangezogen.

Aus den Paraffinblöcken wurden am Mikrotom je ein Feinschnitt von 5 μm Dicke angefertigt, dann 10 Leerschnitte von 20 μm Dicke und ein abschließender Feinschnitt. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und die Feinschnitte HE-gefärbt (s.u.). Anhand der HE-Schnitte wurde beurteilt, ob Tumorgewebe getroffen wurde und ob z.B. Meningen oder große Gefäße im Anschnitt miterfasst sind. Mit einem Skalpell wurde dann nur das Tumorgewebe von den Objektträgern der Leerschnitte abgekratzt und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben.

Das Gefriermaterial wurde am Gefriermikrotom geschnitten. Vor und nach den 30 Gropschnitten von 2 μm wurde zur Kontrolle jeweils ein Feinschnitt von 6 μm angefertigt, der HE-gefärbt wurde. Die 30 Gropschnitte wurden zur Weiterverarbeitung in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß gesammelt.

Extraktion:

Zur DNA-Extraktion wurde der QIAmp DNA Mini Kit verwendet. Zunächst wurden den Gewebeproben 180 μl „Buffer ATL“ zugegeben. Bei viel Gewebe wurde die doppelte Menge verwendet, um eine möglichst effiziente DNA Ausbeute zu erhalten.

80 μl der mitgelieferten Proteinase K wurden dazugegeben und die Proben nach gründlichem Durchmischen bei 56 Grad und 750 rpm im Thermoblock über Nacht verdaut. Nach kurzem Zentrifugieren wurden die Proben mit 200 μl „Buffer AL“ versetzt und gemischt. Um die Proteinase K zu denaturieren und die Reaktion zu stoppen mussten die Proben 10 min bei 70 Grad inkubieren. Danach erneutes Zentrifugieren bei 13.000 rpm und Zugabe von 200 μl 100 % Ethanol. Die Lösung wurde 15 sec gründlich geschüttelt und kurz zentrifugiert.

Der Inhalt der Eppendorfgefäße musste dann vorsichtig in ein vorbereitetes QIAmp spin column auf den Membranfilter gegeben, die Röhrchen in einen Sammelgefäß gestellt und bei 13.000 rpm 1min zentrifugiert werden. Der Durchlauf konnte verworfen werden. Ist anfangs die doppelte Menge Puffer eingesetzt worden, wurde dieser Schritt noch einmal wiederholt.

Zum Waschen der DNA wurden 500 µl des Puffers „Buffer AW1“ auf die Membran gegeben und 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Dann wurden 500 µl des Puffers „Buffer AW2“ aus demselben Kit zugegeben und weitere 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde wiederum verworfen.

Anschließend wurden die Röhrchen leer ein weiteres Mal für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, um letzte Pufferreste zu entfernen. Jetzt wurden die QIAmp spin Röhrchen in beschriftetes 1,5 ml Eppendorfgefäß gestellt. 50 µl des Puffers „Buffer AE“ wurden dann auf die Membran gegeben und zum lösen der DNA 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden dann 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal durchgeführt. Allerdings wurde bei der Extraktion aus Paraffin beim zweiten Durchgang nur 30 µl „Buffer AE“ eingesetzt.

Auf diese Weise wurden aus Gefriermaterial rund 100 µl, aus in Paraffin gebettetem Material rund 80 µl DNA in Lösung gewonnen.

3.3.4. DNA-Extraktion aus Vollblut

Zur Extraktion der lymphozytären genomischen DNA aus den Vollblut-Proben der Patienten wurde das InViTec-Kit eingesetzt. Das von den einzelnen Vollblut-Proben zur DNA-Extraktion verwendete Volumen lag bei etwa 10 ml.

Aus der Vollblut-Probe, die bei -80°C gelagert war, wurden 10 ml entnommen und in ein insgesamt 50 ml fassendes Reaktionsgefäß (Falconröhrchen) überführt. Dem Vollblut wurden 30 ml gekühlter Puffer (Buffer 1 des InViTec-Kits) beigegeben, der entstehende Ansatz inkubierte dann für 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4300 rpm mit einer Dauer von 10 min. Dabei bildete sich am Boden des Gefäßes ein sichtbares Pellet aus zusammengelagerten Lymphozyten und anderen Blutbestandteilen. Der darüber befindliche Überstand wurde verworfen.

Nun erfolgte eine erneute Zugabe des Puffers (20 ml Buffer 1) sowie ein Vortexen des Gemisches im Falconröhrchen, wodurch sich das Zellpellet vom Boden des Gefäßes ablöste. Das Reaktionsgefäß mit diesem Ansatz wurde erneut für 10 min bei 4300 rpm zentrifugiert und danach der Überstand über dem Zellpellet entfernt; dieser Schritt dient der weiteren Reinigung der zusammengelagerten Lymphozyten.

Zum Pellet wurden nun 3 ml des zweiten Puffers (Buffer 2 aus dem Kit) sowie 50 µl Proteinase K zugegeben. Nach Resuspendieren des Zellpellets wurde der Ansatz

über Nacht im Wasserbad bei 60°C inkubiert. Dieser Schritt bewirkt die Zellyse und die Freisetzung der DNA.

Im Anschluss hieran wurden 1,8 ml des dritten Puffers (Buffer 3) zugegeben, der Ansatz intensiv gemixt und dann für 15 min auf Eis gelegt. Nach dem Abkühlen wurde der Ansatz für 20 min bei 4300 rpm zentrifugiert; der dabei entstehende klare DNA-haltige Überstand hatte ungefähr ein Volumen von 5 ml. Dieser wurde mithilfe einer Pasteur-Pipette in ein neues, insgesamt 15 ml fassendes Reaktionsgefäß überführt.

Es erfolgte dann die Zugabe von 2 Volumeneinheiten (ca. 10 ml) 96%-igem Ethanol. Das Reaktionsgefäß wurde geschwenkt, um das Ausfällen der genomischen DNA zu bewirken. Daran anschließend wurde der Ansatz für 5 min bei 4300 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde behutsam entfernt. Am Boden des Reaktionsgefäßes wurde die ausgefallene DNA sichtbar.

Nun erfolgte die Zugabe von 10 ml 70%-igem Ethanol und das Waschen des DNA-Pellets mittels Vortexen, die Zentrifugation des Ansatzes für 5 min bei 4300 rpm und wiederum das sorgfältige Entfernen des Überstandes. Dieser Schritt wurde anschließend in gleicher Weise wiederholt. Das Ethanol wurde mithilfe einer Pipette so vollständig wie möglich entfernt und das entstandene (konzentrierte) DNA-Pellet im Reaktionsgefäß bei geöffnetem Deckel getrocknet.

Nach vollständiger Trocknung bzw. Verflüchtigung des Ethanols wurden zwischen 650 und 950 µl Aqua dest. zugegeben. Das jeweils hinzugefügte Volumen an Aqua dest. orientierte sich dabei an der Materialmenge der gewonnenen DNA. Der Ansatz wurde dann über Nacht im Kühlschrank belassen, um ein besseres Lösen der DNA zu erreichen.

3.3.5. PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Die Polymerase-Chain reaction (PCR) dient der exponentiellen Vervielfältigung von DNA-Fragmenten (Mullis and Faloona 1987). Hierbei wird die Eigenschaft der Taq-Polymerase genutzt, auch bei hohen Temperaturen nicht zu denaturieren.

Nach dem Denaturieren der Doppelstrang-DNA bei 95°C lagern sich die Primerpaare bei der zuvor optimierten Temperatur an den komplementären DNA-Einzelstrang an (Annealing). In Gegenwart von Desoxynucleosidtriphosphat wird die Elongation von der

Taq-Polymerase gestartet. Dieser Reaktionszyklus wird mehrere Male wiederholt, wobei die amplifizierte DNA-Menge bei jedem Zyklus exponentiell vermehrt wird.

Für die SSCP Analyse wurde die PCR in 10 µl Reaktionsvolumen durchgeführt. Hierzu wurden je 1 µl PCR-Puffer, 0,4/0,6 µl mM MgCl₂, 1 µl dNTP, 0,5 µl Primer forward, 0,5 µl Primer reverse, 1 µl DNA, 5,5 µl Aqua injectabilia Braun und 0,1 µl Taq-Polymerase pro Reaktionsgefäß pipettiert. Die Reaktion wurde nach folgendem Programm in einem Thermocycler Perkin Elmer 480 oder in einem Eppendorf Master Cycler Gradient durchgeführt:

Initiale Denaturierung:	94 °C für 5 min
x Zyklen à:	
Denaturierung der dsDNA:	94 °C für 1 min
Primer annealing:	Primer-spezifische Temperatur für 1 min
Elongation:	72 °C für 1,5 min
Finale Elongation:	72 °C für 10 min

3.3.6. SSCP-Analyse

Zum Untersuchen auf Mutationen auf Nukleotid-Ebene wurde die Technik der SSCP-Analyse (Single Strand Conformation Polymorphism, Einzelstrang-Konformations-Polymorphismen) verwendet. Mit dieser Methode können prinzipiell bis zu 500 bp große DNA-Fragmente untersucht werden, die mithilfe der PCR amplifiziert werden. Bei dieser Arbeit betrug die Fragmentlänge zwischen 156 und 227 bp.

Nach Denaturierung der DNA in Einzelstränge erfolgte das Auftrennen auf ein hochauflösendes, nicht-denaturierendes Polyacrylamid-Gel. Die Einzelstrang-DNA nimmt spezifische dreidimensionale Konformationen ein, die in der Gel-Elektrophorese ein spezifisches Laufverhalten haben. Die Einzelstränge zeigen sich nach Silberfärbung als Doppelbanden auf dem Polyacrylamid-Gel.

Liegt eine Mutation in der Nukleotidsequenz vor, z.B. eine Deletion oder eine Punktmutation, kommt es zu einer geänderten Konformation des DNA-Moleküls, was sich in einem veränderten Laufverhalten der Banden bei der Elektrophorese zeigt (aberrante Banden).

Vorbereitung des Polyacrylamid-Gels:

Ansatz für 14%-iges Acrylamidgel, 1:49 verdünnt.

Zusammensetzung für 70ml Gelvolumen:

29,19 ml Aqua dest.
24,01 ml Acrylamid (AA) 40%
9,8 ml Bisacrylamid (BAA) 2%
7,0ml 10xTBE-Puffer
40 µl TEMED
400 µl APS

Zwei Glasplatten wurden mit Leitungswasser und Seife gereinigt, dann mit 100% Ethanol die Seifenreste entfernt. Unter einem Abzug wurden die Platten einseitig mit Dichlorodimethylsilan 5% (reines Chloroform, Dichlorodimethylsilan 1:10) beschichtet. Die Platten wurden unter Verwendung zweier seitlicher Abstandshalter (0.75 mm) so zusammengelegt, dass die Silan-beschichteten Seiten nach innen zeigen. Die Platten wurden mit Klammern in dieser Lage fixiert. Zwischen die Platten wurde das vorbereitete Polyacrylamid-Gel blasenfrei eingebracht.

Ein Gelkamm (für 40 Taschen) wurde zwischen die Glasplatten geschoben. Anschließend musste das Gel mindestens 1 Stunde polymerisieren, bevor Gelkamm und Klammern entfernt und die Platten mitsamt der Haltevorrichtung in die Elektrophoresekammer eingehängt wurden. Die obere und untere Pufferkammer der Elektrophoresevorrichtung wurden mit 1xTBE-Puffer aufgefüllt und eventuelle Luftblasen aus den Geltaschen entfernt.

Durchführen der Elektrophorese:

Je Probe wurden 10 µl PCR-Produkt und 7 µl SSCP-Standardpuffer (90% Formamid, 10% 10xTBE, 1mM EDTA, 0,01% SDS, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 0,06 M NaOH) bei 95°C für 5 bis 10 Minuten denaturiert und dann sofort auf Eis gestellt. Je 5 µl des Ansatzes wurden in die Geltaschen pipettiert. In die erste Tasche wurde ein SSCP-Marker (aus 5 µl pUC 19 Marker 23, 80 µl SSCP-Standardpuffer, 75 µl Aqua dest.) pipettiert.

An der Stromquelle werden die folgenden elektrischen Parameter programmiert: 3000 V, 200 mA, 3 W, 16-18 Stunden Laufzeit (über Nacht) und die Elektrophorese gestartet.

Abweichende Bedingungen für andere Gelkonzentrationen:

Gelkonzentration	Zusammensetzung	Elektrophoresebedingungen
14%-iges Acrylamidgel 1:49 + Glycerol	3,5 ml Glycerol 25,69 ml Aqua dest.	3 W
16%-iges Acrylamidgel 1:49	27,44 ml AA, 11,20 ml BAA, 24,36 ml Aqua dest.	6 W
16%-iges Acrylamidgel 1:49 + Glycerol	3,5 ml Glycerol, 27,44 ml AA, 11,20 ml BAA, 20,86 ml Aqua dest.	6 W

Silberfärbung des Gels:

Das Polyacrylamid-Gel wird aus der Elektrophoresekammer genommen und die Glasplatten vorsichtig voneinander gelöst; das Gel haftet an einer Platte und wird in einen Färberahmen eingespannt.

Zur Entwicklung werden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

- Fixierung mit 10% Ethanol für 10 min Einwirkzeit
- Einstellen eines sauren pH-Wertes mit 1%-iger Salpetersäure für 30 sec
- 1x Spülen mit Aqua dest.
- Färbung mit 0,2%-iger Silbernitratlösung für 20 min unter Lichtabschluss (Ag^+ Anlagerung an die DNA)
- 3x Spülen mit Aqua dest.
- Entwicklung mit 3%-iger NaCO_3 -Lösung mit 0,05% Formaldehyd, bis die beiden Einzelstrang-Banden sichtbar werden (metallisches Silber fällt aus)
- Stoppen der Reaktion mit 10%-iger Essigsäure, Einwirkzeit 2 bis 5 min

Das gefärbte Gel wird auf Filterpapier aufgezogen und für ca. 1 Stunde auf einem Vakuumgeltrockner getrocknet.

3.3.7. LOH Analyse

Bei der **Loss Of Heterozygosity-Analyse** (LOH-Analyse) können polymorphe repetitive Regionen des Genoms mittels Mikrosatelliten-Markern auf Allelverluste

untersucht werden. Beim direkten Vergleich von Lymphozyten-DNA und Tumor-DNA kann so bei Heterozygotie gegebenenfalls ein LOH festgestellt werden. Hierzu wird die DNA auf ein denaturierendes Acrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Fragmente unterscheiden sich häufig in ihrer Größe zwischen dem maternalen und paternalen Allel, wodurch optimalerweise zwei Banden angefärbt werden.

Vorbereitung des Acrylamid-Gels:

Es wurde ein 8% Harnstoff-Gel verwendet, die Stammlösung wurde für 500 ml angesetzt und bei Raumtemperatur gelagert.

Zusammensetzung :

250 g Harnstoff
38,7 g Acrylamid
1,33 g Bisacrylamid
50 ml 10xTBE-Puffer
Bis 500 ml mit 1xTBE-Puffer auffüllen

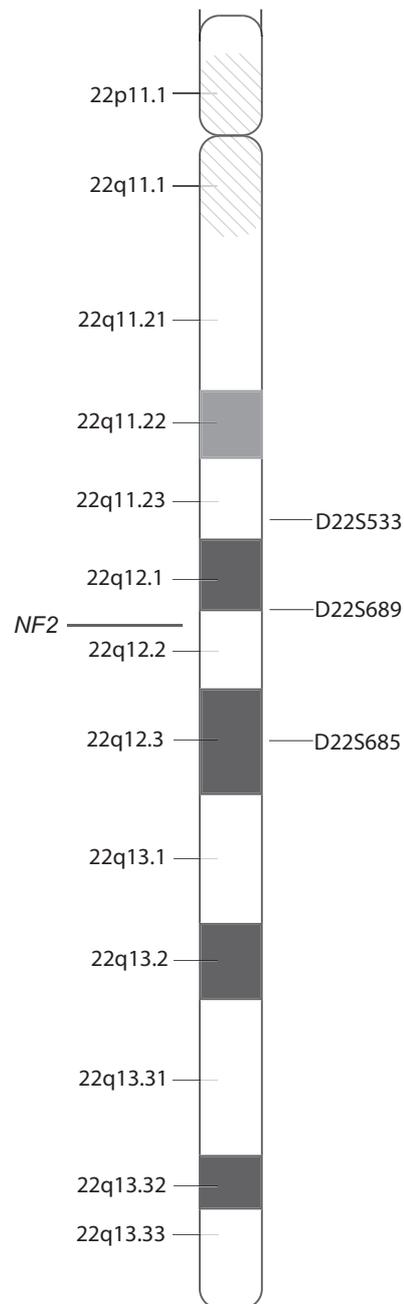
Zu 70 ml Ansatz wurden 400 µl APS und 40 µl TEMED gegeben. Die Lösung wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen. Dies und das weitere Vorgehen war wie bei der SSCP-Analyse beschrieben.

Durchführen der Elektrophorese:

Um Allelverluste im *NF2* Gen zu detektieren, wurden die flankierenden Marker D22S689, D22S683 und D22S533 verwendet. Nach Amplifizierung mittels PCR in 10 µl Reaktionsvolumen wurden 7 µl LOH-Standardpuffer zugegeben. Nach 10 min Denaturieren bei 95°C und Lagerung auf Eis wurden je 5 µl Probe auf das Gel pipettiert. Die Stromquelle wurde wie folgt programmiert: 3000 V, 200 mA, 75 W, 2 Stunden Laufzeit.

Auch hier wurde zur Sichtbarmachung der Banden die Silberfärbung wie oben beschrieben verwendet.

Abb. 15: Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 22



3.3.8. DNA-Extraktion aus Polyacrylamid-Gel

Nach dem Anfärben wurden aberrante Banden mit einem Skalpell aus dem noch feuchten SSCP-Gel ausgeschnitten und einzeln in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße gegeben.

Die DNA-Extraktion wurde nach dem QIAquick Protokoll von QIAGEN vorgenommen, einer bearbeiteten Methode nach Sambrook et al. 1989 (Sambrook and Russell 2001).

Den ausgeschnittenen Gelbanden wurden je 200 µl Diffusionspuffer zugegeben und bei 50°C über 30 min inkubiert. Der Diffusionspuffer wurde selber vorbereitet aus 0,5 M Ammoniumacetat, 10 mM Magnesiumacetat, 1 mM EDTA (pH 8,0) und 0,1% SDS (sodiumdodecylphosphate).

Die Proben wurden bei 13000 rpm eine Minute zentrifugiert und der Überstand vorsichtig, ohne Gelreste mitzunehmen, in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Drei Volumeneinheiten des mitgelieferten Buffer QG, der durch Gelbfärbung zugleich ein pH-Indikator $\leq 7,5$ ist, wurden zugegeben. Bei Farbveränderungen nach Orange oder Violett mussten 10 µl 3M Natriumacetat (pH 5,0) zugegeben werden.

Um die DNA-Fragmente zu binden, wurden die Proben in ein QIAquick spin column Gefäß überführt, in ein 2 ml Sammelgefäß gestellt und 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und zum Waschen 750 µl Buffer PE auf die Proben gegeben und wiederum 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde erneut verworfen und das leere Röhrchen eine weitere Minute zentrifugiert, um restliches Ethanol des Buffer PE zu entfernen.

Danach wurde das QIAquick spin column in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gestellt. Um die DNA zu lösen, wurden 30µl Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) direkt auf die Membran des QIAquick spin column pipettiert, für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Es wurden ca. 28 µl DNA-Lösung gewonnen.

3.3.9. Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurden die Proben der zuvor aus Polyacrylamid-Gel ausgeschnittenen Einzelstrangbanden in 40 µl Reaktionsvolumen in einer PCR amplifiziert und mit dem Millipore Kit aufgereinigt, um überschüssige Primer und Reagenzien zu entfernen. Hierzu wurden die Proben auf die 96 Well Millipore Platten gegeben und mit einer Saugpumpe durch den Filter gesogen. Nach Waschen mit 70 µl Aqua BRAUN wurden je 30 µl Aqua Braun in die Wells gegeben und die DNA bei 37°C bei 100 rpm für 15 min gelöst. Zur Kontrolle wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen.

Die Sequenzierung wurde mit dem „Big-Dye-sequencing-kit“ (Perkin Elmer) durchgeführt.

Die Cycle-Sequenzierungs-PCR wurden für jeden Primer für ein Volumen von 10 µl angesetzt:

2 bis 4,5 µl PCR Produkt (variierend nach Signal im Agarosegel)

2 µl BIG Dye

2 µl Sequencing Buffer

0,5 µl Primer

ad 10 µl Aqua BRAUN bzw. Deionisiertes H₂O

Die Cycle-Sequencing PCR wurde wie folgt programmiert:

93°C, 3 sec

96°C, 10 sec,

spezifische Primer Annealing-Temperatur, 15 sec

60°C, 4 min

nach 25 Zyklen Pause bei 20°C.

Anschließend wurde das Cycle Sequencing-Produkt über Sephadex-Röhrchen aufgereinigt. Hierzu wurden pro Röhrchen 55 mg Sephadex und 700 µl Aqua dest. angesetzt und für eine Stunde quellen gelassen. Nach zweimaligem Zentrifugieren bei 3000 rpm für 2 min zum Entfernen des Wassers wurden die Röhrchen in saubere Eppendorf-Gefäße gestellt, die Proben zentral auf die Sephadex Säule pipettiert und wiederum zentrifugiert (3000 rpm, 2 min). Bei 65°C wurden die so aufgereinigten Proben im Thermoblock eingetrocknet.

Das Sequenziergel wurde wie folgt angesetzt:

18 g Harnstoff

7,5 ml 30% Acrylamidlösung 1:29 (BioRad)

6.0 ml 10x TBE

23 ml Aqua dest.

Zum Entgasen wurde der Ansatz durch einen Filter (Porengröße 0,2 µm) vakuumfiltriert und 350 µl 10% APS und 20 µl TEMED blasenfrei zugegeben. Das Gel polymerisierte für 2 h zwischen zwei Glasplatten, die vorbereitend mit Aqua dest. und

Alkonox gründlich gereinigt wurden. Die Dicke des Gel beträgt 0,25 mm, ein Zackenkamm für die Taschen wurde eingesteckt.

Das Gel wurde anschließend in den ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer eingehängt, die Pufferkammern mit 1x TBE aufgefüllt und der Pre-run des Programms ABI PRISM 377 zum Vorwärmen gestartet. Zwischenzeitlich wurden die eingetrockneten Proben mit je 2 µl Sequenzierladepuffer vermengt, für 3 min bei 95°C im Thermoblock denaturiert und sofort auf Eis gelagert.

Für die Sequenzierung wurden je 1 µl Probe eingesetzt. Das Programm wurde wie folgt eingestellt: Vorlaufzeit: 15 min, 800 V, 45 mA, 30 W, 45°C, Laufzeit: ca. 3 Stunden.

Die gewonnenen Daten wurden gespeichert und mit Hilfe des Basic Logic Alignment Search Tool, einem Internet-Programm der Gendatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI), und des Programms Genrunner ausgewertet.

4. Resultate

4.1. Resultate SSCP-Analyse

Die SSCP-Analyse wurde verwendet, um die 133 Meningeome auf Mutationen in Exon 1 bis Exon 16 des NF2 Gens zu untersuchen. Neben den seltenen Varianten wurden 23 transitionale und 25 fibroblastische Meningeome als Kontrollgruppe eingeschlossen. 5 fibroblastische Meningeome wurden blind untersucht.

Das mittlere Alter aller Patienten betrug 57,5 Jahre bei einer Altersspannweite von 4 bis 88 Jahren. Die Patienten mit seltenen Meningeomsubtypen waren im Durchschnitt 57 Jahre alt. Unterteilt nach WHO-Graden ergab sich für die diese Gruppe folgender Altersdurchschnitt:

WHO-Grad I:	60 Jahre
WHO-Grad II:	41 Jahre
WHO-Grad III:	53 Jahre

Bei der Geschlechterverteilung waren Frauen mit einer Rate von 4:1 insgesamt häufiger betroffen als Männer. Bei den seltenen Subtypen war die Frau:Mann Verteilung 3,5:1.