

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.

Aberrantes Laufverhalten der Banden in der SSCP-Analyse wurde zunächst bei 35 Tumoren beobachtet (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Ergebnisse des SSCP-Screenings

ID	TISSUE	NF2 shift
25278	M I trans	ex 1
25084	M I trans	ex 1
22678	M I trans	ex 4
25216	M I trans	ex 4
26426	M I trans	ex 5
25022	M I trans	ex 6
25216	M I trans	ex 7
25292	M I trans	ex 14
29416	M I fibrobl	ex 1
29418	M I fibrobl	ex3
828	M I fibrobl	ex 4
27054	M I fibrobl	ex 6
29446	M I fibrobl	ex 7
29428	M I fibrobl	ex 7
29448	M I fibrobl	ex 8
29450	M I fibrobl	ex 8
29422	M I fibrobl	ex 9
29430	M I fibrobl	ex 9
29442	M I fibrobl	ex 15a
27648	M I psam	ex 2
25922	M I psam	ex 9
26868	M I psam	ex 11
26870	M I psam	ex 11
27632	M I psam	ex 12a
27640	M I psam	ex 12a
27644	M I psam	ex 12b
26502	M I psam	ex 15a
22988	M I angio	ex 13
20896	M I sec	ex 10
23128	M I sec	ex 15a
23336	M II clear	ex 3
24778	M II clear	ex 5
27928	M II chordoid	ex 4
27862	M III papillär	ex 11
27862	M III papillär	ex 14

Tab3 Legende :M I, II, III = Meningeom WHO-Grad I, II, III; trans = transitional, fibrobl=fibro- blastische, psam = psammomatös, clear = klar-zellig, sec = sekretorisch, angio = angiomatös; ex = Exon

4.2. Resultate der Sequenzierung

Eine Sequenzierung wurde bei reproduzierbar aberranten Banden durchgeführt. Nach wiederholter PCR und Gelelektrophorese ließen sich einige Bandenshifts nicht reproduzieren und erwiesen sich als „Schattenbanden“.

Zunächst wurde die DNA der aberranten Einzelstrangbanden ausgeschnitten, aufgereinigt und sequenziert. Wurde keine Mutation detektiert, wurde eine weitere Direktsequenzierung der Tumor-DNA angeschlossen.

Insgesamt enthielten 6 der sequenzierten Proben Wildtyp-DNA. Zwei Sequenzen konnten aufgrund schlechter Qualität nicht ausgewertet und wegen mangelnder DNA nicht wiederholt werden. 27 von 136 Meningeomen wiesen 28 Mutationen im *NF2* Gen auf.

Abb. 16: SSCP Gel und Chromatogramme 29448 und 29450

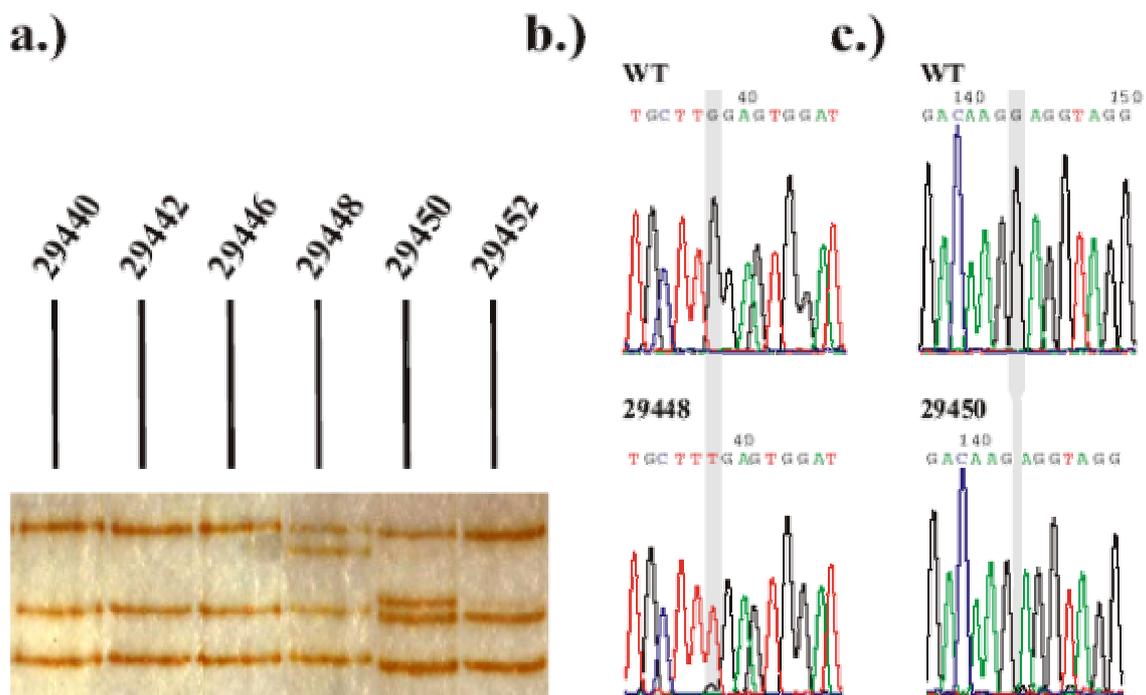


Abb. 16 Legende: a) Ausschnitt des SSCP Gels mit aberrant laufenden Banden
 b) Vergleich der Chromatogramme von Wildtyp DNA (WT) und Probe 29448
 c) Vergleich der Chromatogramme von Wildtyp DNA (WT) und Probe 29450

In der DNA von 9 angiomatösen Meningeomen wurde eine Mutation festgestellt (11%). In 14 Proben psammomatöser Meningeome waren 5 mutiert (33%). Zwei Mutationen wurden in der DNA der 9 klarzelligen Meningeomen gefunden (11%), eine unter den 3 chordoiden Meningeomen (33%). Im einzigen papillären Meningeom fanden sich zwei Mutationen in Exon 11 und Exon 14. Keine Mutationen ließen sich bei den 33 sekretorischen, den 7 mikrozystischen, den zwei lymphoplasmazytenreichen, dem metaplastischen und dem rhabdoiden Meningeom finden.

In der Kontrollgruppe wiesen 6 von 23 Proben von transitionalen Meningeomen mutierte DNA auf (26%). Unter den 25 fibroblastischen Meningeomen fanden sich 11

Mutationen (44%). In den 5 Proben voruntersuchter fibroblastischer, die blind mit untersucht wurden, fanden sich übereinstimmend zwei Mutationen.

Die Mutationen den *NF2* Gens setzten sich wie folgt zusammen: 6 Austausch eines einzelnen Nukleotids (27640, 27928, 29448, 27054, 27648), 9 Verluste mehrerer Nukleotide (27644, 26870, 23336, 27862, 27862, 29416, 29422, 29442, 25216), 6 Verluste von einzelnen Nukleotiden (22988, 27632, 29430, 29450, 25022, 22678), zwei Insertionen eines einzelnen Nukleotids (828, 25084), eine Insertion von zwei Nukleotiden (24778) und weitere vier Mutationen in potentiellen Splice Sites (siehe Tabelle 4)

Tabelle 4: *NF2* Mutationen in seltenen Meningeomvarianten und Kontrollgruppe

ID	Tumor	Exon	Base/Codon	Sequenz Alteration	Konsequenz
22988	M I angio	13	1767/448	Del g	Frameshift
27632	M I psam	12	1557/378	Del c	Frameshift
27644	M I psam	12	1757-1758/445	Del ag	Frameshift
27640	M I psam	12	1590/389	c → t	gln → stop
26870	M I psam	11	1426-1429/334-335	Del tgga	Frameshift
27648	M I psam	2	594/57	c → t	arg → stop
24778	M II clear	5	921-922/166	Ins cg	Frameshift
23336	M II clear	3	777-779/118	Del ttc	Del phe
27928	M II chor	4	872/149	g → t	lys → his
27862	M III pap	14	1899-1903/492-493	Del cctcc	Frameshift
27862	M III pap	11	1426-1429/334-335	Del tgga	Frameshift
22678	M I trans	4	854/143	Del t	Frameshift
26426	M I trans	5	Exon 5 - 1 bp	g → a	Splice Site Acceptor
25022	M I trans	6	994/190	Del c	Frameshift
25084	M I trans	1	497/24	Ins t	Frameshift
25216	M I trans	7	1074-1101/217-301	Del 27 bp	Del 9 As
29416	M I fib	1	466-467/14	Del tc	Frameshift
29418	M I fib	3	Exon 3 - 9 bp	a → g	Splice Site Acceptor
29422	M I fib	9	1238-1241/271-272	Del tact	Frameshift
29428	M I fib	7	Exon 7 + 1 bp	g → t	Splice Site Donor
29430	M I fib	9	1238/271	Del t	Frameshift
29442	M I fib	15	2004-2007/527-528	Del gaat	Frameshift
29446	M I fib	7	Exon 7 + 8 bp	Del g	Splice Site Donor
29448	M I fib	8	1128/235	g → t	gly → stop
29450	M I fib	8	1232/270	Del g	Frameshift
828	M I fib	4	856/144	Ins a	Frameshift
27054	M I fib	6	1001/192	c → g	tyr → stop

Legende Tab 4: M I: Meningeom WHO Grad I, M II: Meningeom WHO Grad II, M III: Meningeom WHO Grad III, angio: angiomatös, psam: psammomatös, clear: klarzellig, chor: chordoid, pap: papillär, trans: transitional, fib: fibromatös, Del: Deletion, Ins: Insertion

Im einzelnen fanden sich 6 *NF2* Mutationen bei den 66 Proben der seltenen Meningeome des WHO-Grades I (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Mutationen WHO-Grad I Meningeome

Meningeomvariante	Anzahl Tumore	Anzahl Mutationen
M I angiomatös	9	1
M I psammomatös	14	5
M I microzystisch	7	0
M I sekretorisch	33	0
M I metaplastisch	1	0
M I lymphoz.reich	2	0

Unter den 13 Proben der WHO-Grad II Meningeome waren 3 Mutationen des *NF2* Gens festzustellen (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Mutationen WHO-Grad II Meningeome

Meningeomvariante	Anzahl Tumore	Anzahl Mutationen
M II klarzellig	9	2
M II chordoid	3	1

Unter den wenigen Proben der Meningeome des WHO-Grades III ließen sich 2 Mutationen finden (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Mutationen WHO-Grad III Meningeome

Meningeomvariante	Anzahl Tumore	Anzahl Mutationen
M III rhabdoid	1	0
M III papillär	1	2

Es wurden vier Mutationen in potentiellen Splice-site Regionen gefunden (29428: Exon 7 + 1 bp, g→t; 29446: Exon 7 + 8 bp, del g; 29418: Exon 3 - 9 bp, a→g; 26426: Exon 5 – 1bp, g→a). Die Auswertung mit den Programmen GenScan, NetGene2 und GeneSplicer ergab Konsequenzen für das Protein in Form von fehlenden oder zusätzlichen Acceptor Splice-sites (29428, 29518, 26426), zusätzlichen Donor Splice-sites (29446) oder verlängerten Exonen (29518).

4.3. Resultate LOH-Analyse

Soweit Blut von den Patienten verfügbar war, wurde eine LOH-Analyse von Chromosom 22q durchgeführt. Die Kontrollgruppe der fibroblastischen Meningeome wurde hier nicht mit untersucht.

Auf diese Weise wurden 49 Tumor-/Lymphozyten-DNA-Paare untersucht. Von den 49 Proben war ein Fall nicht informativ (25278). In 24 Fällen war ein Allelverlust im Bereich des *NF2* Gens auf 22q12 feststellbar (50%).

Im einzelnen wiesen 11 von 21 transitionalen Meningeomen (52,3%), 3 von 6 angiomatösen Meningeomen (50%), keines von 1 mikrozystischen Meningeom, 2 von 3 psammomatösen Meningeomen (66,6%), 5 von 13 sekretorischen Meningeomen (38,5%) und 2 von 4 untersuchten klarzelligigen Meningeomen (50%) einen Allelverlust auf. In 24 Fällen wurden beide Allele detektiert (50%). In keinem dieser Tumore wurde eine *NF2* Mutation festgestellt. 17 Fälle mit LOH wiesen keine *NF2* Mutation auf (71%). Jedoch wiesen alle Tumore, bei denen zuvor eine *NF2* Mutation festgestellt wurde und Lymphozyten-DNA verfügbar war, ein LOH 22q auf (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Ergebnisse LOH-Analyse und *NF2* Mutationen

ID	Tumor	22q	<i>NF2</i>
22856	M I angio	12	
23582	M I angio	12	
24814	M I angio	12	
22988	M I angio	LOH	mut
23402	M I angio	LOH	
25976	M I angio	LOH	
23814	M I microzys	12	
23768	M I psam	12	
25922	M I psam	LOH	
26886	M I psam	LOH	
22582	M I sec	12	
22654	M I sec	12	
25148	M I sec	12	
26634	M I sec	12	
26888	M I sec	12	
26892	M I sec	12	
26894	M I sec	12	
26898	M I sec	12	
26900	M I sec	12	
23128	M I sec	LOH	
23398	M I sec	LOH	
23556	M I sec	LOH	
26442	M I sec	LOH	
26902	M I sec	LOH	
23334	M I trans	12	
23374	M I trans	12	
23378	M I trans	12	
23598	M I trans	12	
23846	M I trans	12	
24566	M I trans	12	
25598	M I trans	12	
25492	M I trans	12	
22678	M I trans	LOH	mut
22852	M I trans	LOH	
23286	M I trans	LOH	
25022	M I trans	LOH	mut
25180	M I trans	LOH	
25216	M I trans	LOH	
25242	M I trans	LOH	
25292	M I trans	LOH	
25840	M I trans	LOH	
26426	M I trans	LOH	mut
25278	M I trans	ni	
25084	M I trans	pLOH	mut
26512	M I trans	12	
24388	M II clear	12	
23336	M II clear	LOH	mut
23474	M II clear	LOH	
24778	M II clear	LOH	mut

Tab 8 Legende: angio=angiomatös, microzys=mikrozystisch, psam=psammomatös, sec=sekretorisch, trans= transitional, clear=klarzellig, LOH=loss of heterozygosity, pLOH=partiellerLOH, 12=beide Allele vorhanden, ni=nicht informativ, mut=Mutation