

Entwicklung, Etablierung und Validierung  
eines Tests basierend auf  
Next Generation Sequencing zur  
genetischen Diagnostik beim Verdacht auf  
erbliche Phäochromozytome und  
Paragangliome

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
Fachbereich Biologie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
**Annika Denise Stubbe**  
aus Hamburg

Hamburg, Dezember 2016



1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Höppner
  2. Gutachterin: Jun. Prof. Dr. Esther Diekhof
- Disputation 02.06.2017



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Februar 2013 bis Dezember 2016 in der Bioglobe GmbH, einem Labor für molekulargenetische Dienstleistungen in Hamburg, unter der Geschäftsleitung von Prof. Dr. Höppner durchgeführt.



**Inhaltsverzeichnis**

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>1</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>5</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>7</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>8</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>9</b>
<b>2. Aktueller Stand der Forschung zur Diagnostik von Nebennierentumoren</b> .....	<b>10</b>
2.1. Phäochromozytome und Paragangliome.....	10
2.2. Diagnose eines Phäochromozytoms und Paraganglioms.....	11
2.3. Therapie bei Phäochromozytomen und Paragangliomen.....	12
2.4. Genetik der hereditären Phäochromozytome und Paragangliome.....	12
2.5. Diagnostisch relevante Gene von hereditären Phäochromozytomen und Paragangliomen.....	13
2.5.1. <i>NFI</i> .....	13
2.5.2. <i>VHL</i> .....	14
2.5.3. <i>SDH<sub>x</sub></i> ( <i>SDHA</i> , <i>SDHB</i> , <i>SDHC</i> , <i>SDHD</i> und <i>SDHAF2</i> ).....	15
2.5.4. <i>RET</i> .....	16
2.5.5. <i>TMEM127</i> .....	17
2.5.6. <i>MAX</i> .....	17
2.5.7. <i>KIF1B</i> .....	18
2.6. Molekulargenetische Diagnostik der Phäochromozytome/ Paragangliome.....	20
2.7. Etablierte molekulargenetische Methoden.....	21
2.7.1. Chromosomenanalyse.....	21
2.7.2. Fluoreszenz in situ Hybridisierung.....	21
2.7.3. Microarray.....	22
2.7.4. MALDI-TOF MS.....	22
2.7.5. Real Time PCR.....	22
2.7.6. DNA-Sequenzierung.....	23
2.7.7. Multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation.....	23
2.8. Neue molekulargenetische Methoden.....	23
2.8.1. Next Generation Sequencing.....	23
2.9. Aufgabenstellung.....	25
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>26</b>
3.1. Materialien.....	26
3.1.1. Patientenproben und Kontrollprobe.....	26
3.1.2. Geräte.....	26

3.1.3. Chemikalien.....	28
3.1.4. Verwendete Primer .....	30
3.1.5. Untersuchte Gene.....	31
3.1.6. Verwendete Kits .....	32
3.1.7. Verwendete Computerprogramme + Webseiten.....	33
3.2. Methoden .....	34
3.2.1. DNA-Isolation aus EDTA-Blutproben.....	34
3.2.1.1. DNA-Konzentrationsmessung.....	36
3.2.2. Sanger-Sequenzierung .....	36
3.2.2.1. Primer Design.....	37
3.2.2.2. Polymerase-Kettenreaktion .....	38
3.2.2.3. Analyse von PCR-Produkten mittels Agarose-Gelelektrophorese .....	39
3.2.2.4. Aufreinigung der PCR-Produkte .....	41
3.2.2.5. Sequenzierung .....	42
3.2.2.6. Aufreinigung der Sequenzreaktions-Produkte.....	43
3.2.2.7. Kapillarelektrophorese am 3500xL Genetic Analyzer .....	44
3.2.2.8. Datenanalyse.....	45
3.2.3. MLPA .....	46
3.2.3.1. DNA Denaturierung .....	47
3.2.3.2. Hybridisierung der Sondenmix spezifischen Sonden.....	47
3.2.3.3. Ligation der Sonden .....	47
3.2.3.4. Amplifikation .....	48
3.2.3.5. Analyse der MLPA-Reaktionsprodukte mittels Kapillarelektrophorese und Datenauswertung .....	48
3.2.4. Next Generation Sequencing .....	50
3.2.4.1. Primer-Pool Phäochromozytom .....	53
3.2.4.2. AmpliSeq-PCR.....	54
3.2.4.2.1. Verdauung der Primer-Anteile .....	54
3.2.4.2.2. Adapter- und Barcode-Ligation.....	55
3.2.4.2.3. Aufreinigung der Libraries .....	56
3.2.4.3. Quantifizierung der Libraries mittels qPCR.....	57
3.2.4.4. Template Preparation mittels Emulsions-PCR mit dem OneTouch 2.....	58
3.2.4.4.1. Kontrollschritt: Kontrolle der unangereicherten ISPs mit dem Qubit .....	59
3.2.4.5. Anreicherung der ISPs mit dem Ion OneTouch Enrichment System (ES).....	60
3.2.4.6. Geräte- und Probenvorbereitung für die Sequenzierung mit der Personal Genome Machine (PGM).....	61
3.2.4.7. Analyse der NGS-Daten .....	63



3.2.4.7.1. Auswertung der Daten mit SeqPilot .....	63
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>64</b>
4.1. Optimierungsprozesse und Rohdatenanalyse .....	64
4.1.1. Sanger-Sequenzierung .....	64
4.1.1.1. Optimierungsprozess beim Primer Design .....	64
4.1.1.2. Datenanalyse der Sanger-Sequenzierung .....	67
4.1.2. Multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation (MLPA) .....	68
4.1.2.1. Datenanalyse der MLPA-Ergebnisse.....	68
4.1.3. Next Generation Sequencing .....	71
4.1.3.1. Optimierungsprozess beim Primer Design: Primer-Panel „Phäochromozytom“ .....	71
4.1.3.1.1. <i>In silico</i> analysierbarer Bereich mit dem Primer-Panel „Phäochromozytom“ .....	72
4.1.3.2. Optimierungsprozesse für den experimentellen Ablauf .....	73
4.1.3.2.1. Berechnung der Kopienzahl/ $\mu$ L über die quantitativen Echtzeit-PCR Messwerte	73
4.1.3.2.2. Volumen Berechnung für die Emulsions-PCR und ISP Quantifizierung.....	75
4.1.3.3. Rohdatenauswertung und Sequenziererergebnisse .....	78
4.1.3.3.1. Bewertung der Rohdaten .....	78
4.1.3.3.2. Analyse der NGS-Daten zur Identifizierung von Sequenzvarianten .....	81
4.2. Nachgewiesene Sequenzveränderungen im Methodenvergleich NGS/ Sanger-Sequenzierung	83
4.2.1. Erzielte Qualität der Sequenziererergebnisse mit dem Next Generation Sequencing .....	93
4.3. Gegenüberstellung der mit Sanger-Sequenzierung bzw. NGS identifizierten Sequenzvarianten im Exonbereich und exonnahen Intronbereich.....	95
4.4. Datenanalyse der Kopienzahl-Veränderungen (CNV) beim Next Generation Sequencing.....	98
4.4.1. Vergleich der Kopienzahl-Veränderungen der MLPA mit der CNV-Analyse des NGS ...	98
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>101</b>
5.1. Design und Optimierung des NGS-Protokolls „Phäochromozytom“ .....	101
5.2. Datenauswertung.....	106
5.3. Datenauswertung mit SeqPilot.....	109
5.4. Validierung des Next Generation Sequencing .....	112
5.4.1. Validierung des Next Generation Sequencing in den kodierenden Gen-Bereichen sowie jeweils 10 bp der flankierenden Intronsequenz als molekulargenetischer Test.....	115
5.5. Bewertung der nachgewiesenen Nonsense-, Missense- und Silent-Varianten.....	116
5.6. MLPA und CNV-Analyse.....	122
5.7. Wirtschaftliche Betrachtungen: Zeit- und Kostenanalyse Sanger-Sequenzierung vs. NGS ....	124
5.8. Ausblick .....	133
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>135</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>145</b>
7.1. Verwendete Primer für die Sanger-Sequenzierung.....	145

7.2. Verwendete Primer für das Next Generation Sequencing .....	153
7.3. Kopienzahlen- und Volumina-Berechnung mittels qPCR .....	163
7.4. Messergebnisse der unangereicherten ISPs nach den Emulsions-Polymerase Kettenreaktionen .....	166
7.5. Nachgewiesene Varianten in den Intronbereichen.....	167
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>168</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>170</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>172</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>173</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Adenin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
div.	diverse
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP(s)	Desoxyribonukleosidtriphosphate/ Nukleotide
Dr.	Doktor
€	Euro
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	lat. und andere
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
HCL	Salzsäure
ID	Identifikator
kb	Kilo-Basenpaare
L	Liter
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
mL	Milliliter
MLPA	Multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar

µm	Mikrometer
mm	Millimeter
mM	Einheit der Stoffmengenkonzentration, entspricht mmol/L
µmol	Mikromol
mRNA	englisch: messenger RNA/ deutsch: Boten-RNA
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NGS	Next Generation Sequencing
nM	Nanomolar
NM_Nummer	mRNA, protein-kodierendes Transkript
o. g.	oben genannt
p.A.	pro analysi
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff-Ionenkonzentration
pM	Pikomolar
pmol	Pikomol
ppm	parts per million
Prof.	Professor
Rcf	relative Zentrifugalkraft
RNA	Ribonukleinsäure
s.	siehe
sec	Sekunde(n)
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	wässrige Lösung von Tris und EDTA
TKV	Transkriptionsvariante(n)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit verfolgte das Ziel der Entwicklung, Validierung und Etablierung eines genetischen Tests basierend auf dem Next Generation Sequencing (NGS) zur schnelleren genetischen Diagnostik beim Krankheitsbild eines Phäochromozytoms oder Paraganglioms.

Es wurden elf diagnostisch relevante Gene mit den drei Methoden NGS, Sanger-Sequenzierung und multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation (MLPA) untersucht. Zur Validierung wurden die mit den 3 Methoden erhaltenen Ergebnisse miteinander verglichen. Für das NGS-Sequenzieren wurde die Plattform Ion Torrent von Thermofisher Scientific verwendet. Es wurde ein Primer-Panel designed, mit dem die Gene *KIF1B*, *MAX*, *NF1*, *RET* (Exons 8, 10, 11, 13, 14, 15 und 16), *SDHAF2*, *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *TMEM127* und *VHL* in einem Analysegang untersucht werden können. Es wurden 28 Proben von Patienten mit einem Phäochromozytom oder Paragangliom untersucht.

Die Auswertung der sehr großen NGS-Datenmengen wurde mit dem Modul „SeqNext“ des Programms „SeqPilot“ durchgeführt. Zusätzlich zur Analyse der Rohdaten wurde auch eine Qualitätsbewertung der Daten vorgenommen.

Der Vergleich zeigte, dass insgesamt 96 Varianten mit dem NGS und der Sanger-Sequenzierung im vergleichbaren Analysebereich nachgewiesen werden konnten. Zwei Varianten im Intronbereich wurden nur mit dem NGS gefunden und konnten noch nicht abschließend hinsichtlich ihrer Identität geklärt werden. Mit der MLPA und der CNV-Analyse des NGS wurde eine Deletion der Exons 2-8 im *SDHB*-Gen in einer Patientenprobe nachgewiesen.

Insgesamt wurden 2 Nonsense-, 18 Missense-, 31 Silent- und 92 Intron-Varianten mit der Sanger-Sequenzierung und dem NGS nachgewiesen. Die Varianten wurden mit verschiedenen *in silico* Tools bezüglich ihrer funktionellen Auswirkung und Pathogenität betrachtet. Für die Silent-Varianten wurde als weiteres Kriterium die *Minor Allele Frequency* herangezogen, um die Beurteilung der klinischen Relevanz anhand der Häufigkeit der Variante in der Durchschnittsbevölkerung vornehmen zu können. Die Intron-Varianten außerhalb der bekannten Spleiß-Regionen wurden nicht näher betrachtet.

Das NGS-Primer-Panel bot keine 100%ige Analysierbarkeit der elf Gene. Insgesamt mussten 11 von 160 Exons mit der Sanger-Sequenzierung sequenziert werden. Die Datenanalyse zeigte zudem, dass die CNV-Analyse basierend auf den NGS-Daten momentan nicht die Qualität besitzt, die MLPA zu ersetzen.

Der in dieser Arbeit entwickelte und validierte Test kann in der Routinediagnostik eingesetzt werden und bietet mit entsprechender Proben-Auslastung sowohl eine Kosten- als auch eine Zeitersparnis.

**Abstract**

The aim of this thesis was the development, validation and establishment of a genetic test based on the next generation sequencing (NGS) for faster genetic analysis in the case of a disease of a pheochromocytoma or paraganglioma.

A total of eleven diagnostically relevant genes were analyzed using the three methods NGS, Sanger sequencing and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). The results obtained with these three methods were compared to validate the new test. For the sequencing with the NGS, the Ion Torrent platform of Thermofisher Scientific was applied. A primer panel was designed for the parallel sequencing of the genes *KIF1B*, *MAX*, *NF1*, *RET* (exons 8, 10, 11, 13, 14, 15 and 16), *SDHAF2*, *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *TMEM127* and *VHL* in one analysis. DNA samples of 28 patients with a pheochromocytoma or paraganglioma were examined.

The evaluation of the very large NGS data was performed with the module "SeqNext" of the program "SeqPilot". In addition to raw data analysis, a quality evaluation of the data was performed.

The comparison showed that a total of 96 variants could be detected with the NGS and the Sanger sequencing in the comparable analysis range. Two variants in the intron area were only found with the NGS and could not be finally clarified with regard to their identity. With the MLPA and the CNV analysis of the NGS, a deletion of exons 2-8 in the *SDHB* gene was detected in one patient sample.

A total of 2 nonsense, 18 missense, 31 same-sense and 92 intron variants were identified with the Sanger sequencing and the NGS. The variants were viewed with different *in silico* tools regarding their functional effect and pathogenicity. For the same-sense variants the Minor Allele Frequency was used as a further criterion in order to be able to assess the clinical relevance by the frequency of the variant in the average population. The intron variants outside the known splice regions were not considered in more detail.

The NGS primer panel did not provide the possibility of 100% analysis of the eleven genes. 11 out of 160 exons had to be sequenced with Sanger sequencing. The data analysis also showed that the CNV analysis based on NGS data currently does not have the quality to replace the MLPA.

The test developed and validated in this thesis can be used in routine diagnostics. If the system's capacity is fully utilized, it enables cost and time savings.

## 1. Einleitung

Im Zuge des technischen Fortschritts halten in zunehmendem Maße molekulargenetische Hochdurchsatz-Methoden Einzug in die medizinische Diagnostik von erblich bedingten Krankheiten. Durch diese Entwicklung und die Entschlüsselung des kompletten menschlichen Genoms, ist die Anzahl der Gene mit krankheitsrelevanten Mutationen für immer mehr Krankheiten aufgeklärt worden. Damit steigen auch die Anforderungen an molekulargenetische Laboratorien, indem sie Assays für immer mehr Gene etabliert haben müssen, um den Anfragen der molekularen klinischen Humangenetik gerecht zu werden. Erschwerend kommt hinzu, dass für einige Erkrankungen krankheitsauslösende Varianten in mehreren diagnostisch relevanten Genen infrage kommen, wodurch in der Vergangenheit eine schnelle Diagnostik kaum möglich war. Mit der jetzt zur Verfügung stehenden NGS-Technik wäre ein paralleles Sequenzieren von vielen Genen möglich, sodass das sequenzielle Abarbeiten von mehreren Genen nicht mehr notwendig wäre.

Beispielhaft dafür ist das Krankheitsbild der Phäochromozytome und Paragangliome. Für dieses Krankheitsbild sind eine Vielzahl von diagnostisch relevanten Genen bekannt. Eine exakte Phänotyp-Genotyp Korrelation ist aber nur bei dem familiären Syndrom Neurofibromatose Typ 1 gegeben. Bei anderen Patienten mit einem Phäochromozytom oder Paragangliom und ohne bekannte Familienanamnese ist eine differentielle diagnostische Eingrenzung auf ein bestimmtes Gen nicht möglich [2].

Um die molekulargenetische Diagnostik dieser und anderer komplexer Krankheitsbilder effizienter und wirtschaftlicher zu gestalten, stellen neue Next Generation Sequencing (NGS)-Assays, mit denen viele Gene parallel untersucht werden können, einen großen Vorteil hinsichtlich der Bearbeitungszeit und Kosteneinsparung dar und sind als solche auch im Sinne des Patienten.

## **2. Aktueller Stand der Forschung zur Diagnostik von Nebennierentumoren**

### **2.1. Phäochromozytome und Paragangliome**

Phäochromozytome (PCC) und Paragangliome (PGL) sind seltene, spontan auftretende, meist benigne Tumore des Nebennierenmarks und der Paraganglien [1, 2]. Etwa 30% der Tumore sind hereditär [1].

Die jährliche Inzidenz von PCCs und PGLs wird in der Literatur mit ca. 2-10/ 1.000.000 angegeben. Ein Großteil der Phäochromozytome entsteht in einem Alter von 30-50 Jahren und betrifft Männer und Frauen nahezu gleichermaßen. Bei hereditären PCCs ist das Erkrankungsalter oft früher als bei spontanen PCCs [1, 2, 3].

Etwa 5% der Phäochromozytome und 3% der Paragangliome sind maligne, was bedeutet, dass sich zusätzlich zum PCC oder PGL Metastasen bilden können [2, 4]. Diese Metastasen befallen meist das Knochen-, Leber- und Lungengewebe [1, 2, 3].

Ca. 90% aller PCCs sind in den chromaffinen Zellen der Nebenniere lokalisiert und die restlichen 10% entlang der großen Blutleiter in der Nähe der Nebennieren oder im Brustkorb. PGLs hingegen sind extra-adrenale Tumore, die entlang des gesamten paraganglionären Systems von der Schädelbasis bis zum Becken entstehen. Man unterscheidet sympathische PGL-Tumore, die sich in den chromaffinen Zellen des Sympathikus bilden und parasymphatische PGL-Tumore, die in den nicht-chromaffinen Zellen des Parasympathikus entstehen [2, 5].

Die Paraganglien werden während der Embryonalentwicklung in den Neuralleisten des Embryos gebildet und sind, wie die Nebennieren, Teil des vegetativen Nervensystems. Die Nebennieren bestehen aus dem inneren Nebennierenmark und der äußeren Nebennierenrinde [2, 6, 7].

Ebenso wie die Nebennieren und die Paraganglien produzieren die PCCs und die sympathischen PGLs (allerdings in großem Ausmaß) Katecholamine wie Adrenalin und Noradrenalin. Beide Hormone gelten als Notfallhormone und werden insbesondere in Stresssituationen vom Nebennierenmark gebildet und von dort in die Blutbahn abgegeben. Von den parasymphatischen PGLs, die im Bereich der Schädelbasis, des Halses und des vorderen Brusttraumes lokalisiert sind, produzieren dagegen ca. 95% der PGLs keine Katecholamine [2, 5, 8].



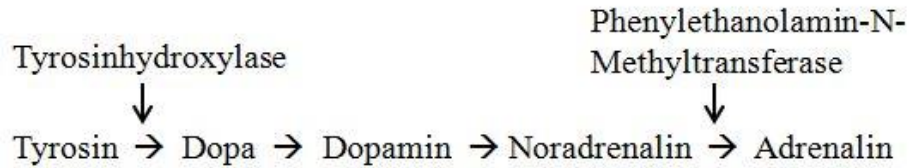


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Biosynthese der Katecholamine [2]

Aufgrund der erhöhten Produktion von Katecholaminen entsteht das typische, meist jedoch schwer zu differenzierende Krankheitsbild des Phäochromozytoms oder Paraganglioms. Patienten mit einem sezernierenden PCC oder PGL leiden unter anderem an folgenden Symptomen: Kopfschmerzen, chronischem Bluthochdruck, Herzklopfen, Blässe, vergrößerten Pupillen, Schwäche, Gewichtsverlust, Übelkeit, Erbrechen, Bauchschmerzen, Angstzuständen, starkem Harndrang, Durchfall, Unruhe, Schweißattacken oder Schmerzen in Brust, Lenden und Abdomen. In seltenen Fällen kann auch eine Erhöhung des Blutzuckers vorliegen [2, 9]. Patienten mit einem PGL, insbesondere einem nicht sezernierenden PGL, weisen Symptome wie Schwindel, Heiserkeit, Schluckbeschwerden, Hörverlust, pulsierendem Tinnitus und Kopfschmerzen auf [4]. Nicht diagnostizierte PCCs oder PGLs können zum Tod durch einen Herzinfarkt oder einen Schlaganfall führen [11].

Durch dieses breite Spektrum verschiedener, meist unspezifischer Symptome, fällt die Diagnose eines PCCs oder PGLs oft nicht leicht.

## 2.2. Diagnose eines Phäochromozytoms und Paraganglioms

Das Elektrokardiogramm eines PCC- oder PGL-Patienten zeigt meist keine Auffälligkeiten. Allerdings lassen sich Phäochromozytome und Paragangliome durch Computertomographie, Magnetresonanztomographie oder Ultraschalluntersuchungen des Bauches oder Halses nachweisen. Die sicherste Nachweismethode des PCCs oder PGLs (u.a. auch eines stummen PCCs, ca. 21% der PCCs) stellt die biochemische Untersuchung der Katecholamine und ihrer Abbauprodukte im Blutplasma oder im 24 h Sammel-Urin des Patienten dar [2, 3]. Die Interpretation der Messwerte ist abhängig von der angewendeten Methode und den Referenzwerten des jeweiligen klinischen Labors.

Erhöhte Messwerte im Vergleich zu den Referenzwerten sind einerseits ein Hinweis auf ein PCC oder PGL, können andererseits jedoch auch durch Stress, bestimmte Nahrungsmittel oder Medikamente ausgelöst werden [2].

### **2.3. Therapie bei Phäochromozytomen und Paragangliomen**

In den meisten Fällen werden die Phäochromozytome oder Paragangliome operativ entfernt. Patienten mit einem nachgewiesenen hereditären PCC oder PGL müssen lebenslange Nachsorgeuntersuchungen durchlaufen. Ist eine chirurgische Entfernung nicht möglich, kann eine Chemotherapie in Kombination mit einer nuklearmedizinischen Strahlentherapie durch radioaktives Jod-131 angewandt werden [2].

Maligne PCCs sind oft resistent gegen eine Chemo- oder Strahlentherapie, sodass Patienten mit ausgebildeten Metastasen eine schlechte Prognose haben. Die Gesamtüberlebensrate bezogen auf die ersten 5 Jahre liegt bei ca. 50% der Patienten [3].

### **2.4. Genetik der hereditären Phäochromozytome und Paragangliome**

In etwa 30% der PCC- und PGL-Fälle lassen sich Keimbahnmutationen nachweisen. Neben den isoliert auftretenden Phäochromozytomen und Paragangliomen kommen ca. 10% in Form eines familiären Syndroms wie dem von Hippel-Lindau-Syndrom (*VHL*), der multiplen endokrinen Neoplasie (MEN2), der Neurofibromatose Typ 1 (*NF1*) oder dem Paragangliomsyndrom Typ 1-4 (PGL 1-4) vor [1, 12]. Der Erbgang ist bei allen hereditären PCCs und PGLs autosomal dominant, sodass bereits ein verändertes Allel zur Erkrankung führt. Liegt bei einem Patienten eine heterozygote Mutation vor, besteht für seine Nachkommen eine 50%ige Wahrscheinlichkeit, diese Mutation zu erben. Neben dem autosomal-dominanten Erbgang liegt bei einigen Genen *SDHD* (PGL 1), *SDHAF2* (alternativer Name: *SDH5*) (PGL2) und *MAX* ein Parent-of-origin Effekt vor. Das bedeutet, dass es nur dann zur Ausbildung eines Tumors kommt, wenn die Keimbahnmutation z.B. von Seiten des Vaters vererbt wurde, unabhängig davon, ob beim Vater ein Tumor auftritt oder nicht [5, 12].

Aus der älteren Literatur sind Keimbahnmutationen in acht Genen bekannt, die zur Ausbildung eines Phäochromozytoms oder Paraganglioms führen. Hierbei handelt es sich um die Gene *NF1*, *VHL*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHAF2*, *RET* (MEN2), und *TMEM127* [2, 5, 11, 12, 13, 14]. In der neueren Literatur sind zusätzlich Mutationen in den Genen *MAX*, *SDHA* und *KIF1B* beschrieben [14, 15, 16].

Die meisten der o.g. Gene weisen eine Beteiligung an der Tumorgenese auf und haben Einfluss auf die Regulation der Zelldifferenzierung und Zellteilung, des Zellwachstums und der Apoptose [1, 2, 12, 14, 17, 18].

In den letzten Jahren wurden weitere diagnostisch relevante Gene für Phäochromozytome und Paragangliome beschrieben: *EGLN1/ PHD2*, *EPAS1/ HIF2A*, *MEN1*, *IDH1*, *FH*, *EGLN2*, *MDH2* und *GDNF*. Diese Gene sind in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt. Neben Keimbahnmutationen wurden auch somatische, also erworbene Mutationen nachgewiesen. Eine Allelvariation im *GDNF*-Gen ist in der Literatur in Assoziation mit einer erblichen Anfälligkeit für ein Phäochromozytom beschrieben worden [1, 5, 14, 15, 19, 20]. Für einige dieser Gene wurden in den letzten 2-3 Jahren einzelne PCC und PGL auslösende Mutationen beschrieben [15]. Diese Gene sind gegenwärtig noch nicht für die medizinische Diagnostik validiert. Weitere klinische Studien sind hierfür notwendig [5, 14].

## **2.5. Diagnostisch relevante Gene von hereditären Phäochromozytomen und Paragangliomen**

### **2.5.1. *NFI***

Das *NFI*-Gen (Neurofibromin 1) ist auf Chromosom 17q11.2 lokalisiert. *NFI* ist ein Tumorsuppressorgen, welches unkontrolliertes Zellwachstum und die unkontrollierte Zellteilung unterdrückt. Das Gen kodiert für das zytoplasmatische Protein Neurofibromin, welches vor allem in den Nervenzellen und in den Leukozyten exprimiert wird [14, 18].

Neurofibromin ist ein Multidomänen-Molekül, das verschiedene zelluläre Signaltransduktionswege wie z.B. den RAS-Signaltransduktionsweg reguliert [1, 14, 17].

Keimbahnmutationen im *NFI*-Gen lösen das Krankheitsbild Neurofibromatose Typ 1 (Morbus von Recklinghausen) aus, welches mit dem Auftreten von PCCs (meist in den Nebennieren lokalisiert) oder PGLs einhergehen kann. Die Patienten zeigen häufig Symptome, wie Café-au-lait Flecken auf der Haut, die fleckenförmigen, bräunlichen Lisch Knoten in der Iris sowie sommersprossenartige Flecken und Neurofibrome auf der Haut. Das Durchschnittsalter der klinischen Manifestation mit Ausbildung eines PCCs oder PGLs bei *NFI*-Patienten liegt bei ca. 42 Jahren, ein maligner Krankheitsverlauf kann bei etwa 12% aller Patienten beobachtet werden. Bei ca. 16% der Patienten besteht eine positive Familienanamnese. Für Neurofibromatose Typ 1 ist allerdings auch eine hohe Rate an Neumutationen bekannt [1, 2, 12].

Eine Übersicht zur Verteilung der bisher beschriebenen Mutationen im *NFI*-Gen mit klinischer Bedeutung ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Phäochromozytom und Paragangliom assoziierte Keimbahnmutationen des *NFI*-Gens [15] (HGMD Datenbank, Stand 01.10.2016)

bekannte Mutationen	Anzahl
<b>Gesamtzahl</b>	<b>2388</b>
○ missense/ nonsense	691
○ Spleißmutationen	406
○ kleine Deletionen	571
○ kleine Insertionen	281
○ kleine Indels	46
○ große Deletionen	331
○ große Insertionen	47
○ komplexe Rekombinationen	15

### 2.5.2. *VHL*

Das hochkonservierte *VHL*-Gen (von Hippel-Lindau Tumorsuppressorgen, E3 ubiquitin Protein Ligase) ist auf Chromosom 3p25.3 lokalisiert. Das Protein ist Teil eines Proteinkomplexes, welcher überschüssige oder fehlerhafte Proteine in der Zelle für den gezielten Abbau markiert, damit die normalen Funktionen in der Zelle aufrechterhalten werden können [1, 14, 17, 18].

Keimbahnmutationen im *VHL*-Gen können das familiäre von Hippel-Lindau-Syndrom auslösen. Beim von Hippel-Lindau-Syndrom werden zwei verschiedene Typen unterschieden: Typ 1 meist keine PCCs und Typ 2 meist mit PCCs [2, 12, 17]. Bei etwa 10-20% der Patienten kommt es zur Ausbildung von PCCs oder PGLs. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei ca. 30 Jahren. In seltenen Fällen ist ein maligner Krankheitsverlauf bekannt [1, 5].

Eine Übersicht zur Verteilung der bisher beschriebenen Mutationen im *VHL*-Gen mit klinischer Bedeutung ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Phäochromozytom und Paragangliom assoziierte Keimbahnmutationen des *VHL*-Gens [15] (HGMD Datenbank, Stand 01.10.2016)

bekannte Mutationen	Anzahl
<b>Gesamtzahl</b>	<b>527</b>
○ missense/ nonsense	229
○ Spleißmutationen	25
○ kleine Deletionen	85
○ kleine Insertionen	53
○ kleine Indels	13
○ große Deletionen	119
○ große Insertionen	2
○ regulatorische Mutation	1

### 2.5.3. *SDHx* (*SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD* und *SDHAF2*)

Die einzelnen *SDHx*-Gene codieren für die verschiedenen Untereinheiten der Succinat-Dehydrogenase (*SDH*). Das Enzym setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen, die durch die Gene *SDHA*, *SDHB*, *SDHC* und *SDHD* kodiert werden:

- ❖ *SDHA* (SDH-Komplex-Untereinheit A, Flavoprotein); aktive Untereinheit; lokalisiert auf Chromosom 5p15 [1, 14, 18]
- ❖ *SDHB* (SDH-Komplex-Untereinheit B, Eisen Schwefel); lokalisiert auf Chromosom 1p36.1-p35.1 [17, 18]
- ❖ *SDHC* (SDH-Komplex-Untereinheit C); lokalisiert auf Chromosom 1q23.3 [18]
- ❖ *SDHD* (SDH-Komplex-Untereinheit D, integrales Membranprotein); lokalisiert auf Chromosom 11q23 [18]

Bei allen vier Genen handelt es sich um Tumorsuppressorgene [18].

Der SDH-Enzymkomplex ist in der inneren Mitochondrienmembran verankert und Teil der mitochondrialen Atmungskette. Er nimmt eine wichtige Funktion bei der ATP-Synthese innerhalb der Mitochondrien ein [14, 17, 18].

Das *SDHAF2*-Gen (SDH-Komplex Assembling Faktor 2) ist auf Chromosom 11q12.2 lokalisiert und kodiert für ein Protein, welches mit dem SDH-Enzymkomplex interagiert. Das Protein unterstützt einen Cofaktor für die Enzymaktivität an den SDH-Enzymkomplex zu binden [17, 18].

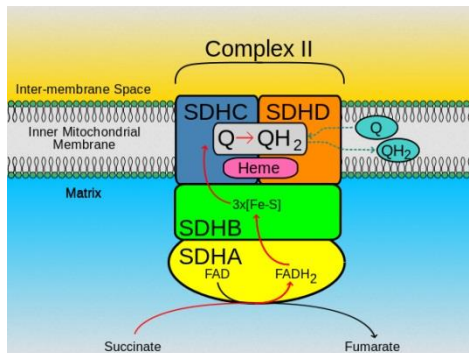


Abbildung 2: Aufbau des *SDH*-Enzymkomplexes bestehend aus den vier Untereinheiten *SDHA*, *SDHB*, *SDHC* und *SDHD*

Bildquelle:

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/5a/SuccDeh.svg/300px-SuccDeh.svg.png>; Zugriff am 18.11.2016

Keimbahnmutationen in einem dieser *SDHx*-Gene können das Paragangliom-Syndrom auslösen, das klinisch in verschiedene Typen aufgeteilt wird:

- ❖ Paragangliom Syndrom Typ 1 (PGL 1) → Gen: *SDHD* → PCC und PGL
- ❖ Paragangliom Syndrom Typ 2 (PGL 2) → Gen: *SDHAF2* → PGL
- ❖ Paragangliom Syndrom Typ 3 (PGL 3) → Gen: *SDHC* → PCC\* und PGL
- ❖ Paragangliom Syndrom Typ 4 (PGL 4) → Gen: *SDHB* → PCC und PGL
- ❖ Paragangliom Syndrom unbenannt → Gen: *SDHA* → PCC und PGL

\*PCCs im Paragangliom Syndrom Typ 3 treten eher selten auf

Da gegenwärtig nur wenige Keimbahnmutationen bekannt sind, wurde für das *SDHA*-Gen bisher noch kein spezifisches Paragangliom Syndrom beschrieben.

Die Diagnose eines Paragangliom Syndroms Typ 1-4 liegt im Durchschnitt zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr. Maligne Krankheitsverläufe sind eher selten. Eine Ausnahme ist das Paragangliom Syndrom Typ 4, welches bei etwa einem Drittel der Patienten maligne verläuft [1, 2, 15].

Eine Übersicht zur Verteilung der bisher beschriebenen Mutationen in den *SDHx*-Genen mit klinischer Bedeutung ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Phäochromozytom und Paragangliom assoziierte Keimbahnmutationen der Gene *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD* und *SDHAF2* [15] (HGMD Datenbank, Stand 01.10.2016)

	<i>SDHA</i>	<i>SDHB</i>	<i>SDHC</i>	<i>SDHD</i>	<i>SDHAF2</i>
<b>bekannte Mutationen</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Anzahl</b>
<b>Gesamtzahl</b>	<b>8</b>	<b>217</b>	<b>46</b>	<b>146</b>	<b>5</b>
○ missense/ nonsense	7	103	25	59	4
○ Spleißmutationen	1	26	6	12	-
○ kleine Deletionen	-	43	2	40	-
○ kleine Insertionen	-	14	4	14	1
○ kleine Indels	-	4	-	4	-
○ große Deletionen	-	24	8	15	-
○ große Insertionen	-	2	-	1	-
○ komplexe Rekombinationen	-	1	-	1	-
○ regulatorische Mutation	-	-	1	-	-

#### 2.5.4. *RET*

Das *RET*-Gen (*RET*-Protoonkogen) liegt auf Chromosom 10q11.2 und kodiert für eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase, die eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung der Zellen und somit der Regulation des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung spielt [14, 17, 18].

Keimbahnmutationen im *RET*-Gen können entweder als inaktivierende Mutationen Auslöser der Hirschsprung-Krankheit sein oder, im Bezug auf PCCs und PGLs, als Gain-of-function Mutationen das familiäre Syndrom der multiplen endokrinen Neoplasie Typ 2 (MEN2) auslösen [1, 5, 18]. Die MEN2 wird klinisch in drei verschiedene Formen aufgeteilt: die MEN2A, die MEN2B und das familiäre medulläre Schilddrüsenkarzinom. PCCs treten nur bei der MEN2A und der MEN2B auf [1, 17, 18].

Ca. 98% der PCC und PGL auslösenden Keimbahnmutationen bei der MEN2 lassen sich in den Exons 10, 11, 13, 14, 15, und 16 nachweisen [1, 2]. Bei etwa 50% aller MEN2 Patienten kommt es zur Ausbildung eines Phäochromozytoms (meist bilateral in den Nebennieren). Das Durchschnittsalter der Patienten liegt zwischen 30-40 Jahren. Maligne Krankheitsverläufe sind eher selten [1, 2, 3, 12, 21].

Eine Übersicht zur Verteilung der bisher beschriebenen Mutationen im *RET*-Gen mit klinischer Bedeutung ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Phäochromozytom und Paragangliom assoziierte Keimbahnmutationen des *RET*-Gens [15] (HGMD Datenbank, Stand 01.10.2016)

<b>bekannte Mutationen</b>	<b>Anzahl</b>
<b>Gesamtzahl</b>	<b>45</b>
○ missense/ nonsense	34
○ Spleißmutation	1
○ kleine Deletionen	2
○ kleine Insertionen	2
○ kleine Indels	6

### 2.5.5. *TMEM127*

Das *TMEM127*-Gen (Transmembrane Protein 127) ist auf Chromosom 2q11.2 lokalisiert. *TMEM127* ist ein Tumorsuppressorgen, das für ein Transmembranprotein kodiert, welches an einem Signalweg für das Zellwachstum und –überleben beteiligt ist [17, 18].

Patienten mit einer Keimbahnmutation im *TMEM127*-Gen haben ein erhöhtes Risiko für das Ausbilden eines PCCs oder, eher selten, eines PGLs. Es sind maligne Krankheitsverläufe bekannt [1, 2, 18].

Eine Übersicht zur Verteilung der bisher beschriebenen Mutationen im *TMEM127*-Gen mit klinischer Bedeutung ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Phäochromozytom und Paragangliom assoziierte Keimbahnmutationen des *TMEM127*-Gens [15] (HGMD Datenbank, Stand 01.10.2016)

<b>bekannte Mutationen</b>	<b>Anzahl</b>
<b>Gesamtzahl</b>	<b>32</b>
○ missense/ nonsense	20
○ Spleißmutationen	3
○ kleine Deletionen	4
○ kleine Insertionen	3
○ kleine Indels	1
○ regulatorische Mutation	1

### 2.5.6. *MAX*

Das *MAX*-Gen (MYC assoziierter Faktor X) ist auf Chromosom 14q23 lokalisiert und kodiert für das hochkonservierte *MAX*-Protein. Das Protein ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Regulation der Zelldifferenzierung, der Apoptose und der Zellproliferation beteiligt ist [1, 14, 17, 18].

Im *MAX*-Gen wurden Keimbahnmutationen nachgewiesen, die ursächlich für die Entstehung von Phäochromozytomen und Paragangliomen sind. Betroffene Patienten erkranken meist in einem Alter von unter 30 Jahren und besitzen ein hohes Risiko für einen malignen Krankheitsverlauf [1, 2, 15].

Eine Übersicht zur Verteilung der bisher beschriebenen Mutationen im *MAX*-Gen mit klinischer Bedeutung ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Phäochromozytom und Paragangliom assoziierte Keimbahnmutationen des *MAX*-Gens [15] (HGMD Datenbank, Stand 01.10.2016)

<b>bekannte Mutationen</b>	<b>Anzahl</b>
<b>Gesamtzahl</b>	<b>22</b>
○ missense/ nonsense	14
○ Spleißmutationen	3
○ kleine Deletionen	3
○ große Deletion	1
○ komplexe Rekombination	1

### 2.5.7. *KIF1B*

Das *KIF1B*-Gen (Kinesin Familienmitglied 1B) ist auf Chromosom 1p36.2 lokalisiert und kodiert für ein Transport-Motor-Protein, welches entlang der Mikrotubuli vor allem Vorstufen von Mitochondrien und synaptischen Vesikeln transportiert [17, 18]. Das *KIF1B*-Protein soll außerdem an der Apoptose von überschüssigen oder geschädigten Zellen beteiligt sein [18].

Im *KIF1B*-Gen wurde bisher eine Missense-Mutation nachgewiesen, die ursächlich für die Entstehung eines isolierten Phäochromozytoms ist [15].

Die Bedeutung von *KIF1B* für die Entstehung von hereditären PCCs und eventuell auch PGLs ist jedoch bisher noch nicht ausreichend aufgeklärt [5].

Eine Übersicht zur Verteilung der bisher beschriebenen Mutationen im *KIF1B*-Gen mit klinischer Bedeutung ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Phäochromozytom und Paragangliom assoziierte Keimbahnmutationen des *KIF1B*-Gens [15] (HGMD Datenbank, Stand 01.10.2016)

<b>bekannte Mutationen</b>	<b>Anzahl</b>
<b>Gesamtzahl</b>	<b>1</b>
○ missense	1



Tabelle 8: Charakteristika der hereditären PCCs oder PGLs in Abhängigkeit von den durch Mutationen betroffenen Genen [1, 2, 5]

\* diese Tumore bewirken eine Hypersekretion von Katecholaminen

Gen (Syndrom)	Phäochromozytom	Paragangliom	Stoffwechsel aktiv*	Malignitätsrisiko	durchschnittliches Alter bei der Diagnose	Klinik/ andere Tumore
<i>KIF1B</i>	bilateral	bisher nicht beobachtet	ja	keine Angaben	ca. 46 Jahre	bisher nicht beobachtet
<i>MAX</i>	meist bilateral	selten	ja	deutlich erhöht	ca. 32 Jahre	bisher nicht beobachtet
<i>NF1</i>	meist unilateral und in den Nebennieren	selten	ja	gering	ca. 42 Jahre	Café-au-lait Flecken und/ oder Neurofibrome auf der Haut sowie Lisch Knoten in der Iris
<i>RET</i> (MEN2)	bilateral; fast ausschließlich in den Nebennieren	sehr selten	ja	gering	< 30 Jahre	medulläres Schilddrüsenkarzinom
<i>SDHA</i>	selten	ja, sowohl sympathische als auch parasymphatische PGL	ja	bisher nicht beobachtet	ca. 40 Jahre	bisher nicht beobachtet
<i>SDHB</i> (PGL 4)	selten	ja, meist sympathische PGL	ja	deutlich erhöht	ca. 31 Jahre	sehr selten Nierenkarzinom
<i>SDHC</i> (PGL 3)	sehr selten	ja, fast ausschließlich parasymphatische PGL	nein	gering	ca. 41 Jahre	bisher nicht beobachtet
<i>SDHD</i> (PGL 1)	selten	ja, oft Mehrfachtumore und parasymphatische PGLs	selten	gering	ca. 32 Jahre	bisher nicht beobachtet
<i>SDHAF2</i> (PGL 2)	bisher nicht beschrieben	ja, parasymphatische PGL	nein	bisher nicht beobachtet	ca. 32 Jahre	bisher nicht beobachtet
<i>TMEM127</i>	meist bilateral	selten	ja	gering	ca. 43 Jahre	bisher nicht beobachtet
<i>VHL</i>	meist bilateral und in den Nebennieren	selten	ja	gering	ca. 30 Jahre	Hämangioblastomen des Zentralnervensystems, Gehirns und der Netzhaut

Die Tabelle 8 verdeutlicht, dass eine differentialdiagnostische Voreingrenzung auf ein einzelnes Gen im Vorfeld sehr schwer ist. Außer beim *NFI*-Gen besteht bei keinem anderen Gen eine eindeutige Genotyp-Phänotyp Korrelation, sodass eine Untersuchung mit einem NGS-Panel für alle Gene parallel in einem Analysegang einen großen Vorteil darstellt.

## **2.6. Molekulargenetische Diagnostik der Phäochromozytome/ Paragangliome**

Die Entwicklung von Verfahren zur DNA-Sequenzierung in den 1970er Jahren stellt den Beginn der Ära zur Erforschung des Genoms und der molekulargenetischen Diagnostik dar. 1980 erhielt Frederick Sanger für die von ihm entwickelte Sanger-Sequenzierung den Nobelpreis [22, 23, 24].

Die erste vollständige Sequenzierung des menschlichen Genoms war in den Jahren 1990-2003 das Ziel des Humangenomprojektes. Mit der Veröffentlichung der ersten *Draft*-Sequenzen wurde es erfolgreich abgeschlossen. Daraus abgeleitete Erkenntnisse führten zu einem besseren Verständnis des Aufbaus des Genoms und bieten gleichzeitig ein großes Potenzial für die molekulargenetische Diagnostik [25, 26].

Die molekulargenetische Diagnostik dient in erster Linie dem Nachweis oder Ausschluss von krankheitsrelevanten genetischen Veränderungen im Genom eines Patienten [27].

Mutationen sind krankheitsauslösende, genetische Veränderungen in der Nukleotidsequenz der DNA. Neben Missense- oder Nonsense-Mutationen können auch Duplikationen oder Deletionen von wenigen Basen oder großen Bereichen oder Translokationen auftreten [28]. Daneben gibt es eine Vielzahl von Genvarianten, die als nicht krankheitsauslösend gelten. Sie werden als Einzelbasenaustausch-Polymorphismen (SNPs) bezeichnet. SNPs kommen mit einer Frequenz von >1% in einer Bevölkerungsgruppe vor [22, 29].

Etwa 85% aller krankheitsauslösenden Mutationen befinden sich in den kodierenden Bereichen (Exons) eines Gens [30]. Auch Spleißmutationen an der Grenze zwischen kodierenden und nicht-kodierenden Bereichen (Introns) müssen berücksichtigt werden [2].

Der Nachweis einer Keimbahnmutation ist entscheidend für die weitere Behandlung des Patienten, den zu erwartenden Krankheitsverlauf, sowie für die humangenetische Beratung des Patienten und weiterer Familienmitglieder [2].

In der molekularen Diagnostik werden gegenwärtig meist nur die molekulargenetischen Standardmethoden Sanger-Sequenzierung und multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation (MLPA) eingesetzt. Mit diesen Methoden können sowohl Punktmutationen, kleinere Deletionen und Duplikationen (Sanger-Sequenzierung) als auch komplexere Deletionen und Duplikationen (MLPA) nachgewiesen werden.

Um den steigenden Anforderungen (immer mehr bekannte diagnostisch relevante Gene und krankheitsauslösende Mutationen) der humangenetischen Diagnostik standhalten zu können, hat in den letzten 10 Jahren ein enormer technologischer Fortschritt stattgefunden, welcher zu immer besseren, kostengünstigeren und schnelleren Analysemethoden im Bereich der DNA-Sequenzierung führte. Diese DNA-Sequenzieretechniken der „Neuen Generation“ (Next Generation Sequencing) sind Hochdurchsatz-Sequenziermethoden, die durch parallele Sequenzierung in kurzer Zeit sehr viele Sequenzdaten, nicht nur von mehreren Patienten sondern auch von mehreren Genen, gleichzeitig generieren. Die Auswertung dieser Datenmengen stellt bei diesen Verfahren die eigentliche Herausforderung dar [23].

## **2.7. Etablierte molekulargenetische Methoden**

Zu den bisher etablierten Methoden in der molekulargenetischen Diagnostik zählen die folgenden: Chromosomen-Analyse, Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH), DNA-Arrays, MALDI-TOF, DNA-Sequenzierung und multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation (MLPA) (s. Tabelle 9).

### **2.7.1. Chromosomenanalyse**

Bei der Chromosomenanalyse erfolgt eine mikroskopische Untersuchung des humanen Chromosomensatzes. Abweichungen von den typischen chromosomalen Bandenmustern kennzeichnen weiträumige genetische Veränderungen. Auch abweichende Chromosomenzahlen wie z.B. bei Trisomien oder Monosomien können so nachgewiesen werden [31, 32].

### **2.7.2. Fluoreszenz in situ Hybridisierung**

Mit der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) können einzelne Gene auf Chromosomen lokalisiert werden. Die Sonden werden mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und an die Zielsequenzen auf dem Chromosom hybridisiert. Die Verwendung sequenzspezifischer Sonden ermöglicht den gezielten Nachweis chromosomaler Abschnitte und deren Lokalisation auf den entsprechenden Chromosomen. Außerdem wird im Vergleich zur Chromosomenanalyse die Auflösung erhöht. Die Auswertung erfolgt nach Anregung mit Laserlicht unter dem Fluoreszenzmikroskop [33].

### **2.7.3. Microarray**

DNA-Microarrays dienen in erster Linie der Genomanalyse z.B. in Bezug auf Genexpressions-Untersuchungen. Es können zwei verschiedene Haupt-Verfahren unterschieden werden. Entweder werden cDNAs auf einem Trägermaterial befestigt und z.B. mit mRNAs aus bestimmten Zellen hybridisiert oder es werden synthetisierte Oligonukleotide auf das Trägermaterial gebunden und mit Fluoreszenzfarbstoff markierten cDNAs hybridisiert. Die Fluoreszenzsignale geben Rückschlüsse auf die untersuchte Genexpression [33, 34]. Da sich die Analyse aus der Summe vieler kleiner Abschnitte zusammensetzt, wird die Auflösung der Analysen weiter erhöht.

Mit einem speziellen "comparative genomic hybridization" (CGH) Array kann außerdem die veränderte Kopienzahl (CNV) von Genen und größeren Chromosomenabschnitten ermittelt werden [35].

### **2.7.4. MALDI-TOF MS**

MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometrie) ist ein Hochdurchsatzverfahren zur Genotypisierung. Das Verfahren ermöglicht auch den Nachweis von CNV sowie Methylierungsanalysen. Die in eine Matrix eingebetteten DNA-Moleküle werden durch Laserbeschuss ionisiert und in einem elektrischen Feld beschleunigt, bevor sie abhängig von ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis nach entsprechender Flugzeit auf einem Detektor auftreffen und analysiert werden [36].

### **2.7.5. Real Time PCR**

Bei der Real Time PCR kann über eine Fluoreszenzfarbstoff-Messung z.B. SYBR Green, welches in doppelsträngige DNA interkaliert, während der einzelnen PCR-Zyklen die Zunahme von PCR-Produkten in Echtzeit beobachtet werden. Mit der Real Time PCR als Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, können Quantifizierungen von Genexpressionen oder der Nachweis von Erbkrankheiten erfolgen. Außerdem kann eine Genotypisierung zum Nachweis von Punktmutationen, Polymorphismen sowie Deletionen und Duplikationen als qualitative Real Time PCR über eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt werden. Die Detektion kann hierbei mittels sequenzspezifischer Sonden oder Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer erfolgen [93].

### **2.7.6. DNA-Sequenzierung**

Die moderne DNA-Sequenzierung startete mit der Methode von Maxam und Gilbert. Bei dieser Methode wird die doppelsträngige DNA am 5´oder 3´Ende radioaktiv markiert. Anschließend erfolgt in vier verschiedenen Ansätzen eine basenspezifische chemische Spaltung der DNA. Die verschiedenen DNA-Fragmente werden in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und die Sequenz abgelesen [37, 38]. Die heute als „Goldstandard“ angewendete DNA-Sequenzierung ist mit leichten Modifizierungen die Methode nach Frederick Sanger. Die Methode basiert auf dem zufälligen Einbau von modifizierten und Fluoreszenzfarbstoff markierten Kettenabbruchnukleotiden während der Sequenz-Reaktion. Die so entstehenden, unterschiedlich langen DNA-Fragmente werden in einer Kapillargelelektrophorese aufgetrennt und die Fluoreszenzfarbstoffe durch einen Laser angeregt. Die Sequenz kann als Elektropherogramm abgelesen werden [38, 39].

### **2.7.7. Multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation**

Die multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation (MLPA) kann Veränderungen chromosomaler DNA Kopienzahlen in einem Gen identifizieren. Hierbei hybridisieren verschiedene Sondenpaare an die jeweiligen Ziel-Sequenzen der DNA. Konnten beide Sonden eines Sondenpaares auf der DNA binden, werden sie enzymatisch in einer Ligationsreaktion miteinander verknüpft. Nach einer Vervielfältigung der DNA-Fragmente durch Polymerase Kettenreaktion (PCR) und anschließender Kapillarelektrophorese kann das Mengenverhältnis der Sondenpaare zueinander bestimmt werden [40].

## **2.8. Neue molekulargenetische Methoden**

### **2.8.1. Next Generation Sequencing**

Next Generation Sequencing (NGS) ist eine Methode der Hochdurchsatz-Sequenzierung, welche auf verschiedenen Plattformen angeboten wird. Alle Plattformen basieren auf drei Grundsritten: (1) Library-Preparation, (2) Amplifikation und (3) Sequenzierung, wobei der Methodenablauf bei den verschiedenen Plattformen variiert. Beim NGS wird die gesamte genomische DNA zuerst fragmentiert, dann ganz oder teilweise vervielfältigt (1) und anschließend modifiziert (Adapterligation). Über einen Amplifikationsschritt werden von jedem DNA-Fragment identische Klone erzeugt (2), die alle gemeinsam in einem Ansatz sequenziert werden (3). Die Sequenzanalyse erfolgt z.B. bei der Illumina-Plattform Sequenzierung über Fluoreszenzfarbstoffmessung der fluoreszenz-markierten Nukleotide, während die Ion Torrent Plattform die Sequenzierung durch Messung der Änderung des pH-Wertes beim Einbau eines Nukleotids realisiert [27, 41].

Tabelle 9: Methodenvergleich der verschiedenen molekulargenetischen Methoden

Methoden	Vorteile	Nachteile
Chromosomenanalyse	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Nachweis von Trisomien und Monosomien</li> <li>○ Überprüfung der Bandenmuster der Chromosomen</li> <li>○ Nachweis von komplexen Deletionen und Duplikationen</li> <li>○ Nachweis von komplexen Rearrangements</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ lebende, teilungsfähige Zellen werden benötigt</li> <li>○ begrenzte Auflösung der Bandenmuster</li> <li>○ kein Nachweis von kleinen Deletionen und Duplikationen sowie anderen Sequenzveränderungen</li> </ul>
FISH	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Untersuchung von Chromosomen und deren Abschnitte auf Trisomien oder Deletion/ Duplikation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ lebende Zellen werden benötigt sowie eine gute Chromosomenpräparation</li> <li>○ begrenzte Zahl an chromosomalen Loci</li> </ul>
Microarray + CGH-Array	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Nachweis von Expressionsanalysen und CNV</li> <li>○ Nachweis von großen Deletionen/ Duplikationen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ schlechter Nachweis von Rearrangements</li> <li>○ große RNA- und DNA-Mengen nötig</li> <li>○ hohe Kosten</li> <li>○ Kreuzhybridisierungen möglich</li> </ul>
MALDI-TOF MS	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Hochdurchsatz-Mutations-Genotypisierung</li> <li>○ Nachweis von CNV und Methylierungsanalysen</li> <li>○ diagnostisches Resequenzieren</li> <li>○ geringe Menge an DNA nötig</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Fokus auf bekannte bzw. vermutete Genvarianten</li> <li>○ Signalverlust bei zu langen DNA-Fragmenten (100-300 bp)</li> </ul>
Real Time PCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Nachweis von Genexpressionen</li> <li>○ Nachweis von bakterieller und viraler DNA</li> <li>○ Nachweis von Punktmutationen und Polymorphismen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Fokus auf bekannten bzw. vermuteten Punktmutationen oder Polymorphismen</li> <li>○ z.T. geringe Spezifität bei sequenzunspezifischen Farbstoffen (PCR-Nebenprodukte, Primer Dimere)</li> </ul>
DNA-Sequenzierung	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Nachweis von Punktmutationen, kleinen Deletionen und Duplikationen</li> <li>○ geringe Menge an DNA nötig</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ kein Nachweis von CNV, großen Duplikationen und Deletionen</li> <li>○ einzelne Untersuchungen von Exons und Genen</li> </ul>
MLPA	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Nachweis von CNV, komplexen Deletionen und Duplikationen</li> <li>○ geringe DNA-Menge nötig</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Nachweis von Punktmutationen ist limitiert</li> </ul>
NGS	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ parallele Untersuchung von mehreren Genen und Patienten</li> <li>○ Genom wird überlappend mehrfach gelesen</li> <li>○ Nachweis von Punktmutationen, CNV, kleinen Deletionen und Duplikationen</li> <li>○ geringe Menge an DNA nötig</li> <li>○ keine Kreuzhybridisierung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ große Datenmengen</li> <li>○ Probleme mit homopolymeren Sequenzen</li> </ul>

## 2.9. Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch die Einführung eines NGS-Assays (auf Basis einer innovativen Technologie), die molekulargenetische Diagnostik des hereditären Phäochromozytoms sowie des hereditären Paraganglioms in einem genetischen Routinelabor effizienter zu gestalten. Hierfür wurde ein Gen-Panel für das Krankheitsbild „Phäochromozytom“ designed, welches aus den Genen *NF1*, *VHL*, *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHAF2*, *RET*, *TMEM127*, *MAX* und *KIF1B* besteht. Hierzu ist es erforderlich PCR-Primer zu entwickeln, mit denen alle notwendigen Sequenzabschnitte der 11 Gene amplifiziert werden können. Das Ziel dabei ist, dass die Primer als Mix in möglichst wenigen Ansätzen funktionieren und die Sequenzen möglichst vollständig abdecken. Die Etablierung der Next Generation Sequencing Technologie (NGS) bietet die Chance einer schnellen und effizienten Untersuchung aller diagnostisch relevanten Gene parallel in einem Analysegang. Die Validierung der NGS-Ergebnisse erfolgte durch einen Vergleich mit den Ergebnissen aus etablierten Untersuchungsmethoden wie der Sanger-Sequenzierung und der multiplexen ligationsabhängigen Sondenamplifikation (MLPA). Um einen vollständigen Vergleich zu gewährleisten, wurden für alle untersuchten Patientenproben die 11 Gene komplett mit der Sanger-Sequenzierung sequenziert. Zusätzlich wurde mit der NGS-Technologie eine Analyse der Kopienzahlveränderungen (CNV) im Vergleich zur MLPA Analyse durchgeführt.

Zur Verfügung stand die Ion Torrent Chemie mit dem PGM-Gerätesystem von ThermoFisher Scientific. Das Gerätesystem besaß eine moderate Grundinvestition und eine, dem Projektvolumen entsprechende, Durchsatzkapazität. Insgesamt wurden 28 Patientenproben mit dem Krankheitsbild eines Phäochromozytoms oder Paraganglioms untersucht.

Zusätzlich erfolgte eine Kosten- und Zeitanalyse des neu etablierten NGS-Assays im Vergleich zur Sanger-Sequenzierung.

Durch die gewonnenen Ergebnisse wurden Aussagen darüber erwartet, ob durch den neu etablierten NGS-Assay anhand des selbst designten Panels, eine Zeit- und Kosteneinsparung bei der Diagnostik von Krankheitsbildern mit mehreren, diagnostisch relevanten, Genen möglich ist und dennoch dieselben oder möglicherweise sogar bessere/ spezifische und sensitivere Analyseergebnisse geliefert werden können.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Materialien

##### 3.1.1. Patientenproben und Kontrollprobe

Als Probenumfang wurden 28 Patienten mit nachgewiesenem Phäochromozytom oder Paragangliom untersucht. Die Proben wurden von Herrn Prof. Dr. Stephan Petersenn (ENDOC Praxis für Endokrinologie und Andrologie in Hamburg) freundlicherweise in Form von EDTA-Blut zur Verfügung gestellt.

Als interne Referenz-Blutprobe zur Basismethodenetablierung, wie z.B. Testen und Optimierung der PCR oder des Primer Designs, wurde eine standardisierte in-Haus Kontroll-DNA („SNP18“) verwendet, die als Einzelprobe der „gesunden mitteleuropäischen Durchschnittsbevölkerung“ zugeordnet ist.

Die Zustimmung der Patienten für die Durchführung von Mutationsanalysen zur Feststellung einer genetischen Ursache der Erkrankung wurde von dem behandelnden Arzt zuvor eingeholt.

##### 3.1.2. Geräte

Während der gesamten praktischen Arbeiten im Labor wurde mit den in Tabelle 10 aufgeführten Geräten und Verbrauchsmaterialien gearbeitet.

Tabelle 10: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterial

\* by Life Technologies jetzt Thermo Fisher Scientific

<b>Gerät/ Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>	<b>nähere Beschreibung bzw. Typ</b>
div. Heizblöcke	Eppendorf	Thermomixer 5436
div. Tischzentrifugen	Eppendorf	Zentrifuge 5415D/ 5415R/ 5415C
Zentrifuge	Hettich Zentrifugen	Universal 320 mit Ausschwingrotor für Mikrotiterplatten
Tischzentrifuge	Heraeus Sepatech	Biofuge 13
Zentrifuge	Hettich Zentrifugen	Rotina 35 mit Ausschwingrotor für Mikrotiterplatten
div. Pipetten	Eppendorf	Reference 10, 20, 100, 200 und 1000 µL Research 2,5 und 200 µL Research plus 2,5 µL
Mehrkanal-Pipetten	Eppendorf	Research pro 10 µL und 100 µL



Biospere Filter Tips	Sarstedt AG & Co	für 10, 20, 200 und 1000 µL Pipetten
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co	10, 20, 200 und 1000 µL
Vortex	Julabo	Paramix 3
Reagiergefäße	Sarstedt AG & Co	0,5 mL, 1,5 mL und 2 mL
Eppendorf Tubes	Eppendorf	5 mL
Low Binding Tubes	Sarstedt AG & Co	Reagiergefäß 1,5 mL DNA Low Bind DNA-/ DNase-/ RNase-/ PCR inhibitor-free certified
Reaktionsgefäße für das ES	Nerbe Plus	0,2 mL
Falcon-Röhrchen	Sarstedt AG & Co	15 mL und 50 mL
96 PCR-Platte randlos	Sarstedt AG & Co	DNA-/DNase-/RNase-/PCR inhibitor-free certified
96 Multiply PCR-Platte Vollrand	Sarstedt AG & Co	DNA-/DNase-/RNase-/ PCR inhibitor-free certified
96 PCR-Platte Halbrand	Sarstedt AG & Co	DNA-/DNase-/RNase-/PCR inhibitor-free certified
FrameStar96	4titude	96-well PCR plate
MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems *	
MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems *	PCR Compatible, DNA/ RNA/ RNase free
PCR Seal	4titude	Adhesive seal sheets for PCR
Pipettierautomat	Beckman Coulter	Biomek NX Laboratory Automation Workstation mit 96- Kanal Kopf
Biomek NX Spitzen	Beckman Coulter	AP96 P250 Pipette Tips certified DNase, RNase, DNA free
Magnetplatten für Biomek	Beckman Coulter	SPRIplate 96-Ring
PCR-Cycler	Peqlab Biotechnologie	cyclone 96
PCR-Cycler	Eppendorf	Mastercycler epgradient S
PCR-Cycler	Applied Biosystems *	GeneAmpPCR System 9700
PCR-Cycler	Applied Biosystems *	ProFlex PCR System
Kapillarelektrophoresesystem zur DNA-Sequenzierung	Applied Biosystems *	3500xL Genetic Analyzer mit 24x 50 cm Kapillaren
Anode Buffer Container	Applied Biosystems*	3500 Series
Cathode Buffer Container	Applied Biosystems*	3500 Series
POP-7 (960) Performance Optimized Polymer	Applied Biosystems*	3500 Series

Real Time PCR System	Applied Biosystems *	ABI PRISM 7000 Sequence Detection System; mit entsprechender Gerätesoftware zur Datenanalyse
Qubit 2.0 Fluorometer	Invitrogen*	
Qubit Fluorometer	Invitrogen*	
Qubit assay tubes	Molecular Probes*	Q32856
Magnetständer	Chemagen	chemagic Stand 2x12
Vakuumpumpe	Millipore	Vacuum Pump XF54 230 50Ion
MF75 Filtereinheiten	Fisher Scientific	0,45 µm Nylonmembran, 1000 mL
OneTouch 2	Ion Torrent*	
Ion OneTouch ES	Ion Torrent*	
Personal Genome Machine	Ion Torrent*	mit entsprechender Gerätesoftware zur Datenanalyse
Chip-Zentrifuge (für PGM)	VWR International	Mini Star silverline
Waage	Sartorius	PT310
Waage	Heidolph	
Reinstwasseranlage	Millipore	Milli-Q Reference A+
Mikrowelle	Panasonic	NN-K 103W
Geldokumentationssystem	Biostep	Biostep Dark Hood DH-40/50; mit entsprechender Gerätesoftware zur Datenanalyse
div. Gelkammern	MWG-Biotech	kleine und mittlere Kammern
	Peqlab Biotechnologie	große Kammern
div. Power Supply	Bio-Rad	Power Pac 200/ 3000
<u>div. Gel-Kämme</u>	<u>Peqlab Biotechnologie</u>	<u>10, 25, 36 und 42 WELL 1,5 mm</u>

### 3.1.3. Chemikalien

Alle für diese Arbeit verwendeten Chemikalien (Reagenzien, Lösungen und Enzyme) wurden im Reinheitsgrad *p.A.* oder für die Molekularbiologie eingesetzt. Im Folgenden (Tabelle 11) sind die eingesetzten Chemikalien tabellarisch aufgeführt.

Tabelle 11: Verwendete Chemikalien

\* by Life Technologies jetzt Thermo Fisher Scientific

<b>Chemikalie/ Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>	<b>nähere Beschreibung</b>
Ethanol	Carl Roth & Co. KG	Rotipuran $\geq 99,8\%$ <i>p.a.</i>
TE Puffer pH 8.0	Ambion*	10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0 0,2 $\mu\text{m}$ filtered 1000 mL
PBS pH 7.4 (1X)	Gibco*	
Qiagen Protease	Qiagen	Protease Solvent
PCR Puffer, 10x	Qiagen	mit 15 mM $\text{MgCl}_2$
Deoxynucleoside Triphosphate Set	Roche Diagnostics	je 10 $\mu\text{mol}$ (100 $\mu\text{L}$ )
$\text{MgCl}_2$	Qiagen	25 mM Stammlösung
Q-Solution, 5x	Qiagen	
HotStarTaq DNA Polymerase	Qiagen	5 Units/ $\mu\text{L}$
Reinstwasser	Millipore	
Dimethylsulfoxid	Carl Roth & Co. KG	$\geq 99,5\%$ für die Molekularbiologie
Primer	Metabion International AG	100 pmol/ $\mu\text{L}$
AgencourtCleanSEQ	Beckman Coulter	Magnetic Particles made by Thermo Scientific
AgencourtAMPureXP	Beckman Coulter	Magnetic Particles manufactured by Seradyn
Dynabeads MyOne	Invitrogen*	Streptavidin C1
Natronlauge (1N)	Carl Roth & Co. KG	1 mol/L – 1N Maßlösung
TRIS (Trizma base)	Carl Roth & Co. KG	Pufferan $\geq 99,9\%$ <i>p.a.</i>
Borsäure	Carl Roth & Co. KG	$\geq 99,5$
EDTA (Titriplex)	Merck KGaA	TitriplexIII
Biozym LE Agarose	Biozym	Sodium hydroxide solution for Gel electrophoresis
Ethidiumbromidlösung 6x DNA Loading Dye	Carl Roth & Co. KG Thermo Scientific	1% (10 mg/mL)
Loading Puffer DNA II	AppliChem Panreac ITW Companies	
DNA Ladder		
→ GeneRuler Low Range	Thermo Scientific	0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 50 $\mu\text{g}$
→ FastRuler High Range	Thermo Scientific	ready-to-use
→ O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Fermentas	ready-to-use
Argon	Linde	Argon 4.8 für Spektrometrie

### 3.1.4. Verwendete Primer

Alle Primer für die Sanger-Sequenzierung wurden von der Firma Metabion International AG im 0.02µmol-Synthesemaßstab mit dem Reinheitsgrad „entsalzt“ bezogen. Die Lieferkonzentration betrug 100 µM. Die detaillierten Tabellen der Primersequenzen und Annealingtemperaturen sind im Anhang aufgeführt (s. Anhang Tabellen A1-A11).

Die PCR-Primer für die Gene *KIF1B*, *MAX* und *SDHA* wurden mit der Hilfe von verschiedenen Software Tools designed. Aufgrund der vier bekannten Pseudogene *SDHAP1*, *SDHAP2*, *SDHAP3* und *LOC220729* bzw. homologer Regionen für das *SDHA*-Gen, wurden die in Tabelle A5 (s. Anhang) gekennzeichneten Primer aus der Literatur [42] übernommen, um die Spezifität der PCR für das exprimierte *SDHA*-Gen zu gewährleisten. Die Primer für die Gene *NF1*, *RET*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHAF2*, *TMEM127* und *VHL* wurden aus der Routine-Diagnostik des Labors übernommen und für diese Arbeit genutzt. Im Falle der Analytik des *RET*-Gens wurden nur die Exons 8, 10, 11, 13, 14, 15 und 16 untersucht, da alle bisher bekannten relevanten Phäochromozytom oder Paragangliom auslösenden Mutationen in diesen 7 Exons auftreten.

Die *NF1*-Primer sind bis auf die Primerpaare 13 und 32 getaggt. Dies bedeutet, dass alle forward Primer die gleiche T7-Tag-Sequenz des T7-RNA-Polymerase-Promoters sowie eine 8 bp lange Spacer-Sequenz vor der eigentlichen Primersequenz besitzen. Analog gilt dies für die reverse Primer, die ebenfalls alle eine einheitliche SP6-Tag-Sequenz des SP6-RNA-Polymerase-Promoters sowie eine 8 bp lange Spacer-Sequenz vor der eigentlichen Primersequenz besitzen. Somit konnte für die Sequenzierung mit den universellen Primern T7 und SP6 gearbeitet werden, die an den jeweiligen Tag binden. Die Spacer-Sequenzen dienen als zusätzliche Verlängerung der Tags, um bei der Sequenzierung in jedem Fall die gesamte Exonsequenz auswerten zu können.

Das verwendete Primer-Panel „Phäochromozytom“ für das Next Generation Sequencing wurde von der Firma Life Technologies (jetzt Thermo Fisher Scientific) bezogen. Die Konzentration für jeden einzelnen Primer in den gebrauchsfertigen Primer-Pools betrug 50 nM. Die Annealingtemperatur für die NGS-Primer betrug, der AmpliSeq-PCR entsprechend, für alle Primer 60°C.

### 3.1.5. Untersuchte Gene

In der vorliegenden Arbeit wurde die kodierende Sequenz der Gene *KIF1B*, *MAX*, *NF1*, *RET*, *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHAF2*, *TMEM127* und *VHL* mit den Methoden der Sanger-Sequenzierung, der multiplexen ligationsabhängigen Sondenamplifikation (MLPA) und des Next Generation Sequencing (Ion Torrent System) untersucht.

Bei den Genen *KIF1B*, *MAX* (s. Abbildung 3), *NF1*, *RET*, *SDHC*, *TMEM127* und *VHL* sind ein oder mehrere Transkriptionsvarianten bekannt. Dies kann zu Unstimmigkeiten in der Exon-Nummerierung der Gene führen. In dieser Arbeit wurde mit den in der nachfolgenden Tabelle 12 aufgeführten Transkriptionsvarianten gearbeitet, welche durch die angegebene NM\_Nummer beschrieben wird. Die NM\_Nummer charakterisiert immer eine spezifische Transkriptionsvariante eines Gens.

Diese Arbeit bezieht sich jeweils auf die in der Datenbank mehrheitlich benutzte Transkriptvariante.

Tabelle 12: Nähere Charakterisierung der elf untersuchten Gene

\*<sup>1</sup> basierend auf GeneCards Human Gene Database und NCBI

\*<sup>2</sup> aus Gründen der einfachen Zuordnung und Klassifizierung von Mutationen basieren die NM\_-Referenzsequenzen auf der Datenbank HGMD; einzige Ausnahme ist die NM\_-Referenzsequenz von *NF1*, diese basiert auf dem Programm DNA Workbench und enthält alle 58 Exons des *NF1*-Gens

\*<sup>3</sup> *KIF1B* besitzt ein weiteres untranslatiertes Exon vor dem translatierten ersten Exon, dieses wurde beim Primer Design für die Sanger-Sequenzierung berücksichtigt, sodass insgesamt 47 Exons sequenziert wurden

<b>Gen</b>	<b>Chromosom</b>	<b>Lokalisation*<sup>1</sup></b>	<b>Exonanzahl</b>	<b>NM_Nummer*<sup>2</sup></b>
<i>KIF1B</i>	1	1p36.2	46* <sup>3</sup>	NM_015074.3
<i>MAX</i>	14	14q23	5	NM_002382.3
<i>NF1</i>	17	17q11.2	58	NM_001042492.1
<i>RET</i>	10	10q11.2	20	NM_020975.3
<i>SDHA</i>	5	5p15	15	NM_004168.2
<i>SDHB</i>	1	1p36.1-p35	8	NM_003000.1
<i>SDHC</i>	1	1q23.3	6	NM_003001.3
<i>SDHD</i>	11	11q23	4	NM_003002.1
<i>SDHAF2</i>	11	11q12.2	4	NM_017841.2
<i>TMEM127</i>	2	2q11.2	3	NM_017849.1
<i>VHL</i>	3	3p25.3	3	NM_000551.2

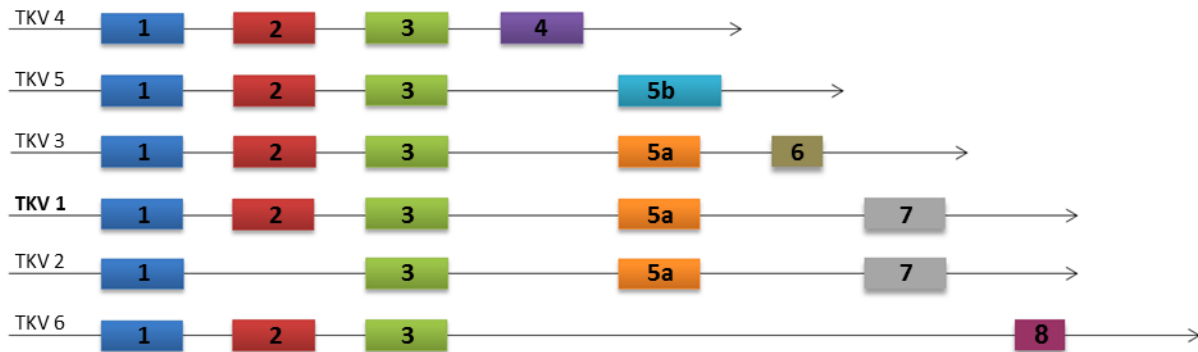


Abbildung 3: Schematische Darstellung der sechs Transkriptionsvarianten (TKV) des MAX-Gens und die gewählte Exon-Nummerierung: TKV 1 = Isoform a (NM\_002382.3), TKV 2 = Isoform b, TKV 3 = Isoform c, TKV 4 = Isoform d, TKV 5 = Isoform e und TKV 6 = Isoform f

### 3.1.6. Verwendete Kits

Über den gesamten Zeitraum der Doktorarbeit wurden die nachfolgend aufgelisteten Kits verwendet:

- ❖ *QIAamp DNA Blood Mini Kit (250)* von Qiagen (Hilden, Deutschland)
- ❖ *Qubit dsDNA HS Assay Kit, 100 assays* von Molecular Probes\* (Carlsbad, USA)
- ❖ *Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 – 96 LV* von Ion Torrent\* (Carlsbad, USA)
- ❖ *Ion Xpress Barcode Adapters 1-16 Kit* von Ion Torrent\* (Carlsbad, USA)
- ❖ *KAPA Library Quant Ion Torrent* von Peqlab (Erlangen, Deutschland)
- ❖ *Ion PGM Controls Kit v2* von Ion Torrent\* (Carlsbad, USA)
- ❖ *Ion PGM Template OT2 200 Kit* von Ion Torrent\* (Carlsbad, USA)
- ❖ *Ion Sphere Quality Control Kit* von Ion Torrent\* (Carlsbad, USA)
- ❖ *Ion PGM Sequencing 200 Kit v2* von Ion Torrent\* (Carlsbad, USA)
- ❖ Ion Chips von Ion Torrent\* (Carlsbad, USA)
  - *Ion 314 Chip Kit V2 4 Pack / 8 Pack*
  - *Ion 316 Chip Kit V2 4 Pack / 8 Pack*
  - *Ion 318 Chip Kit V2 4 Pack*
- ❖ *Ion PGM Weighted Chip Buckets, Minifuge* von Ion Torrent\* (Carlsbad, USA)
- ❖ *EK5 – FAM MLPA reagents* von MRC-Holland (Amsterdam, Niederlande)
- ❖ Probenmix Kit: *P016 - 025R VHL, P081 - 025R NF1 mix 1, P082 - 025R NF1 mix 2, P226 - 025R SDH und P429 - 025R SDHA-MAX* von MRC-Holland (Amsterdam, Niederlande)
- ❖ *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* von Applied Biosystems\* (Austin, USA)
- ❖ *Hi-Di Formamide* von Applied Biosystems\* (Warrington, England)
- ❖ *GeneScan - 500 ROX Size Standard* von Applied Biosystems\* (Warrington, England)

\* by Life Technologies jetzt Thermo Fisher Scientific

### 3.1.7. Verwendete Computerprogramme + Webseiten

Für die Auswertung und Bewertung der gewonnenen Daten wurde mit den nachfolgend aufgeführten Computerprogrammen und Webseiten gearbeitet. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Standardeinstellungen der Programme verwendet.

- ❖ CLC DNA Workbench 5.7.1 von CLC Bio (Aarhus, Dänemark)
- ❖ MassARRAY AssayDesigner 4.0 von Sequenom jetzt Agena Bioscience (San Diego, USA)
- ❖ Online Tools – AgenaCX von Agena Bioscience (San Diego, USA)  
→ ([www.agenacx.com](http://www.agenacx.com))
- ❖ Sequencher 4.9 von Gene Codes Corporation (Ann Arbor, USA)
- ❖ Chromas Lite 2.1.1 von Technelysium Pty (South Brisbane QLD, Australien)
- ❖ SeqPilot (Modul: SeqNext Version 4.2.2 Build 502) von JSI medical systems (Ettenheim, Deutschland)
- ❖ GeneMarker 1.75 von SoftGenetics (State College PA, USA)
- ❖ Ion AmpliSeq Designer 2.2 von Ion Torrent\* (Carlsbad, USA)
- ❖ IGV 2.3 von Broad Institute (Cambridge MA, USA)  
→ (<https://www.broadinstitute.org/software/igv/>)
- ❖ HGMD Professional von Biobase Biological Databases  
→ (<https://portal.biobase-international.com>)
- ❖ GeneCards Human Gene Database → ([www.genecards.org](http://www.genecards.org))
- ❖ NCBI → ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))  
→ Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>)  
→ dbSNP Build 140 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/))
- ❖ MutationTaster → (<http://www.mutationtaster.org/>)
- ❖ PolyPhen2 → (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)
- ❖ MutPred → (<http://mutpred.mutdb.org/>)
- ❖ 1000 Genome → (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/>)
- ❖ Splice Site Prediction → ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html))
- ❖ ExAC Browser → (<http://exac.broadinstitute.org/>)

\* by Life Technologies jetzt Thermo Fisher Scientific

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. DNA-Isolation aus EDTA-Blutproben

Die Isolierung der DNA aus den Blutproben der Patienten und der internen Referenzprobe erfolgte mit dem *QIAamp DNA Blood Mini Kit*. Im Wesentlichen wurde nach den Empfehlungen des Herstellers [43] gearbeitet. Jedoch wurden einige in-Haus etablierte Änderungen des Protokolls für diese Arbeit übernommen. Der genau umgesetzte Ablauf ist nachfolgend beschrieben.

Alle für die Zell-Lysis benötigten Puffer und das Qiagen Protease-Enzym stammten aus dem Kit und wurden, wie in der Anleitung beschrieben, hergestellt.

#### Vorbereitung AW1 und AW2 Puffer

- ❖ Zugabe von 130 mL Ethanol ( $\geq 99,8\%$ ) zum AW1 Puffer
- ❖ Zugabe von 160 mL Ethanol ( $\geq 99,8\%$ ) zum AW2 Puffer
- ❖ Lagerung der Puffer erfolgte bei Raumtemperatur (20-25°C)

#### Vorbereitung der Qiagen Protease

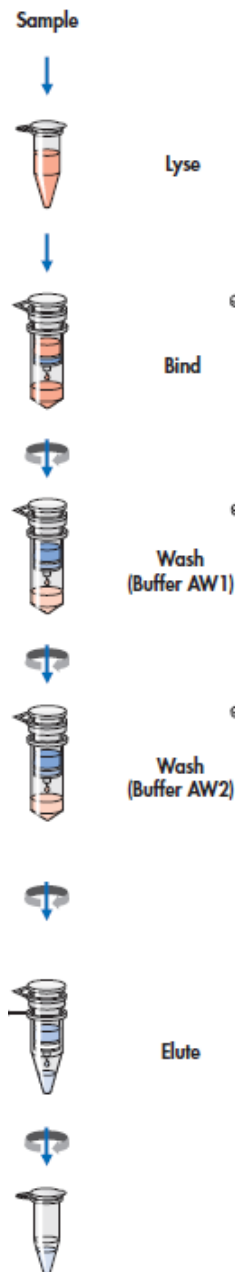
- ❖ Zugabe von 5,5 mL Protease Solvent zu der Qiagen Protease → gut auflösen
- ❖ Entnahme von Aliquots
- ❖ die aliquotierte Qiagen Protease wurde bei -20°C im Tiefkühlschrank gelagert

#### Isolierung der genomischen DNA

In ein 1,5 mL Reaktionsgefäß wurden die folgenden Komponenten pipettiert:

- ❖ → 20 µL Qiagen Protease-Arbeitslösung
- ❖ → 200 µL Lyse-Puffer (Puffer A<sub>L</sub>)
- ❖ → 200 µL EDTA-Blut (vorher gut durchmischen)
- ❖ der Ansatz wurde für ca. 15 sec durchmischt und anschließend unter leichtem Schütteln bei 56°C für 10 min im Heizblock inkubiert
- ❖ der Ansatz wurde danach kurz zentrifugiert (bis ca. 2.300 rcf) und anschließend wurden 200 µL Ethanol ( $\geq 99,8\%$ ) hinzupipettiert
- ❖ erneut wurde das Reaktionsgefäß für ca. 15 sec durchmischt
- ❖ die Probe wurde auf eine Säule pipettiert





- ❖ das Säulen-Tube wurde im nächsten Schritt für 1 min bei 5.900 rcf zentrifugiert und der Durchlauf verworfen
- ❖ die Säule wurde auf ein neues 2 mL Auffanggefäß gesetzt und 500  $\mu$ L AW1-Puffer auf den Filter pipettiert
- ❖ das Säulen-Tube wurde für 1 min bei 5.900 rcf zentrifugiert und der Durchlauf verworfen
- ❖ die Säule wurde anschließend auf ein neues 2 mL Collection-Tube gesetzt und 500  $\mu$ L AW2-Puffer auf den Filter pipettiert
- ❖ das Säulen-Tube wurde im nächsten Schritt für 3 min bei 16.100 rcf zentrifugiert und der Durchlauf erneut verworfen
- ❖ die Säule wurde auf ein gut beschriftetes 1,5 mL Reaktionsgefäß gesetzt
- ❖ auf den Filter der Säule wurden 200  $\mu$ L TE-Puffer (vorgewärmt auf 56°C im Heizblock) pipettiert
- ❖ die Probe wurde danach für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 1 min bei 5.900 rcf zentrifugiert  $\rightarrow$  die Säule wurde entsorgt
- ❖ die genomische DNA-Lösung befand sich im Reaktionsgefäß

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Isolierung von DNA aus EDTA-Blut [43]

Die genomische DNA der einzelnen Patienten wurde im Kühlschrank bei 2-10°C für einen längeren Zeitraum gelagert und jeweils weiter in der Polymerase Kettenreaktion für die Sanger-Sequenzierung, in der MLPA und dem NGS eingesetzt.

### 3.2.1.1. DNA-Konzentrationsmessung

Um die genaue DNA-Konzentration in den einzelnen Patientenproben zu bestimmen, wurde das *Qubit dsDNA HS Assay Kit* verwendet. Der Ansatz und die Messung der Proben erfolgten wie nachfolgend beschrieben:

- ❖ alle benötigten Reagenzien wurden auf Raumtemperatur gebracht und anschließend ein Mastermix (je Probe: 199  $\mu\text{L}$  Qubit dsDNA HS Puffer und 1  $\mu\text{L}$  Qubit dsDNA HS Reagent) für den gesamten Probenansatz erstellt
- ❖ bei jeder Messung wurde eine Standardkurve mit einer Probe bekannter DNA-Konzentration erstellt
- ❖ von jeder Patienten-DNA-Probe wurden je 2  $\mu\text{L}$  in ein Qubit assay tube pipettiert und 198  $\mu\text{L}$  des Mastermixes hinzugegeben
- ❖ alle Tubes wurden 2-3 sec gemischt und anschließend für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert
- ❖ die Messung der Proben erfolgte nach den Empfehlungen des Herstellers [52]; der Qubit berechnete die DNA-Konzentration in 1  $\mu\text{L}$  der Probe

### 3.2.2. Sanger-Sequenzierung

Die Sequenzierung nach Frederick Sanger wurde erstmals Mitte der 1970er Jahre beschrieben [39]. Im Laufe der Zeit wurde die Methode immer weiter optimiert und an technische Neuerungen (z.B. Fluoreszenzdetektion, Polymerase Kettenreaktion und Cycle-Sequencing) angepasst, sodass sie auch heute noch als der „Goldstandard“ für die DNA-Sequenzierung gilt. Aus der gesamten genomischen DNA werden zunächst die zu untersuchenden DNA-Bereiche durch Polymerase Kettenreaktion (Denaturierung, Annealing, Elongation) amplifiziert. Während der Sequenzierung konkurrieren die natürlichen Nukleotide mit den vier verschiedenen fluoreszenzfarbstoff-markierten Kettenabbruchnukleotiden (besitzen keine 3'-Hydroxylgruppe) um den Einbau in die fehlenden komplementären Stränge. Kommt es zum zufälligen Einbau eines Kettenabbruchnukleotides, bricht die Sequenzierung des entsprechenden DNA-Fragments an dieser Stelle ab. Es entstehen viele verschieden lange DNA-Fragmente, die statistisch die gesamte Sequenz des untersuchten Abschnittes repräsentieren und anschließend durch eine Elektrophorese z.B. in einem Kapillargelsystem aufgetrennt werden. Die detektierten Fluoreszenzfarbstoff-Signale werden als Elektropherogramm der Sequenz dargestellt [24, 44].

In dieser Arbeit sollten die Exons und die angrenzenden Intronbereiche der elf ausgewählten Gene auf mögliche Veränderungen bzw. Mutationen hin untersucht werden. Hierfür wurden die Exons zunächst mithilfe der drei Schritte der Polymerase Kettenreaktion – Denaturierung des DNA-Doppelstranges, Annealing der jeweiligen Primer und Elongation des jeweiligen komplementären DNA-Stranges – amplifiziert und anschließend mittels der Sanger-Sequenzierung sequenziert.

### 3.2.2.1. Primer Design

Die PCR- und Sequenzierprimer zur Amplifizierung und Sequenzierung aller Exons der Gene *NF1*, *RET*, *SDHB*, *SDHD*, *SDHC*, *SDHAF2*, *TMEM127* und *VHL* wurden aus etablierten Assays von Bioglobe übernommen. Das Primer Design zur Analyse der Gene *KIF1B*, *MAX* und *SDHA* erfolgte mit dem Primer-Design-Tool der DNA Workbench. Die *in silico* Kontrolle der Primer- und Produktspezifität erfolgte mit der webbasierten AssayDesign Suite „MySequenom“ (jetzt AgenaCX, [www.agenacx.com](http://www.agenacx.com)) und dem Primer-BLAST-Tool von NCBI (National Center for Biotechnology Information) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Das Primer-Design-Tool der DNA Workbench gab für jedes Exon mehrere geeignete Primerbereiche an, aus denen die Primersequenzen für ein Primerpaar ausgewählt wurden.

Alternativ wurden geeignete Primerpaare mit der AssayDesign Suite von AgenaCX ausgewählt. Dabei erfolgte im ersten Schritt die Maskierung/ Blockierung von SNPs in der ausgewählten Targetregion, um dort die Platzierung von Primern und einen resultierenden Allel-Drop-Out zu verhindern.

Als *in silico* Kontrolle der Spezifität der Primerpaare überprüfte das Primer-BLAST-Tool von NCBI die Primer auf weitere Bindungsorte im gesamten Genom und auf die Bildung von Nebenprodukten. Insbesondere wurden die Ergebnisse auf Nebenprodukte mit ähnlicher Größe wie das gewünschte Produkt und eine Bindung der Primer an möglicherweise vorhandene Pseudogene überprüft. Bei nicht ausreichender Spezifität eines Primerpaares wurde ein neues Primerpaar designed.

Grundsätzlich wurden bei den verwendeten Tools die Standardeinstellungen verwendet, welche denen aus den etablierten Assays entsprachen. Bei der AssayDesign Suite wurde die Einstellung für die Amplikonlänge von 120 bp auf maximal 900 bp geändert, um den Gegebenheiten bei der Sanger-Sequenzierung besser zu entsprechen.

Die ausgewählten *in silico* Primer wurden in der PCR und der Sequenzreaktion auf ihre Funktionalität überprüft. Die in den Experimenten eingesetzten Primer sind in den Tabellen A1-A11 im Anhang dargestellt.

### 3.2.2.2. Polymerase-Kettenreaktion

Für den gesamten PCR-Ansatz wurde, entsprechend der Anzahl an Reaktionen, ein Mastermix für alle zu amplifizierenden Exons aus den Patientenproben erstellt.

#### PCR-Mastermix (Gesamtvolumen pro Reaktion = 25 $\mu$ L)

❖ 10× PCR Puffer	2,5 $\mu$ L
❖ dNTPs (1,25 mM)	4 $\mu$ L
❖ MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5 $\mu$ L
❖ Q-Solution (5x)	5 $\mu$ L
❖ HotStarTaq (5 Units/ $\mu$ L)	0,25 $\mu$ L
❖ Reinstwasser	7,75 $\mu$ L oder 6,5 $\mu$ L bei Zugabe von DMSO
❖ (DMSO)	(1,25 $\mu$ L → wenn benötigt → „Touch Down“ Profil)
	21 $\mu$ L + 1 $\mu$ L Primer forward (10 pmol/ $\mu$ L)
	+ 1 $\mu$ L Primer reverse (10 pmol/ $\mu$ L)
	+ 2 $\mu$ L der jeweiligen Patienten-DNA

Jeweils 21  $\mu$ L des Mastermixes wurden auf die einzelnen Wells einer Mikrotiterplatte verteilt und anschließend der forward und der reverse Primer sowie die jeweilige Patienten-DNA hinzugegeben. Nachdem alle Einzelreaktionen auf der Mikrotiterplatte zusammengestellt waren, wurden diese mit PCR-Klebefolien verschlossen und danach kurz zentrifugiert, um alle Komponenten am Boden der Wells zusammen zu führen. Zur Amplifikation der Zielsequenzen wurden entsprechende Temperaturprofile in den PCR-Cyclern durchlaufen. Im Folgenden sind die Profile (PCR-Programme) aufgelistet und erläutert.

#### Basis Temperatur-Profil

❖ Denaturierung:	95°C für 15 min	} 35 Zyklen
❖ Denaturierung:	96°C für 1 min	
❖ Annealing:*	63°C für 1 min	
❖ Elongation:	72°C für 1 min 30 sec	
❖ Elongation:	72°C für 10 min	
❖ Kühlung:	10°C	

\*Die Annealingtemperatur wurde nach Bedarf an die jeweils verwendeten Primer angepasst (Tabellen A1-A11 im Abschnitt Anhang).

Programm zur Amplifizierung von GC-reichen Sequenzabschnitten

Zur Amplifizierung und Sequenzierung von Abschnitten mit einer Basenzusammensetzung von mehr als 50% „G“ und „C“ wurde ein spezielles „Touch Down“ Profil angewandt und DMSO in den PCR-Mastermix hinzugegeben. DMSO verhindert die Ausbildung von Sekundärstrukturen der DNA und verbessert somit die Amplifikation von Template-DNA mit hohem GC-Gehalt.

- |                  |                    |  |
|------------------|--------------------|--|
| ❖ Denaturierung: | 95°C für 15 min    | } <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">3 Zyklen</span> |
| ❖ Denaturierung: | 95°C für 30 sec    |  |
| ❖ Annealing:*    | 70-58°C für 30 sec |  |
| ❖ Elongation:    | 72°C für 45 sec    |  |
| ❖ Elongation:    | 72°C für 5 min     |  |
| ❖ Kühlung:       | 10°C               |  |

\* Die jeweilige Annealingtemperatur z.B. 70°C wurde in drei aufeinander folgenden Zyklen durchlaufen, dann um 1°C gesenkt und erneut in drei aufeinander folgenden Zyklen durchlaufen. Somit wurden die Annealingtemperaturen von 70°C bis auf 58°C in insgesamt 39 Zyklen durchlaufen.

Die Lagerung der PCR-Produkte erfolgte für kurze Zeit im Kühlschrank bei 4°C oder für einen längeren Zeitraum bei -20°C im Tiefkühlschrank. Die Reaktionsprodukte wurden anschließend stichprobenartig mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert oder manuell bzw. mit dem Biomek NX Pipettierautomaten aufgereinigt.

**3.2.2.3. Analyse von PCR-Produkten mittels Agarose-Gelelektrophorese**

Die Überprüfung der PCR-Produkte erfolgte in einem 2%igen Agarose-Gel in 0,5×TBE-Puffer. Der 0,5×TBE-Puffer wurde aus einer 10×TBE-Stammlösung 1:20 verdünnt.

10×TBE-Stammlösung

- ❖ 108 g TRIS
- ❖ 55,6 g Borsäure
- ❖ 7,45 g EDTA

Die Chemikalien wurden in 1 Liter Reinstwasser gelöst. Der pH-Wert betrug 8,3.

Die Herstellung eines 2%igen Agarose-Gels für eine horizontale Gelelektrophorese in einer mittleren Gelkammer erfolgte wie nachfolgend beschrieben. Die Bedingungen und Mengenangaben für alle weiteren Gelkammergrößen können der Tabelle 13 entnommen werden.

- ❖ 2 g Agarose wurden in 100 mL 0,5×TBE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle aufgeköcht → anschließendes Abkühlen bei Raumtemperatur
- ❖ Zugabe von 3,8 µL Ethidiumbromid oder peqGREEN
- ❖ gießen des Gels in die Gelkammer und Einsetzen des Gel-Kammes
- ❖ nach dem Aushärten wurde das Gel mit 0,5×TBE-Puffer überschichtet und die Proben in die Taschen des Gels aufgetragen
- ❖ durch das Anlegen einer Spannung wurde ein elektrisches Feld erzeugt und die einzelnen DNA-Fragmente entsprechend ihrer Länge aufgetrennt

Tabelle 13: Mengen- Spannungs- und Laufzeitlängenangaben in Abhängigkeit von der Größe der Gelkammer für 2%ige Agarose-Gele

<b>Gelkammer/ Trennstrecke</b>	<b>Agarose [g]</b>	<b>Elektrophorese -puffer [mL]</b>	<b>Spannung [V]</b>	<b>Trennzeit [min]</b>	<b>Ethidiumbromid [µL]</b>
<b>klein/ 3 cm</b>	1	50	90	30-50	2
<b>mittel/ 3,5 cm</b>	2	100	140	50	4
<b>groß/ 4,5 cm</b>	6	300	200	50	12

Die PCR-Proben wurden wie folgt in die einzelnen Taschen des Gels aufgetragen:

- ❖ 3 µL Marker (GeneRuler Low Range DNA Ladder oder FastRuler High Range DNA Ladder)
- ❖ 3 µL PCR-Produkt + 1 µL Loading buffer DNA II oder 6X DNA Loading Dye

Die DNA wurde durch die Zugabe von Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,4 µg/ml im Agarosegel) angefärbt und unter einem UV-Transilluminator ausgewertet. Die Dokumentation erfolgte elektronisch als jpg-Datei.

Ansatz des GeneRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Scientific)

- ❖ der Marker wurde für die Gelelektrophorese 1:5 verdünnt
- ❖ dafür wurden 100 µL Marker mit 100 µL Loading Dye, 300 µL Reinstwasser verdünnt

#### 3.2.2.4. Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden manuell oder mit dem Biomek NX Pipettierautomaten für die anschließende Sequenzreaktion, mit Hilfe von Agencourt AMPure Magnetpartikeln aufgereinigt. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte nach Herstellerangaben [45] von Beckman Coulter. Jedoch wurden einige in-Haus etablierte Änderungen des Protokolls für diese Arbeit übernommen. Der genau umgesetzte Ablauf ist nachfolgend beschrieben.

- ❖ die PCR-Produkte wurden jeweils in eine 96well-Mikrotiterplatte überführt und gut resuspendiertes Agencourt AMPure XP im entsprechenden Verhältnis zu den einzelnen Proben pipettiert (z.B. PCR = 25  $\mu$ L  $\rightarrow$  AMPure = 45  $\mu$ L)
- ❖ die Magnetpartikel und die PCR-Produkte wurden gut resuspendiert und der gesamte Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert
- ❖ die Platte wurde anschließend auf eine Agencourt SPRIPlate 96 Super Magnet Plate gestellt und dort für 3 min inkubiert, um die Magnetpartikel an der Gefäßwand zu sammeln
- ❖ die klare Lösung wurde abpipettiert und verworfen (Magnetpartikel mit gebundener Probe blieben an der Wand haften) (s. Abbildung 5)
- ❖ zu jeder Probe wurden 100  $\mu$ L 70%iges Ethanol hinzupipettiert und diese für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert, um Salze, Puffer, Enzyme und Nukleotide zu entfernen
- ❖ der Ethanol-Überstand wurde abgenommen und verworfen
- ❖ erneut wurden 100  $\mu$ L 70%iges Ethanol zu den Proben pipettiert und diese für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert
- ❖ der Ethanol-Überstand wurde vollständig abgenommen und verworfen
- ❖ die Mikrotiterplatte wurde von der Magnetplatte genommen und die Proben für 5-10 min bei Raumtemperatur getrocknet, um Ethanolreste vollständig zu entfernen
- ❖ die Proben wurden mit 40  $\mu$ L Reinstwasser resuspendiert
- ❖ die Platte wurde erneut auf die Agencourt-Magnetplatte gestellt und dort für 3 min inkubiert
- ❖ 35  $\mu$ L der Lösung wurden in eine neue 96well-Mikrotiterplatte überführt

Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden entweder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  im Tiefkühlschrank gelagert oder sofort weiter in der Sequenzierung eingesetzt.

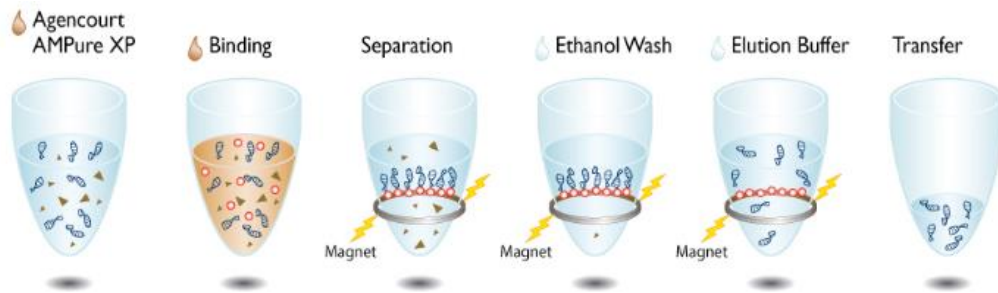


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem Agencourt AMPure XP. Abweichend wurde als „Elutionspuffer“ Reinstwasser verwendet [45].

### 3.2.2.5. Sequenzierung

Für die gesamten Sequenzierungsreaktionen wurde entsprechend der Anzahl an Reaktionen ein Mastermix für alle Proben erstellt. Die Sequenzierprimer wurden auf eine Arbeitskonzentration von 2,5 pmol/μL aus der Stammlösung mit Reinstwasser verdünnt.

#### Sequenzreaktion-Mastermix (Gesamtvolumen pro Reaktion = 9,5-15 μL)

- ❖ Nukleotidmix (BigDye) 1 μL
- ❖ 10 x Reaktionspuffer 1,5 μL
- ❖ Reinstwasser 8 μL\*<sup>1</sup> oder 7 μL\*<sup>1</sup> bei Zugabe von DMSO
- ❖ (DMSO) (1 μL → wenn benötigt)  
10,5 μL → 6 μL + 2 μL Primer (2,5 pmol/μL)  
+ X μL\*<sup>2</sup> des jeweiligen PCR-Produkts

\*<sup>1</sup> die Menge an zugegebenem Reinstwasser variiert je nach eingesetzter Menge an PCR-Produkt!

\*<sup>2</sup> zwischen 1,5 μL – 7 μL konnten vom PCR-Produkt eingesetzt werden

Jeweils 6 μL des Mastermixes wurden auf die einzelnen Wells einer Mikrotiterplatte verteilt und anschließend der Sequenzierprimer sowie das jeweilige PCR-Produkt hinzugegeben. Nachdem alle Einzelreaktionen auf der Mikrotiterplatte zusammengestellt waren, wurde diese mit PCR-Klebefolie verschlossen und danach kurz zentrifugiert, um alle Komponenten am Boden der Wells zusammen zu führen. Für die Sequenzreaktion wurde das nachfolgend beschriebene Temperaturprofil im PCR-Cycler durchlaufen.



Basis Temperatur-Profil

❖ Denaturierung:	96°C für 1 min	} 25 Zyklen
❖ Denaturierung:	96°C für 10 sec	
❖ Annealing:	55°C für 5 sec	
❖ Elongation:	60°C für 4 min	
❖ Kühlung:	10°C	

Die Proben konnten für einen längeren Zeitraum bei -20°C oder für kürzere Zeit bei 4°C gelagert werden.

**3.2.2.6. Aufreinigung der Sequenzreaktions-Produkte**

Die Sequenzreaktions-Produkte wurden manuell [46] oder mit dem Biomek NX Pipettierautomaten für die anschließende Kapillarelektrophorese, mit Hilfe von Agencourt CleanSEQ Magnetpartikeln aufgereinigt. Die Aufreinigung der Sequenz-Produkte erfolgte nach Herstellerangaben [46] von Beckman Coulter. Jedoch wurden einige in-Haus etablierte Änderungen des Protokolls für diese Arbeit übernommen. Der genau umgesetzte Ablauf ist nachfolgend beschrieben.

- ❖ die Sequenzreaktions-Produkte wurden jeweils in eine 96well-Mikrotiterplatte überführt und 10 µL gut resuspendiertes Agencourt CleanSEQ sowie 52 µL 85%iges Ethanol zu den einzelnen Proben pipettiert
- ❖ die Lösung wurde gut resuspendiert
- ❖ die Platte wurde auf eine Agencourt SPRIPlate 96 Super Magnet Plate gestellt und dort für 3-5 min inkubiert, um die Magnetpartikel an der Gefäßwand zu sammeln
- ❖ die klare Lösung wurde abgenommen und verworfen (Magnetpartikel mit gebundener Probe blieben an der Wand haften)
- ❖ zu jeder Probe wurden 100 µL 85%iges Ethanol hinzupipettiert und für 30 sec bei Raumtemperatur inkubiert, um Salze, Puffer, Enzyme und Nukleotide zu entfernen
- ❖ der Ethanol-Überstand wurde abgenommen und verworfen
- ❖ erneut wurden 100 µL 85%iges Ethanol zu den Proben pipettiert und diese für 30 sec bei Raumtemperatur inkubiert
- ❖ der Ethanol-Überstand wurde vollständig abgenommen und verworfen
- ❖ die Mikrotiterplatte wurde von der Magnetplatte genommen und für 10 min bei Raumtemperatur getrocknet, um Ethanolreste vollständig zu entfernen

- ❖ die Proben wurden mit 40  $\mu\text{L}$  Reinstwasser resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert
- ❖ die Mikrotiterplatte wurde erneut auf die Agencourt-Magnetplatte gestellt und dort für 3-5 min inkubiert
- ❖ 35  $\mu\text{L}$  der Lösung wurden in eine neue 96well-Mikrotiterplatte überführt

Die aufgereinigten Sequenzreaktions-Produkte wurden entweder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  im Tiefkühlschrank gelagert oder ein Teilvolumen (8  $\mu\text{L}$  zusammen mit 8  $\mu\text{L}$  Hi-Di Formamide) sofort weiter in der Kapillarelektrophorese eingesetzt.

### **3.2.2.7. Kapillarelektrophorese am 3500xL Genetic Analyzer**

Der für die Sequenzierung der Proben verwendete Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer (ABI) von Life Technologies ist ein DNA-Analyse System, welches auf Auswertung von Fluoreszenzsignalen basiert. Für die Kapillarelektrophorese wurde ein 24 Kapillarsystem mit einem 50 cm Kapillar Array verwendet.

Die Proben wurden dabei zu Beginn des Verfahrens über eine kurze, niedrige elektrische Spannung in die einzelnen Kapillaren aufgenommen. Dann wurden die verschiedenen Nukleinsäurefragmente der Probe nach dem Prinzip der Elektrophorese in einer Polymermatrix (POP-7) auf Basis ihrer Länge/ Größe durch Anlegen einer hohen Spannung getrennt. Die Laufzeit für eine Injektion betrug ca. 2 h 17 min. Die Kapillaren wurden auf  $60^{\circ}\text{C}$  temperiert und ermöglichten so eine gleichbleibend gute Denaturierung der DNA in Einzelstränge während der gesamten Analyse. Die vier verschiedenen Abbruchnukleotide, die in der Sequenzreaktion hinzugegeben wurden, waren jeweils mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, welcher während der Kapillarelektrophorese durch einen Laser angeregt wurde. Die Software erstellte aus diesen Fluoreszenzsignalen sowie deren Position im Trennungspolymere ein Elektropherogramm für jeden einzelnen Fluoreszenzfarbstoff. Durch anschließendes Basecalling (Zuweisung von einzelnen Basen zu Chromatogrammpeaks) wurden die Daten für die folgende Sequenzauswertung vorbereitet.

### **3.2.2.8. Datenanalyse**

Die Analyse der für die Proben ermittelten Sequenzdaten erfolgte mit den Programmen Sequencher und DNA Workbench. Dazu wurden die primären Sequenzdaten mit denen aus der NCBI-Datenbank entnommenen Referenzsequenzen (s. Material, Tabelle 12) durch so genanntes Alignment verglichen. Abweichungen in der experimentellen Sequenz wurden von den Softwaretools markiert. Die Sequenzdarstellung der Programme erlaubte ebenfalls eine Bestimmung des Genotyps (homozygot oder heterozygot) an der entsprechenden Position.

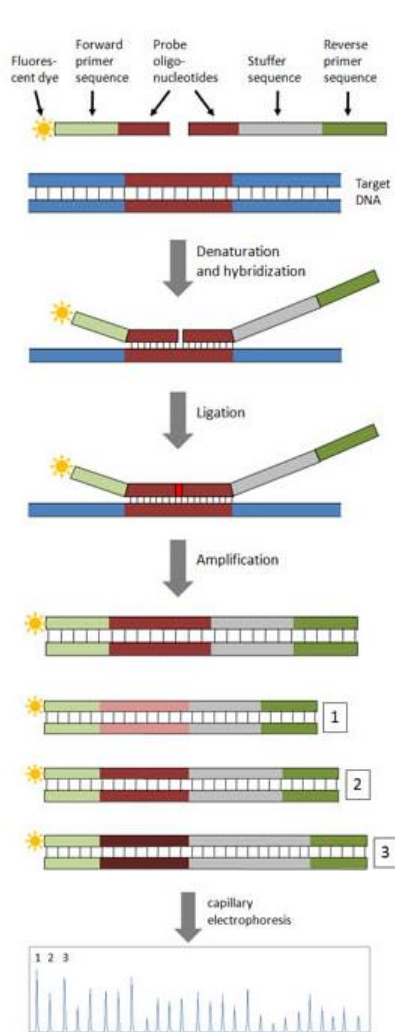
Alle nachgewiesenen Varianten oder Mutationen wurden durch verschiedene Datenbankanalysen näher untersucht.

Bei allen Auswerteprogrammen wurden die Standardeinstellungen verwendet.

### 3.2.3. MLPA

Bei der multiplexen ligationsabhängigen Sondenamplifikation (MLPA) handelt es sich um ein von der Firma MRC Holland [40] entwickeltes Multiplex-PCR-Verfahren zum Nachweis von relativen Änderungen der Kopienzahl einer Target-DNA-Sequenz.

Diese Methode kann als eine Ergänzung der Sanger-Sequenzierung angesehen werden. Während mit der Sanger-Sequenzierung Punktmutationen sowie kleine Deletionen nachweisbar sind, lassen sich mit der MLPA Deletionen und Duplikationen ganzer Exons oder einzelner Genbereiche detektieren. Sondenpaare dienen hierbei als Marker, mit denen Sequenzbereiche untersucht werden. Diese Ergebnisse werden repräsentativ auf das ganze Gen/ Exon bezogen.



Jeweils paarweise benachbarte Sonden werden an die Zielsequenz hybridisiert und durch eine Ligrationsreaktion zu einem mittels PCR amplifizierbaren Molekül verbunden. Die PCR erfolgt mit universellen Primern, deren komplementäre Sequenzen sich als Tag am genspezifischen Teil der Sonde befinden. Bei einer Deletion, Insertion oder einem Polymorphismus in der Zielregion ist eine Hybridisierung des Sondenpaares nicht möglich.

Eine Sonde eines Sondenpaares enthält jeweils eine Fluoreszenzmarkierung und meist eine eingefügte Stuffer-Sequenz. Diese Stuffer-Sequenzen variieren in ihrer Länge und ermöglichen eine größenspezifische Auftrennung der einzelnen Fragmente mittels Kapillarelektrophorese. Die Fluoreszenzmarkierung dient der Visualisierung der Ergebnisse in der Kapillarelektrophorese (s. Abbildung 6) [40].

Abbildung 6: Schematische Darstellung des Prinzips der MLPA Methode [55] (nähere Erläuterungen s. Text)

Bildquelle:

<http://www.applied-maths.com/applications/multiplex-ligation-dependent-probe-amplification-mlpa-analysis>;  
Zugriff am 12.11.2015

Es wurden fünf verschiedene Sondenmixe der Firma MRC Holland verwendet (*VHL*, *NF1* Probenmix 1, *NF1* Probenmix 2, *SDHA-MAX* und *SDH*) sowie das *EK5 – FAM MLPA reagents Kit*. Neben den genspezifischen Sonden für jedes Exon enthalten die Sondenmixe artifizielle Kontrollfragmete „Q“ und „D“ zur Abschätzung der DNA-Quantität und Überprüfung der Denaturierungseffizienz. Außerdem sind weitere auf dem Genom verteilte Referenzsonden sowie geschlechtsspezifische Marker enthalten.

Die Durchführung der MLPA erfolgte nach dem „MLPA General Protocol“ [47] der Firma MRC Holland. Der in dieser Arbeit angewandte Ablauf ist nachfolgend beschrieben.

### **3.2.3.1. DNA Denaturierung**

Je 5 µL der jeweiligen Patienten-DNA sowie 5 µL Kontroll-DNA wurden in eine 96well-Mikrotiterplatte pipettiert und in einem Thermocycler bei 98°C für 5 min denaturiert. Danach wurde mit höchster Kühlrate gekühlt. Beim Erreichen einer Blocktemperatur im Thermocycler von 25°C wurde die 96well-Mikrotiterplatte direkt auf Eis gestellt.

### **3.2.3.2. Hybridisierung der Sondenmix spezifischen Sonden**

Die benötigte Menge des Arbeits-Hybridisierungsmixes wurde durch Mischen von gleichen Volumenanteilen SALSA MLPA Puffer und des entsprechenden Sondenmixes hergestellt. Für jede Reaktion wurden 1,5 µL SALSA MLPA Puffer und 1,5 µL genspezifischer Sondenmix angesetzt.

Je 3 µL des jeweiligen Hybridisierungs-Sondenmixes wurden möglichst schnell zu der jeweiligen Patienten-DNA und der Kontroll-DNA pipettiert. Der Arbeitsschritt erfolgte auf Eis. Nach einem Denaturierungsschritt von 1 min bei 95°C erfolgte die Hybridisierung bei 60°C für 16-20 h (über Nacht) in einem Thermocycler.

### **3.2.3.3. Ligation der Sonden**

Der Mastermix für die Ligation der Sonden wurde universell vorbereitet und bestand aus den folgenden Komponenten:

#### Ligation-Mastermix (Endvolumen pro Reaktion = 32 µL)

- ❖ Reinstwasser            25 µL
- ❖ Ligase Puffer A        3 µL
- ❖ Ligase Puffer B        3 µL
- ❖ SALSA Ligase-65      1 µL

Die Ligationsreaktion erfolgte für 20 min bei 54°C im Thermocycler. Für die Inaktivierung der Ligase wurden die Proben im nächsten Schritt für 5 min bei 98°C denaturiert. Die Proben wurden anschließend im Thermocyclerblock auf eine Temperatur von 20°C gekühlt.

### 3.2.3.4. Amplifikation

Der Mastermix für die Amplifikation der Ligationsprodukte mittels PCR wurde universell vorbereitet und bestand aus den folgenden Komponenten:

#### PCR-Mastermix (Endvolumen pro Reaktion = 10 µL)

❖ SALSA PCR Primer Mix FAM	2 µL
❖ Reinstwasser	7,5 µL
❖ SALSA Polymerase	0,5 µL

Bei Raumtemperatur wurden 10 µL des PCR-Mastermixes zu den jeweiligen Proben pipettiert. Nach sorgfältigem Verschließen der 96well-Mikrotiterplatte wurde die PCR nach folgendem Temperatur-Regime durchgeführt:

#### Temperatur Profil

❖ Denaturierung:	95°C für 30 sec	} 35 Zyklen
❖ Annealing:	60°C für 30 sec	
❖ Elongation:	72°C für 1 min	
❖ Elongation:	72°C für 20 min	
❖ Hold:	15°C für ∞	

### 3.2.3.5. Analyse der MLPA-Reaktionsprodukte mittels Kapillarelektrophorese und Datenauswertung

Zur Analyse der MLPA-Reaktionsprodukte wurde jeweils 1 µL des PCR-Produktes mit 9,25 µL HI-DI-Formamid und 0,25 µL des Längenstandards Gene-Scan 500 ROX zur Grundkalibrierung im Bereich zwischen 35 und 500 Basenpaaren gemischt. Diese Mischung wurde bei 86°C für 3 min denaturiert und danach auf Eis abgekühlt. Eventuell auftretendes Kondensat an der Gefäßwand wurde durch kurzes Zentrifugieren wieder mit der Mischung vereinigt. Danach wurde die Kapillarelektrophorese direkt durchgeführt. Die analytischen Bedingungen sind im Abschnitt 3.2.2.7. der Sanger-Sequenzierung beschrieben.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software GeneMarker v.1.75. Die Erstellung der so genannten Panels und der „Binning-Bereiche“ erfolgte auf Basis der beobachteten Signalmuster einer Referenzprobe unter Berücksichtigung der Grundkalibrierung über den mitgeführten Längenstandard. Die semiquantitative Analyse der Signalintensitäten zur Ermittlung der relativen Kopienzahl der Targetabschnitte erfolgte mit den Hersteller-Grundeinstellungen der Software. Die eingestellten Grenzwerte lagen bei 75% für eine Deletion und bei 130% für eine Duplikation. Die Beurteilung der allgemeinen Datenqualität erfolgte manuell nach den Herstellervorgaben der Sondenmixe über die in jedem Sondenmix enthaltenen so genannten Q- und D-Fragmente.

### 3.2.4. Next Generation Sequencing

Im Jahr 2005 brach eine neue Ära in der molekularen DNA-Diagnostik an, als in der Zeitschrift Nature eine Veröffentlichung über eine neue Sequenzierungsmethode beschrieben wurde [48].

Der Begriff Next Generation Sequencing umfasst alle bekannten NGS-Plattformen (Illumina und Ion Torrent). Während die drei Grundschriffe Library-Preparation, Template Preparation und Sequenzierung allen NGS-Plattformen zugrunde liegen, unterscheiden sie sich in der jeweils dahinterstehenden Technologie.

In dieser Arbeit wurde sich auf das verwendete Gerätesystem des Ion PGM (Personal Genome Machine) der Ion Torrent-Plattform konzentriert.

Die Ion Torrent Technologie ist eine post-light-Sequenzieretechnologie und verwendet im Gegensatz zu allen anderen NGS-Plattformen und anderen herkömmlichen Sequenziergeräten keine fluoreszenzfarbstoff-markierten Nukleotide für die Sequenzierung, sondern detektiert die Reihenfolge der Nukleotide in der Sequenz über gemessene pH-Wert-Veränderungen.

#### Library Preparation

Da die Länge der DNA-Moleküle für die Analyse mit dem Ion PGM zurzeit noch auf ca. 200 bp begrenzt ist, wurde die gesamte genomische DNA oder die zu untersuchenden Zielregionen zunächst in ca. 200 bp lange Fragmente geteilt. Diese Fragmentierung konnte entweder enzymatisch, mechanisch oder durch eine geeignete Primerwahl erfolgen.

Die Amplifizierung der 200 bp Fragmente erfolgte durch eine spezielle Polymerase Kettenreaktion (AmpliSeq-PCR). Als Modifikation wurden anschließend die PCR-Primersequenzen abverdaut, zwei verschiedene Adapter an die Enden der DNA-Fragmente ligiert und eine Barcodesequenz je Patient eingefügt.

Als Kontrollschritt für die genaue Bestimmung der Ausbeute an modifizierten DNA-Fragmenten je Patient (Library), diente die Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) [49, 50].



### Template Preparation

Die Template Preparation bestand aus einer klonalen Amplifikation der einzelnen DNA-Fragmente der Libraries. Während der Emulsions-PCR für die klonale Amplifikation, bildeten sich in einer vorliegenden Wasser-Öl-Emulsion kleine Wassertröpfchen im Öl. Diese Wassertröpfchen dienten als Mikroreaktoren, in denen die eigentliche PCR an der Oberfläche von Beads stattfand. Idealerweise enthielt ein solcher Mikroreaktor einen Bead und ein DNA-Fragment (monoklonale Amplifikation). In Mikroreaktoren, die ein Bead und mehrere DNA-Fragmente enthielten, erfolgte eine polyklonale Amplifikation, welche in der Sequenzierung nicht auswertbar war. Nach der klonalen Amplifikation erfolgte eine Qualitätsbewertung durch eine Fluoreszenzmessung.

### Post-light-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte auf einem Halbleiterchip im Ion PGM. Die Oberfläche des Chips bestand aus mehreren tausend bis mehreren Millionen Vertiefungen, die alle einzeln als winzige pH-Meter während der Sequenzreaktion fungierten. Im Idealfall belegte jeder Bead mit monoklonal oder polyklonal gebundenen DNA-Fragmenten eine Vertiefung. Der Chip wurde während der kompletten Sequenzierung nacheinander jeweils mit einem der vier verschiedenen Nukleotiden geflutet. Erfolgte eine enzymatische Verlängerung des DNA-Stranges um ein Nukleotid, wurde ein Proton freigesetzt und löste eine pH-Wert-Veränderung aus. Diese pH-Wert-Änderung wurde durch eine spezielle Sensorschicht am Boden der Vertiefung gemessen und in ein Spannungssignal umgewandelt.

Eine spezielle Keysequenz (Teil eines der beiden Adaptoren) stellte eine interne Kontrolle über die Signalstärke bei der enzymatischen Verlängerung des DNA-Stranges um ein Nukleotid dar und diente gleichzeitig als Kalibration des Ion PGM für die Messungen der pH-Wert-Änderungen.

Durch die massive parallele Sequenzierung, nicht nur von mehreren Patienten gleichzeitig, sondern auch von jedem einzelnen DNA-Fragment, entstand eine enorme Datenmenge, die im Anschluss an die Sequenzierung ausgewertet werden musste [49].

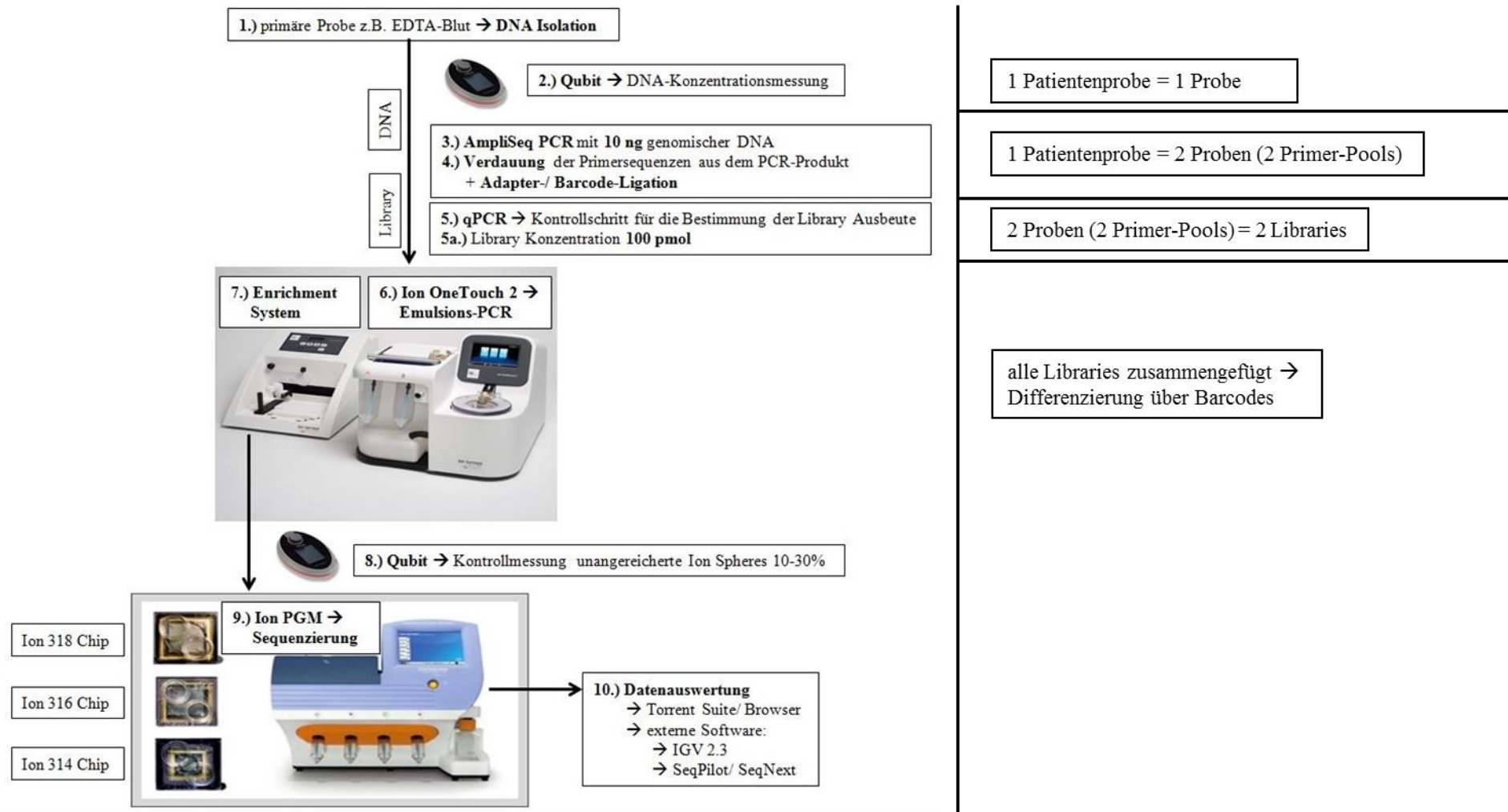


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Next Generation Sequencing Prozesses

Bildquellen: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/prodImages/high/Ion%20OneTouch%202%20System.jpg>,  
<http://genexp.ibt.cas.cz/foto/Qubit.gif>; <http://www.strand-ngs.com/files/images/partners/lifetech/lifetech-0-machines-small.jpg>; Zugriff am 25.06.2016

### 3.2.4.1. Primer-Pool Phäochromozytom

Das *in silico* Assay-Design für das Primer-Panel „Phäochromozytom“ erfolgte mit dem Programm Ion AmpliSeq Designer ([www.ampliseq.com](http://www.ampliseq.com)) für alle kodierenden Bereiche der Gene *KIF1B*, *MAX*, *NF1*, *RET*, *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHAF2*, *TMEM127* und *VHL*. Für eine Design Optimierung konnten verschiedene *in silico* Primer-Panels berechnet werden. Um die kodierenden Gen-Bereiche möglichst vollständig analysieren zu können, wurde die Einstellung des Exonpadding (Anzahl der nicht-kodierenden Basen, die mit den Primern im Exon flankierenden Bereich eingeschlossen werden sollten) variiert.

Mit dem Integrativ Genetic Viewer 2.3 (IGV 2.3) wurden die einzelnen Design-Varianten bezüglich der zu analysierenden Genbereiche gegen die Referenzsequenz Human Genome Version 19 (hg19) überprüft.

Exons, die durch das Primer-Panel „Phäochromozytom“ nicht vollständig analysiert werden konnten, mussten mit der Sanger-Sequenzierung untersucht werden.

Die einzelnen Primer wurden zu Pools für ein sehr hohes Multiplexing vereint.

Die Tabelle 14 zeigt die allgemeinen Charakteristika des zur Analyse ausgewählten *in silico* Designs. Die detaillierten Angaben zu Primersequenzen, Amplikonbezeichnung, Primer-Pool, Exonpadding und Produktgröße sind im Anhang in den Tabellen A12-A22 dargestellt.

Tabelle 14: Charakteristika des Primer-Panels „Phäochromozytom“

enthaltene Gene	<i>KIF1B</i> , <i>MAX</i> , <i>NF1</i> , <i>RET</i> , <i>SDHA</i> , <i>SDHB</i> , <i>SDHC</i> , <i>SDHD</i> , <i>SDHAF2</i> , <i>TMEM127</i> und <i>VHL</i>
Coverage	98,99 %
Exonpadding	10 bp
Panel Größe	46,48 kb
Amplikon Reichweite	125-275 bp
zweifacher Primer-Pool	Pool 1: 137 Amplikons; Pool 2: 132 Amplikons

Die gesamte Probenvorbereitung sowie die durchgeführten Analysen mit dem PGM erfolgten nach den angepassten Vorgaben der Firma Life Technologies [49].

### 3.2.4.2. AmpliSeq-PCR

Die Patienten-DNA wurde für die AmpliSeq-PCR auf eine Konzentration von 5 ng/ $\mu$ L verdünnt und 2  $\mu$ L (10 ng) in der AmpliSeq-PCR eingesetzt.

Die Primer des Panels „Phäochromozytom“ verteilten sich auf zwei Tubes (Pool 1 und 2). Entsprechend der Probenanzahl wurden zwei PCR-Mastermixe (für Primer-Pool 1 bzw. 2) entsprechend der folgenden Übersicht auf Eis vorbereitet.

#### AmpliSeq Mastermix (Endvolumen pro Reaktion = 18 $\mu$ L)

❖ 5x Ion AmpliSeq HiFi Master Mix	4 $\mu$ L
❖ 2x Ion AmpliSeq Primer-Pool 1 bzw. 2	10 $\mu$ L
❖ nuklease-freies Wasser	4 $\mu$ L
	18 $\mu$ L + 2 $\mu$ L der jeweiligen genomischen DNA

Die AmpliSeq-PCR Proben wurden gut gemischt und anschließend in den Thermocycler gestellt.

#### Temperatur Profil

❖ Enzymaktivierung:	99°C für 2 min	} <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">21 Zyklen*</span>
❖ Denaturierung:	99°C für 15 sec	
❖ Annealing und Elongation:	60°C für 4 min	
❖ Hold:	10°C für $\infty$	

Im Rahmen der Optimierung wurde neben 21 Amplifikationszyklen auch mit 18 Zyklen gearbeitet.

Die PCR-Produkte konnten bei 10°C über Nacht im Kühlschrank gelagert oder für einen längeren Zeitraum bei -20°C eingefroren werden.

#### 3.2.4.2.1. Verdauung der Primer-Anteile

Durch die Zugabe von 2  $\mu$ L *FuPa* (Exonuklease) zu den PCR-Produkten, wurden die experimentell nicht-informativen Primer-Anteile entfernt.

Die Ansätze wurden gut gemischt und die Proben anschließend in den Thermocycler gestellt.

Temperatur Profil

- ❖ Inkubation 1: 50°C für 10 min
- ❖ Inkubation 2: 55°C für 10 min
- ❖ Inaktivierung: 60°C für 20 min
- ❖ Hold: 10°C für 1 h (Zeit sollte genau eingehalten werden!)

Die Proben wurden sofort weiter bearbeitet.

**3.2.4.2.2. Adapter- und Barcode-Ligation**

Für die spätere parallele Sequenzierung von mehreren Patienten mit dem PGM, wurden die einzelnen Patientenproben jeweils mit einem Barcode markiert. Für jeden Patienten lagen zwei Proben (die PCR-Produkte aus den beiden Primer-Pools) vor, die beide mit einem identischen Barcode markiert wurden.

Ansatz für die Barcode-Adapter Verdünnung (Endvolumen = 8 µL)

- ❖ *Ion P1 Adapter* 2 µL
- ❖ *Ion Xpress Barcode X\*<sup>1</sup>* 2 µL
- ❖ nuklease-freies Wasser 4 µL
- 8 µL

\*<sup>1</sup> ausgewählter Barcode (001 – 016) für jeweils einen Patienten

Zu den Patientenproben wurden einzeln 4 µL *Switch Solution* zur Inaktivierung der Exonuklease, 2 µL verdünnter Barcode-Adapter-Mix und 2 µL DNA Ligase gegeben. Die Ansätze wurden gut gemischt und die Proben anschließend in den Thermocycler gestellt.

Temperatur Profil

- ❖ Ligation: 22°C für 30 min
- ❖ Inaktivierung: 72°C für 10 min
- ❖ Hold: 10°C für ∞

Die Libraries wurden bei 10°C über Nacht im Kühlschrank gelagert oder bei -20°C für längere Zeit eingefroren.

### 3.2.4.2.3. Aufreinigung der Libraries

Nach der Adapter- und Barcode-Ligation wurden die Patientenproben als Libraries bezeichnet. Die Libraries wurden im nächsten Schritt mithilfe von Agencourt AMPure XP Magnetpartikeln aufgereinigt. Dazu wurde vorbereitend für jeden Durchgang 70%iges Ethanol frisch hergestellt. Die Aufreinigung erfolgte wie nachfolgend beschrieben.

- ❖ die Libraries wurden einzeln aus der 96well-Mikrotiterplatte entnommen und in jeweils ein Low Binding Tube überführt
- ❖ 45 µL der Magnetpartikel wurden zu den jeweiligen Libraries pipettiert
- ❖ die Lösung wurde gut gemischt, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend auf einen Magnetständer gestellt und dort für 2 min inkubiert; solange, bis die Lösung klar wurde
- ❖ der Überstand wurde abgenommen und verworfen
- ❖ jeweils 150 µL 70%iges Ethanol wurde auf das Pellet gegeben und die Tubes auf dem Magnetständer um 360° gedreht, um das Pellet zu waschen
- ❖ anschließend wurden die Tubes für 2 min auf dem Magnetständer inkubiert
- ❖ der Überstand wurde abgenommen und verworfen
- ❖ der Ethanol-Waschschritt wurde wiederholt
- ❖ die Pellets wurden für 5 min bei Raumtemperatur auf dem Magnetständer getrocknet  
→ dabei war eine Übertrocknung der Pellets zu vermeiden, um die vollständige Elution der Libraries von den Magnetpartikeln zu gewährleisten
- ❖ die Tubes wurden vom Magnetständer genommen und jeweils 50 µL Low TE Puffer auf die Pellets pipettiert
- ❖ die Pellets wurden gut resuspendiert und die Tubes anschließend für 2 min auf den Magnetständer zur vollständigen Klärung der Lösung gestellt
- ❖ der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Low Binding Tube überführt

Die Libraries konnten bis zur weiteren Bearbeitung für maximal sechs Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden.

### 3.2.4.3. Quantifizierung der Libraries mittels qPCR

Die qPCR ist eine Methode, mit der, während der exponentiellen Phase der PCR, über Fluoreszenzsignalmessungen in Echtzeit die genaue Menge an DNA-Fragmenten in einer Probe bestimmt werden kann. Beim Next Generation Sequencing konnte, mithilfe der Messergebnisse der qPCR, die tatsächliche Ausbeute an DNA-Fragmenten berechnet werden, die korrekterweise beide Adaptoren – den P1- und den A-Adaptor – gebunden hatten.

Um die DNA-Ausbeute mittels qPCR nach der Aufreinigung der Libraries zu bestimmen, wurde das *KAPA Library Quant Ion Torrent* verwendet. Die qPCR wurde in Anlehnung an die Herstellerangaben [50] durchgeführt.

Die Sequenzen der im Kit mitgelieferten qPCR-Primer sind in der Sequenz der Ion Torrent Adaptoren enthalten. Der detaillierte Protokollablauf ist nachfolgend beschrieben.

Als Fluoreszenzfarbstoff wurde SYBR Green verwendet, welches in die doppelsträngige DNA während der Elongationsphase der PCR interkaliert.

#### Vorbereitung KAPA SYBR FAST qPCR Master Mixes

Vor dem Verdünnen der Libraries wurde der qPCR-Primer Mastermix durch Zugabe von 1 mL der Primer-Stammlösung fertig gestellt.

#### Verdünnung der Libraries

Für jede qPCR Messung wurde ein frischer Library-Verdünnungspuffer hergestellt. Dieser setzte sich aus 10 mM Tris-HCL (pH = 8,0) und 0,05% Tween 20 zusammen.

Es wurde für jede Library eine 1:1000 und eine 1:2000 Verdünnung vorbereitet. Jede Verdünnungsstufe wurde gut gemischt.

In eine MicroAmp Optical 96well Reaction Plate wurden 12 µL des *KAPA SYBR Fast qPCR Master Mixes* und 4 µL nuklease-freies Wasser vorgelegt. Jede Verdünnungsstufe der Libraries wurde als Dreifachbestimmung analysiert.

Zur Erstellung einer Standard- bzw. Kalibrierungskurve wurden parallel 6 im Kit enthaltene Standards in gleicher Weise wie die Proben prozessiert.

#### Die PCR erfolgte mit dem folgenden Temperaturprofil:

- |                  |                 |             |
|------------------|-----------------|-------------|
| ❖ Denaturierung: | 95°C für 5 min  |             |
| ❖ Denaturierung: | 95°C für 30 sec | } 35 Zyklen |
| ❖ Annealing:     | 60°C für 45 sec |             |

Die Daten der gemessenen Fluoreszenzintensitäten für die einzelnen Libraries wurden mathematisch berechnet und graphisch ausgewertet. Die Konzentration der präparierten Libraries wurde durch einen Vergleich mit der Standardkurve bestimmt.

#### 3.2.4.4. Template Preparation mittels Emulsions-PCR mit dem OneTouch 2

Für die Emulsions-PCR wurden die einzelnen Libraries kombiniert, um die Effizienz zu erhöhen. Vereint wurden alle erstellten Libraries, sowohl die zwei Libraries einer Patientenprobe als auch die Libraries verschiedener Patienten, mit jeweils verschiedenen Barcodes.

Die Gesamt-DNA-Konzentration der zusammengeführten Libraries wurde auf 100 pM eingestellt. Aus dem Gesamtvolumen der zusammengeführten Libraries wurden 0,8 µL entnommen und diese mit 49,2 µL nuklease-freiem Wasser auf 50 µL aufgefüllt. Aus dieser Lösung wurden als zweite Verdünnung 8 µL entnommen und mit 17 µL nuklease-freiem Wasser auf das Endvolumen von 25 µL für den Einsatz im OneTouch 2 (OT 2) gebracht. Zu diesen 25 µL wurden anschließend die weiteren Reaktionskomponenten für die Emulsions-PCR pipettiert.

Für die Emulsions-PCR wurden die DNA-Fragmente der Libraries – als Vorbereitung für die spätere Sequenzierung – an die *Ion PGM Template OT2 200 Ion Spheres* gebunden.

Die Amplifikationslösung wurde, wie in der nachfolgenden Tabelle 15 dargestellt, hergestellt.

Tabelle 15: Vorbereitung und Volumen der Reagenzien für die Amplifikationslösung

Reagenz	Vorbereitung	Volumen [µL]
nuklease-freies Wasser	-	25
<i>Ion PGM Template OT2 200 Reagent Mix</i>	Lösung musste Raumtemperatur besitzen; → mischen für 30 sec + kurze Zentrifugation	500
<i>Ion PGM Template OT2 200 PCR Reagent B</i>	mischen für 1 min + kurze Zentrifugation	300
<i>Ion PGM Template OT2 200 Enzyme Mix</i>	→ suspendieren + kurze Zentrifugation; Lagerung auf Eis	50
zusammengeführte Libraries	→ suspendieren + kurze Zentrifugation; Lagerung auf Eis	25
Gesamt	-	900



- ❖ die *Ion PGM Template OT2 200 Ion Spheres* (ISPs) wurden für 1 min gemischt, kurz anzenrifugiert und anschließend noch einmal gut gemischt
- ❖ 100  $\mu\text{L}$  der ISP wurden zu der Amplifikationslösung gegeben
- ❖ die erhaltene Lösung wurde gut gemischt und anschließend vorsichtig in einen Reaktionsfilter des OT 2 pipettiert
- ❖ im nächsten Schritt wurden 1000  $\mu\text{L}$  *Reaction Oil* sehr langsam durch die Probenöffnung in den Reaktionsfilter pipettiert; der Schritt wurde noch einmal wiederholt, bis der Reaktionsfilter vollständig befüllt war
- ❖ der Reaktionsfilter wurde anschließend vorsichtig in den OT 2 eingesetzt, um eine Phasenvermischung zu vermeiden

Die Probe wurde nach der Emulsions-PCR in 2 Recovery Tubes aufgefangen. Die Tubes wurden vorsichtig aus dem Gerät entnommen und der Überstand jeweils bis auf 50  $\mu\text{L}$  abgenommen. Beide Pellets wurden gut resuspendiert und anschließend in einem Low Binding Tube vereint. Ein größerer Verlust der Ion Spheres musste vermieden werden.

Die unangereicherten ISPs konnten entweder sofort weiter zur Anreicherung mit dem Enrichment System eingesetzt oder nach der Zugabe von 1 mL *Ion OneTouch Wash Solution* für bis zu drei Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden! Nach einer Lagerung im Kühlschrank musste die Probe für 2,5 min mit 15,500 rcf zentrifugiert und der Überstand auf 100  $\mu\text{L}$  abgenommen werden.

#### **3.2.4.4.1. Kontrollschritt: Kontrolle der unangereicherten ISPs mit dem Qubit**

Es wurden 2  $\mu\text{L}$  der unangereicherten ISPs aus den 100  $\mu\text{L}$  entnommen und in eine 96well-Mikrotiterplatte überführt. Anschließend wurden 19  $\mu\text{L}$  *Annealing Buffer* und 1  $\mu\text{L}$  *Ion Probes* hinzugegeben. Die Lösung wurde gut gemischt und in den Thermocycler gestellt. Die Reaktionsmischung wurde 2 min bei 95°C denaturiert und dann die *Ion Probes* für 2 min bei 37°C an die unangereicherten ISPs annealed.

Anschließend wurde die Probe aus dem Thermocycler entnommen, in ein 1,5 mL Low Binding Tube überführt und 200  $\mu\text{L}$  *Quality Control Wash Buffer* hinzugegeben. Der gut gemischte Ansatz wurde für 1,5 min bei 15,500 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 10  $\mu\text{L}$  abgenommen und verworfen. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt und nach dem letzten Waschschrift 190  $\mu\text{L}$  *Quality Control Wash Buffer* zu den unangereicherten ISPs gegeben. Der Ansatz wurde gut gemischt und zusammen mit einer Negativkontrolle (200  $\mu\text{L}$  *Quality Control Wash Buffer*) mit dem Qubit gemessen.

Die Messergebnisse der Probe mit den unangereicherten ISPs und der Negativkontrolle wurden mittels eines *Conversion Factors* (empirischer Korrekturfaktor des Herstellers) experimentell bestimmt. Dieser richtete sich nach der Seriennummer des *Ion PGM Template OT2 Kits* und wurde online zur Verfügung gestellt (<https://ioncommunity.thermofisher.com/welcome>).

Die mit den Messergebnissen und dem *Conversion Factor* berechnete Prozentzahl sollte im Bereich zwischen 10-30 % liegen. Proben in diesem Bereich ergeben bei der späteren Analyse mit der Personal Genome Machine (PGM) die meisten Daten mit der besten Qualität.

#### **3.2.4.5. Anreicherung der ISPs mit dem Ion OneTouch Enrichment System (ES)**

Die unangereicherten ISPs wurden im nächsten Schritt mit dem ES für die anschließende Sequenzierung angereichert und gewaschen. Das ES stellte eine kleine Pipettierroboter-Einheit dar.

##### Vorbereitung der Reagenzien für das ES

Herstellen der Melt-Off Solution:

- ❖ es wurden 280 µL Tween Solution und 40 µL Natriumhydroxid-Lösung (1 M) kombiniert

##### Vorbereitung der Magnetpartikel *Dynabeads MyOne Streptavidin C1 Beads*:

- ❖ die Magnetpartikel wurden für 30 sec gemischt und anschließend 13 µL in ein 1,5 mL Low Bind Tube überführt
- ❖ das Tube wurde für 2 min auf einem Magnetständer inkubiert; der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen
- ❖ im nächsten Schritt wurden 130 µL *MyOne Beads Wash Solution* auf das Pellet pipettiert und das Pellet durch Resuspendieren gelöst

Die Brücke mit 8 Kavitäten für die Anreicherung der ISPs mit dem ES wurde, wie in der nachfolgenden Abbildung 8 dargestellt, beladen und in das Gerät gestellt.

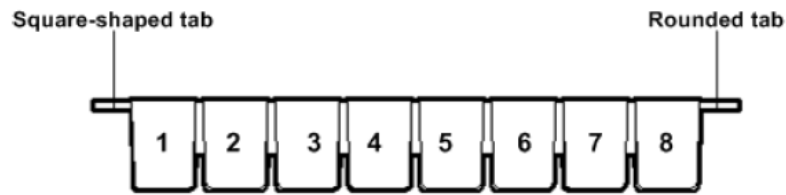


Abbildung 8: Beladungsschema der Brücke mit 8 Kavitäten für das ES: 1 = unangereicherte ISPs (100  $\mu\text{L}$ ), 2 = 130  $\mu\text{L}$  *Dynabeads MyOne Streptavidin C1 Beads*, 3-5 = 300  $\mu\text{L}$  *Ion OneTouch Wash Solution*, 6 + 8 = leer, 7 = 300  $\mu\text{L}$  frisch angesetzte Melt-Off Solution

Die angereicherten ISPs wurden in einem 0,2 mL Reagiergefäß mit 10  $\mu\text{L}$  *Neutralization Solution* aufgenommen. Die Probe konnte entweder sofort in der Sequenzierung eingesetzt oder für bis zu drei Tage im Kühlschrank gelagert werden.

### 3.2.4.6. Geräte- und Probenvorbereitung für die Sequenzierung mit der Personal Genome Machine (PGM)

Das Gerät musste vor jeder neuen Initialisierung mit einer Chlorit-Lösung und mit Reinstwasser gespült werden. Die Chlorit-Lösung enthielt Natriumchlorit und Natriumdichlorisocyanuratdihydrat mit einer Konzentration von 10-20 ppm in einem Liter Reinstwasser.

#### Initialisierung des Geräts:

Es wurde eine Initialisierung durchgeführt, nach der das Gerät betriebsbereit war. Je durchgeführte Initialisierung im Gerät war es möglich zwei komplette Sequenzierungs-Läufe durchzuführen.

#### Durchführung der Initialisierung:

- ❖ die Waschflaschen 1–3 wurden dreimal mit Reinstwasser ausgewaschen
- ❖ in die Waschflasche 1 wurden 350  $\mu\text{L}$  frisch angesetzte 100 mM Natriumhydroxid-Lösung pipettiert
- ❖ die Waschflasche 2 musste vor dem Befüllen mit 2 L Reinstwasser für ca. 10 min mit Argon begast werden, um alle  $\text{CO}_2$ -Reste zu entfernen  $\rightarrow$  anschließend wurde eine ganze Flasche *Ion PGM Sequencing 200 v2 W2 Solution* hinzugegeben sowie 140  $\mu\text{L}$  frischangesetzte 100 mM Natriumhydroxid-Lösung (Änderung zum Protokoll: 140  $\mu\text{L}$  statt 70  $\mu\text{L}$  NaOH!)

- ❖ in die Waschflasche 3 wurden 50 mL *Ion PGM Sequencing 200 v2 1X W3 Solution* gegeben
- ❖ die pH-Wert Einstellung (zwischen 7,65-7,8) aller Lösungen im Gerät für die anschließende Sequenzierung dauerte ca. 30 min und musste in maximal 10 Initialisierungsschritten erreicht werden!
- ❖ die Nukleotide wurden auf Eis aufgetaut, gut gemischt und anschließend jeweils 20 µL in die jeweilige Reagenzflasche pipettiert

#### Eingabe der Parameter für die Sequenzierungsreaktion auf der Torrent Suite

Mit der systemeigenen Software Torrent Suite wurden die Parameter für die jeweilige Sequenzierungsreaktion festgelegt. Die wichtigsten Parameter sind in der nachfolgenden Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Parameter für eine Sequenzierungsreaktion

Application	DNA
Target Technique	AmpliSeq DNA
Flows	500
Base Calibration Mode	Default Calibration
Plugins	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ variant Caller</li> <li>❖ coverage Analysis</li> <li>❖ FastQC</li> </ul>
Reference Library	hg19
Bead Loading (%)	≤ 30
Key Signal (1-100)	≤ 30
Usable Sequence (%)	≤ 30

#### Proben- und Chip-Vorbereitung

Nach erfolgreicher Systemkontrolle des Chips durch ein integriertes Testprogramm, wurde die Beladung des Chips mit den ISPs vorbereitet. Dazu wurden 5 µL gut gemischte *Control Ion Sphere Particles* zu den angereicherten ISPs gegeben. Der Ansatz wurde gut gemischt und anschließend für 2 min bei 15,500 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 15 µL abgenommen und verworfen. Anschließend wurden 12 µL *Sequencing Primer* hinzugegeben und der gut gemischte Ansatz in den Thermocycler gestellt. Der Ansatz wurde für 2 min bei 95°C denaturiert. Anschließend erfolgte bei einem 2 minütigen Temperaturschritt mit 37°C die Anlagerung der Sequenzierprimer an die einzelnen DNA-Fragmente.

Nach der Probenentnahme aus dem Thermocycler wurden 3  $\mu$ L *Ion PGM Sequencing 200 v2 Polymerase* zur Probe pipettiert. Der Ansatz wurde gut gemischt und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

#### Chip-Beladung

Aus dem im Gerät getesteten Chip wurde die enthaltene Lösung vollständig mit einer Pipette entfernt. Der Probenansatz wurde vorsichtig durch die Probenöffnung des Chips pipettiert. Für eine gute Verteilung der Probe auf der Oberfläche des Chips wurde der Chip in der Chip-Zentrifuge zweimal für 30 sec zentrifugiert, jeweils abwechselnd mit der Probenöffnung des Chips nach innen und nach außen gerichtet. Anschließend wurde die Lösung vollständig mit der Pipette entfernt. Die Ion Spheres mit den gebundenen Templates befanden sich in den einzelnen Vertiefungen des Chips. Der beladene Chip wurde dann in den PGM eingesetzt und die Sequenzierung gestartet.

#### **3.2.4.7. Analyse der NGS-Daten**

Die Rohdaten der NGS-Sequenzierung wurden auf einem Linux-basierten Server gespeichert und mit der systemeigenen Software Torrent Suite (Webbrowser-Tool) visualisiert bzw. für eine externe Sequenzauswertung vorbereitet. Dabei wurde in einem Runreport ein erster Überblick zur allgemeinen Datenqualität der jeweiligen Sequenzierungsreaktion gegeben.

##### **3.2.4.7.1. Auswertung der Daten mit SeqPilot**

Die NGS-Daten wurde mit dem Software-Modul „SeqNext“ der Software „SeqPilot“ ausgewertet [51]. Es wurde mit den empfohlenen Standardeinstellungen gearbeitet.

Die Software erstellte für jeden Patienten einen automatischen Bericht über alle nachgewiesenen Varianten für alle untersuchten Gene. Alle angezeigten Veränderungen wurden manuell überprüft, um falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse bei den Sequenzvarianten zu vermeiden und einen realistischen Methodenvergleich mit der Sanger-Sequenzierung zu gewährleisten. Zusätzlich konnte die Analysierbarkeit der einzelnen Exons durch die einzelnen parallelen Sequenzreaktionen kontrolliert werden. Auch die abgebildete Qualität der einzelnen Sequenzreaktionen wurde für die Auswertung berücksichtigt.

Durch vorgenommene Filtereinstellungen konnte außerdem ein Datenbankabgleich z.B. mit dbSNP und 1000 Genome der nachgewiesenen Varianten erfolgen.

## 4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde das Next Generation Sequencing hinsichtlich Spezifität und Sensitivität mit der bisher in der Routinediagnostik etablierten Sanger-Sequenzierung verglichen. Hierfür wurden 28 EDTA-Blutproben von Patienten mit dem Krankheitsbild eines Phäochromozytoms oder Paraganglioms mit den molekulargenetischen Methoden Sanger-Sequenzierung, der multiplexen ligationsabhängigen Sondenamplifikation (MLPA) und dem Next Generation Sequencing (NGS) auf genetische Veränderungen in den kodierenden Genabschnitten und flankierenden Intronbereichen untersucht.

### 4.1. Optimierungsprozesse und Rohdatenanalyse

#### 4.1.1. Sanger-Sequenzierung

##### 4.1.1.1. Optimierungsprozess beim Primer Design

Für die drei Gene *KIF1B*, *MAX* und *SDHA* wurden für die molekulargenetische Diagnostik Primer neu designed (s. Tabellen A1, A2 und A5 im Abschnitt Anhang). Die Primer für die übrigen untersuchten Gene *NF1*, *RET*, *SDHAF2*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *TMEM127* und *VHL* wurden aus etablierten Assays von Bioglobe übernommen.

Es erfolgte eine gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte, die mit den initialen Primern erhalten wurden. Diese PCR-Produkte wurden anschließend als Sequenzieremplate eingesetzt.

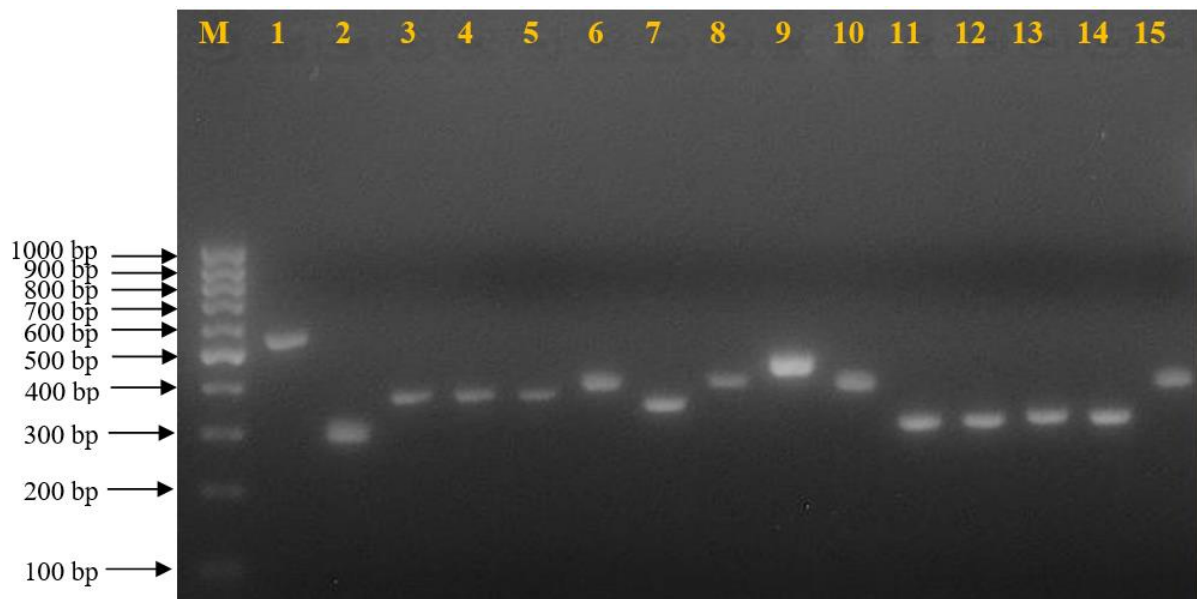


Abbildung 9: Exemplarische Darstellung der Elektrophorese der PCR-Produkte des *SDHA*-Gens, die mit den initialen Primerpaaren erhalten wurden. M = 100 bp DNA Längenstandard; 1-15 = PCR-Produkte der Primerpaare 1-15 für die Exons

Nach gelelektrophoretischer Analyse der PCR-Produkte wurden bei Verwendung aller initialen Primerpaare die erwarteten Produktlängen nachgewiesen. Jedoch deuteten die ermittelten Sequenzdaten für das *SDHA*-Gen aufgrund einer Vielzahl von beobachteten Varianten auf die Anreicherung von Nebenprodukten, z.B. durch das Vorliegen von Pseudogenen, hin. Bei den Genen *KIF1B* und *MAX* wurde dies nicht beobachtet. Abbildung 10 zeigt exemplarisch 3 beobachtete heterozygote Positionen innerhalb von 20 Basenpaaren einer sonst als konserviert geltenden Region des *SDHA*-Gens im Exon 14.

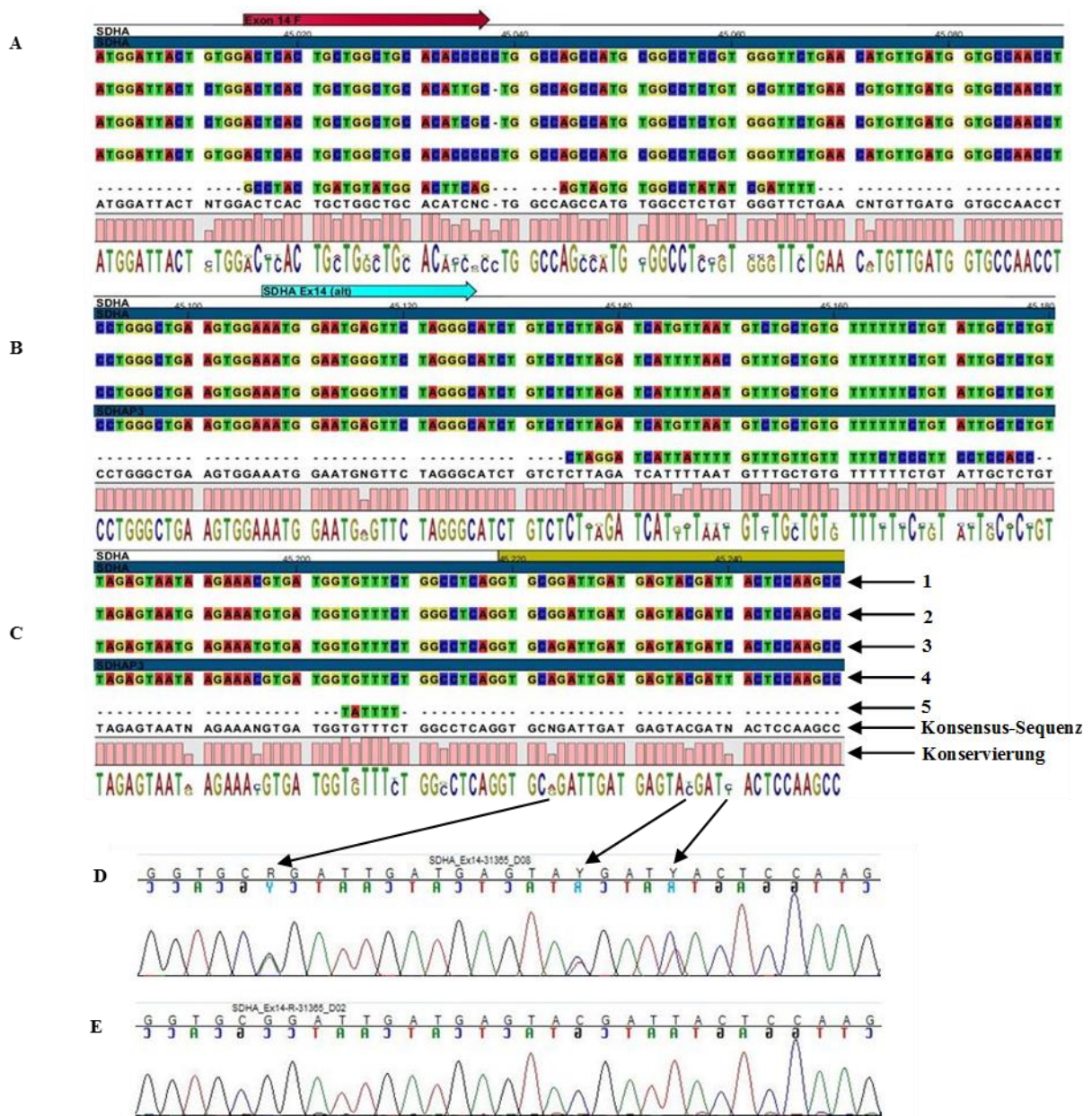


Abbildung 10: A-C: Sequenz des *SDHA*-Gens am Übergang von Intron 13 zu Exon 14 im Vergleich zu den Sequenzen seiner Pseudogene: das *SDHA*-Gen (1) wurde gegen die vier Pseudogene *SDHAP1* (2), *SDHAP2* (3), *SDHAP3* (4) und *LOC220729* (5) aligned. Dunkelblauer Balken = Gensequenz; gelber Balken = CDS (hier Exon 14 des *SDHA*-Gens); hellblauer Pfeil = alter nicht optimierter Primer 14F; roter Pfeil = Primer nach der Optimierung  
 D: Experimentell ermittelte Sequenz des *SDHA*-Gens und den amplifizierten Pseudogenen mit dem unspezifischen Primer *SDHA\_Ex14F* (alt)  
 E: Experimentell ermittelte Sequenz des *SDHA*-Gens mit dem optimierten, spezifischen Primer *SDHA\_Ex14F\_2.2*

Beim Design der Primer mussten beim *SDHA*-Gen Pseudogen-bedingte Spezifitätsprobleme gelöst werden. Für das *SDHA*-Gen sind die vier Pseudogene *SDHAP1*, *SDHAP2*, *SDHAP3* und *LOC220729* bekannt (s. Tabelle 17). Die hohe Sequenzhomologie von ca. 95-98% wurde im kodierenden Bereich ermittelt. In den Intronbereichen beträgt die Homologie ca. 80%, wobei in den exonnahen Intronbereichen die Homologie größer wird (s. Abbildung 10). Somit mussten nach einem ersten Primer Design für viele der Primerpaare eine Optimierung ihrer



Positionen vorgenommen werden, um die spezifische Amplifizierung der *SDHA*-Genabschnitte zu gewährleisten. Die Basis bildeten Primer aus der Literatur [42], die teilweise an die aktuellen methodischen Bedingungen weiter angepasst wurden (s. Tabelle A5 im Abschnitt Anhang). Beim Assay Design für die Gene *KIF1B* und *MAX* lag keine Pseudogen Problematik vor.

Tabelle 17: Homologie der CDS des *SDHA*-Gens zu den vier Pseudogenen

Die übereinstimmenden Bereiche zwischen der CDS des *SDHA*-Gens und seinen Pseudogenen wurden mittels BLAST-Analyse ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) → BLAST) ermittelt. Dabei wurde als Eingabe (*Query*) die Sequenz der gesamten CDS des *SDHA*-Gens verwendet.

Pseudogen	Homologie zur CDS des <i>SDHA</i> -Gens	homologe Bereiche
<i>SDHAP1</i>	ca. 95%	c.2_1996 (Exon 1-15)
<i>SDHAP2</i>	ca. 95%	c.2_1908 (Exon 1-14)
<i>SDHAP3</i>	ca. 98%	c.1256_1552 (z.T. Exon 9 sowie Exon 10-11) und c.1663_1996 bp (Exon 13-15)
<i>LOC220729</i>	ca. 95%	c.4_772 (Exon 1-6)

Alle verwendeten PCR- und Sequenzierprimer amplifizierten letztendlich nur die gewünschten Exonsequenzen der elf Gene und keine Pseudogensequenzen.

#### 4.1.1.2. Datenanalyse der Sanger-Sequenzierung

Die Analyse der Sequenzdaten für alle 28 Patienten erfolgte mit den Programmen Sequencher (s. Abbildung 11) und DNA Workbench.

Die Abbildung 11 zeigt beispielhaft die nachgewiesene Variante c.193T>A (p.Ser65Thr) im *VHL*-Gen bei dem Patienten 30772.

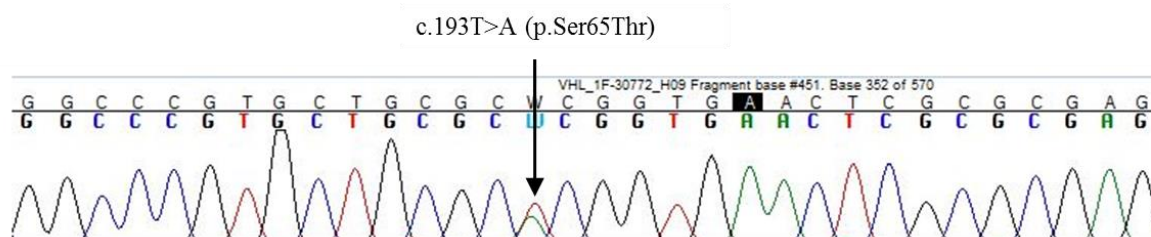


Abbildung 11: Sequenzdarstellung des *VHL*-Gens mit der Variante c.193T>A (p.Ser65Thr): Die experimentellen forward Sequenzdaten für das Exon 1 des Gens *VHL* sind gegen die Referenzsequenz aligned

Die ausführliche Darstellung der ermittelten Sequenzvarianten erfolgt im Abschnitt 4.2. zur besseren Übersichtlichkeit im direkten Vergleich zur NGS-Methode. Insgesamt wurden 2 Nonsense-, 18 Missense-, 31 Silent- und 69 Intron-Varianten mit der Sanger-Sequenzierung nachgewiesen.

Eine genauere Bewertung aller nachgewiesenen Insertionen, Deletionen, Nonsense-, Missense- und Silent-Varianten erfolgt in Abschnitt 5.5. der Diskussion. Alle weiteren, in den Intronbereichen gefundenen, Varianten sind im Anhang (s. Tabelle A25 im Abschnitt Anhang) aufgeführt.

#### **4.1.2. Multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation (MLPA)**

##### **4.1.2.1. Datenanalyse der MLPA-Ergebnisse**

Die 28 Patientenproben wurden zusätzlich mittels der MLPA bezüglich großer Deletionen oder Duplikationen analysiert, welche mit der Sanger-Sequenzierung nicht nachweisbar sind. Mit den zurzeit kommerziell verfügbaren Sondenmixen konnten die acht Gene *MAX*, *NF1*, *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHAF2* und *VHL* untersucht werden. Für die drei Gene *KIF1B*, *RET* und *TMEM127* existieren bisher keine Sondenmixe. Da der Fokus dieser Arbeit auf der Etablierung der NGS-Methodik lag, wurde auf die Entwicklung eigener Sonden zur MLPA-Charakterisierung dieser Gene verzichtet.

Die Auswertung der MLPA-Daten erfolgte mit dem Programm Genemarker und ist nachfolgend anhand einer unauffälligen Probe und einer Probe mit nachgewiesener partieller Gendeletion exemplarisch gezeigt.

Die Grenzwerte zur Bewertung der Messergebnisse der einzelnen Patienten sind bei weniger als 75% (Wertung als Deletion) und mehr als 130% (Wertung als Duplikation) definiert.

Als Referenzprobe wurde die in-Haus Kontroll-DNA „SNP18“ verwendet. Die Messung der Proben erfolgte mit dem 3500xL Genetic Analyzer.

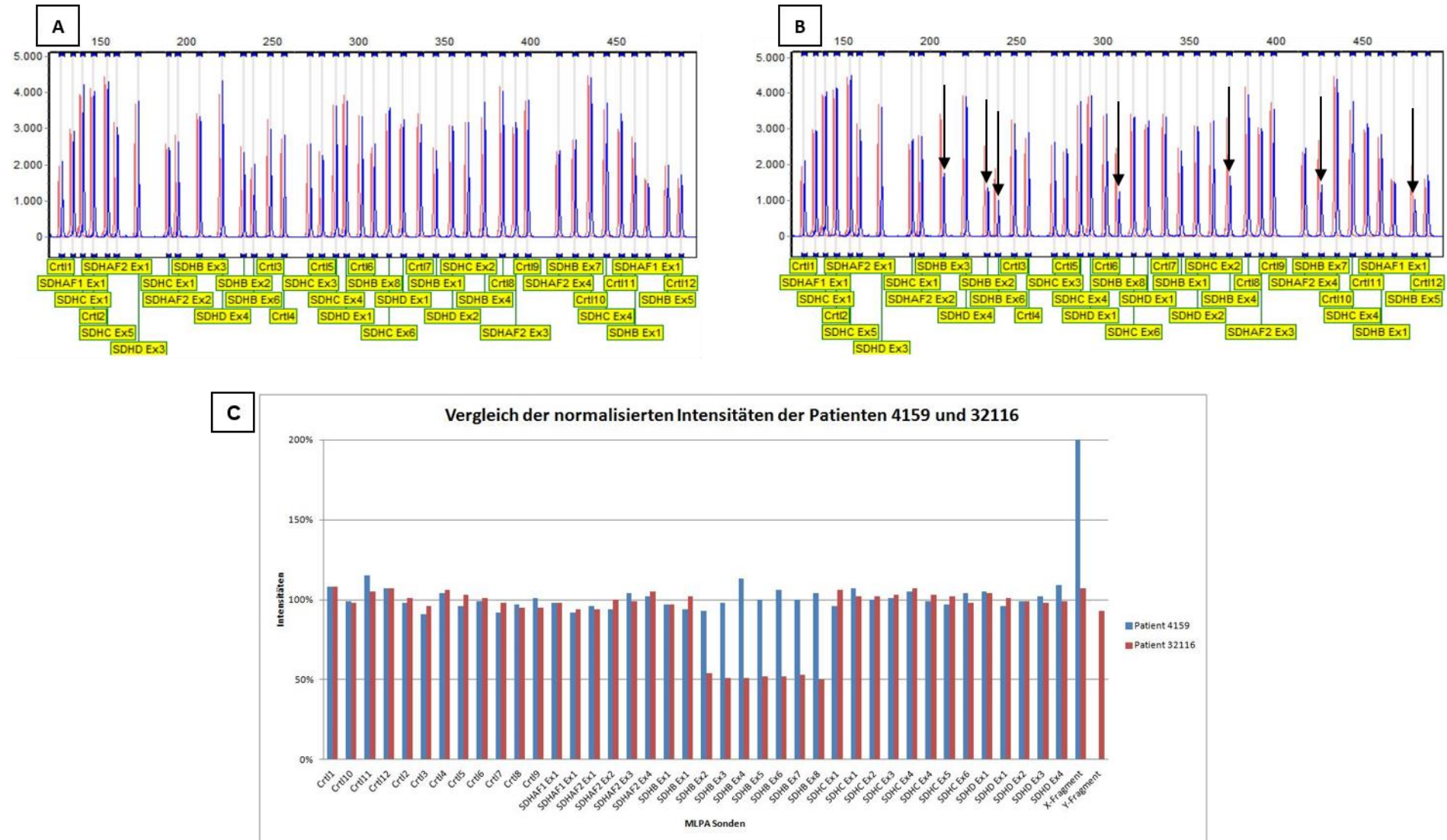


Abbildung 12: Exemplarische Darstellung der MLPA-Ergebnisse für eine unauffällige Probe (A) und eine Probe mit nachgewiesener heterozygoter Deletion im *SDHB*-Gen (B). Die Peaks sind jeweils entsprechend den Fragmentgrößen in (A) und (B) sortiert. Die Pfeile in (B) markieren die für die heterozygote Deletion der Exons 2-8 indikativen Signale/Fragmente. In Abbildung (C) sind die normalisierten Werte in Reihenfolge der Exons dargestellt. Die Normalisierungsprobe ist männlich, daher fehlt bei Patient 4159 das Y-Fragment und das X-Fragment erscheint mit doppelter Intensität.

Abbildung 12 (A) zeigt, dass die Patientenprobe 4159 (blaue Balken) keine Deletionen oder Duplikationen in den untersuchten Genen *SDHAF2*, *SDHB*, *SDHC* und *SDHD* aufweist. Für alle Sonden wurde eine normalisierte Intensität für 2 Kopien detektiert. Da die analysierte Patientenprobe weiblich ist (XX Karyotyp), wird für diese Patientenprobe kein Y-Signal und das X-Signal mit 200% Intensität beobachtet.

Abbildung 12 (B) zeigt (s. Pfeile), dass die Patientenprobe 32116 eine heterozygote Deletion der Exons 2-8 im *SDHB*-Gen aufweist. Da die analysierte Patientenprobe männlich ist (XY Karyotyp), wird für diese Patientenprobe ein Y-Signal und ein X-Signal mit ca. 100% Intensität beobachtet.

Die ausführliche Darstellung der ermittelten größeren Duplikationen und Deletionen erfolgt im Abschnitt 4.4.1.

### 4.1.3. Next Generation Sequencing

#### 4.1.3.1. Optimierungsprozess beim Primer Design: Primer-Panel „Phäochromozytom“

Die Primer für das Panel „Phäochromozytom“ wurden mit dem Programm Ion AmpliSeq Designer (Life Technologies, jetzt Thermo Fisher Scientific) erstellt. Es enthält Primer für die Amplifikation und Sequenzierung der kodierenden Regionen der elf Gene *KIF1B*, *MAX*, *NF1*, *RET*, *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHAF2*, *TMEM127* und *VHL*. Um eine möglichst vollständige Analyse aller Exons der elf Gene mit nur moderatem Überhang in die nicht kodierenden Introns zu erhalten, wurden alle fünf möglichen Exonpadding-Einstellungen von 5 bp, 10 bp, 25 bp, 50 bp und 100 bp getestet.

Tabelle 18: Analysierbare Bereiche der *in silico* berechneten Primer-Panels bei verschiedenen Exonpadding

Gene	Panel 1 Exonpadding 5 bp	Panel 2 Exonpadding 10 bp	Panel 3 Exonpadding 25 bp	Panel 4 Exonpadding 50 bp	Panel 5 Exonpadding 100 bp
<i>KIF1B</i>	88,68%	97,97%	96,04%	94,36%	91,77%
<i>MAX</i>	94,52%	100%	100%	100%	100%
<i>NF1</i>	94,06%	99,31%	98,71%	97,65%	94,7%
<i>RET</i>	95,03%	99,67%	99,15%	98,42%	98,63%
<i>SDHA</i>	98,75%	98,87%	97,9%	95,98%	90,82%
<i>SDHAF2</i>	100%	100%	98,01%	95,25%	88,12%
<i>SDHB</i>	100%	100%	100%	100%	98,82%
<i>SDHC</i>	96,02%	96,09%	95,46%	93,77%	85,91%
<i>SDHD</i>	98,51%	100%	100%	100%	97,98%
<i>TMEM127</i>	86,78%	100%	100%	100%	100%
<i>VHL</i>	45,77%	100%	99,25%	95,66%	86,99%
Mittelwert Coverage	89%	98,99%	98,05%	96,82%	94,09%

Die in Tabelle 18 angegebenen relativen Werte für die mit den einzelnen *in silico* Panels erfassbaren Bereiche beziehen sich jeweils auf die gesamte Zielsequenz, welche sowohl das Exon als auch die flankierenden Basen entsprechend dem eingestellten Exonpadding enthält.

Das Primer-Panel mit einem Exonpadding von 10 bp hatte für alle kodierenden Sequenzabschnitte der Gene den größtmöglichen *in silico* Analysebereich. Der genaue Abstand der Primer zu den einzelnen Exons wurde überprüft und kann aus den Primertabellen A12-A22 im Abschnitt Anhang entnommen werden.

Anschließend wurde das Primer-Panel „Phäochromozytom“ mit einem angegebenen Exonpadding von 10 bp, einem zweifachen Primerpool mit insgesamt 269 Amplikons, einer Coverage aller zu analysierenden Exons von 98,99% und einer Zielregiongröße von 46,48 kb experimentell getestet.

#### 4.1.3.1.1. *In silico* analysierbarer Bereich mit dem Primer-Panel „Phäochromozytom“

Bei der *in silico* Berechnung des Primer-Panels wurden Amplikons für alle vorhandenen Transkriptionsvarianten eines Gens und somit auch für alle Exons erstellt. Die *in silico* analysierbaren Bereiche der kodierenden Regionen der elf Gene für die entsprechend verwendete Transkriptionsvariante der Gene (s. Tabelle 12 im Abschnitt Material und Methoden) wurden überprüft. Betrachtet wurden sowohl die kodierenden Regionen der Gene als auch jeweils 10 Basenpaare der angrenzenden Intronsequenz für jedes Exon.

Die Gene *MAX*, *RET*, *SDHAF2*, *SDHB*, *SDHD*, *TMEM127* und *VHL* besitzen einen 100%igen *in silico* analysierbaren Bereich der kodierenden Sequenzabschnitte. Von dem *RET*-Gen wurde nur der analysierbare Bereich der zur Zeit klinisch relevanten und auch mit der Sanger-Sequenzierung untersuchten Exons 8, 10, 11, 13, 14, 15 und 16 überprüft. Auf die Analyse der restlichen Exons des *RET*-Gens wurde verzichtet.

Für die Analyse der Gene *SDHA*, *SDHC*, *NF1* und *KIF1B* wurde mit dem „besten“ *in silico* Design theoretisch die Analyse zwischen 83,33% und 94,83% der geforderten Zielsequenz erreicht. Die entsprechenden nicht analysierten Bereiche sind in Abbildung 13 und Tabelle 19 im Detail beschrieben.

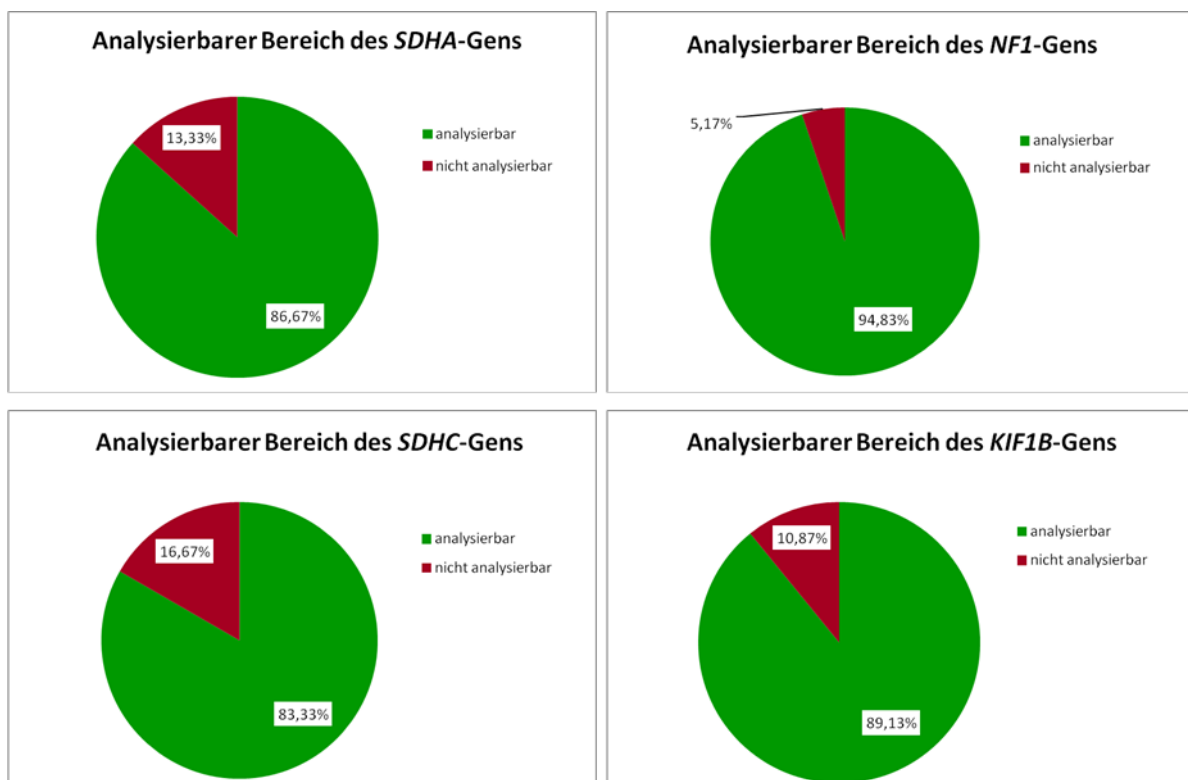


Abbildung 13: Graphische Darstellung des analysierbaren Bereichs der Gene *SDHA*, *SDHC*, *NF1* und *KIF1B* basierend auf dem *in silico* Primer-Panel „Phäochromozytom“

Tabelle 19: Übersicht über die durch das Primer-Panel nicht analysierbaren Exonbereiche sowie die genaue Anzahl der nicht analysierbaren Basen

<b>Gen</b>	<b>Exon</b>	<b>nicht analysierbare Basenzahl + Exon-Bereich</b>
<i>SDHC</i>	2	24 bp; 3'-Bereich des Exons / vor Intron 3
<i>SDHA</i>	1	6 bp; 3'-Bereich des Exons / vor Intron 2
	14	nur bis 2 bp vor dem Exon abgedeckt
<i>KIF1B</i>	6	15 bp; 5'-Bereich des Exons / vor Intron 6
	8	22 bp; 3'-Bereich des Exons / vor Intron 9
	13	26 bp; 3'-Bereich des Exons / vor Intron 14
	22	11 bp (in der Mitte vom Exon)
	47	16 bp; 3'-Bereich des Exons / vor Intron 48
<i>NF1</i>	4	9 bp; 5'-Bereich des Exons / vor Intron 4
	5	9 bp; 5'-Bereich des Exons / vor Intron 5
	14	14 bp; 5'-Bereich des Exons / vor Intron 14

#### 4.1.3.2. Optimierungsprozesse für den experimentellen Ablauf

Im Rahmen der Entwicklungsarbeiten wurde zunächst das Standardprotokoll des Systemherstellers eingesetzt. Auf Basis der Ergebnisse der Kontrollschritte (qPCR nach der Adapterligation und Bestimmung der unangereicherten Ion Sphere Partikel nach der Emulsions-PCR), wurden die Reaktionsbedingungen der Einzelschritte bei der Library-Preparation optimiert, um letztendlich die Daten robust, reproduzierbar und mit sehr guter und guter Qualität zu generieren.

##### 4.1.3.2.1. Berechnung der Kopienzahl/ $\mu\text{L}$ über die quantitativen Echtzeit-PCR Messwerte

Für eine gute Datenqualität bei der Sequenzierung mit dem PGM wurden die Kopienzahlen/  $\mu\text{L}$  (DNA-Fragmente mit beiden gebundenen Adaptoren A und P1), die in den verschiedenen Libraries enthalten sind, berechnet.

Anhand der Ergebnisse der qPCR wurde eine Regressionsgerade erstellt, die für das in Abbildung 14 gezeigte Beispiel mit den vier Libraries 40752, 37684, 2325 und 2222 der Funktion  $y = -0,4829x + 12,969$  entsprach.

Die tatsächliche Ausbeute an DNA-Fragmenten (Kopien/  $\mu\text{L}$ ) für jeden Library-Pool wurde anhand der Regressionsgeraden mittels Interpolation berechnet und ist für die oben genannten Libraries in Abbildung 14 graphisch dargestellt. Um eine lineare Interpolation zu ermöglichen, wurde der Funktionswert zur Basis 10 logarithmiert, um eine Exponentendarstellung zu erhalten. Die dadurch entstandene Gerade ermöglichte die lineare Interpolation. Das Ergebnis wurde in die Funktion  $10^y$  eingefügt und ergab die benötigte Lösung.

$x = C_T$

$y = \text{Kopienzahlen}$

Die Formel für die lineare Interpolation bei einfacher logarithmischer Darstellung ist nachfolgend gezeigt. Die Funktionswerte ( $y$ ) werden logarithmisch dargestellt.  $x_1$ ,  $y_1$  und  $x_2$   $y_2$  sind bekannte Wertepaare. Für das Wertepaar  $x_{1a}$  und  $y_{1a}$  wird der  $y$ -Wert gesucht.

$$y_{1a} := 10^{\left[ \log(y_1) + \frac{(\log(x_{1a}) - \log(x_1))}{(\log(x_2) - \log(x_1))} (\log(y_2) - \log(y_1)) \right]}$$

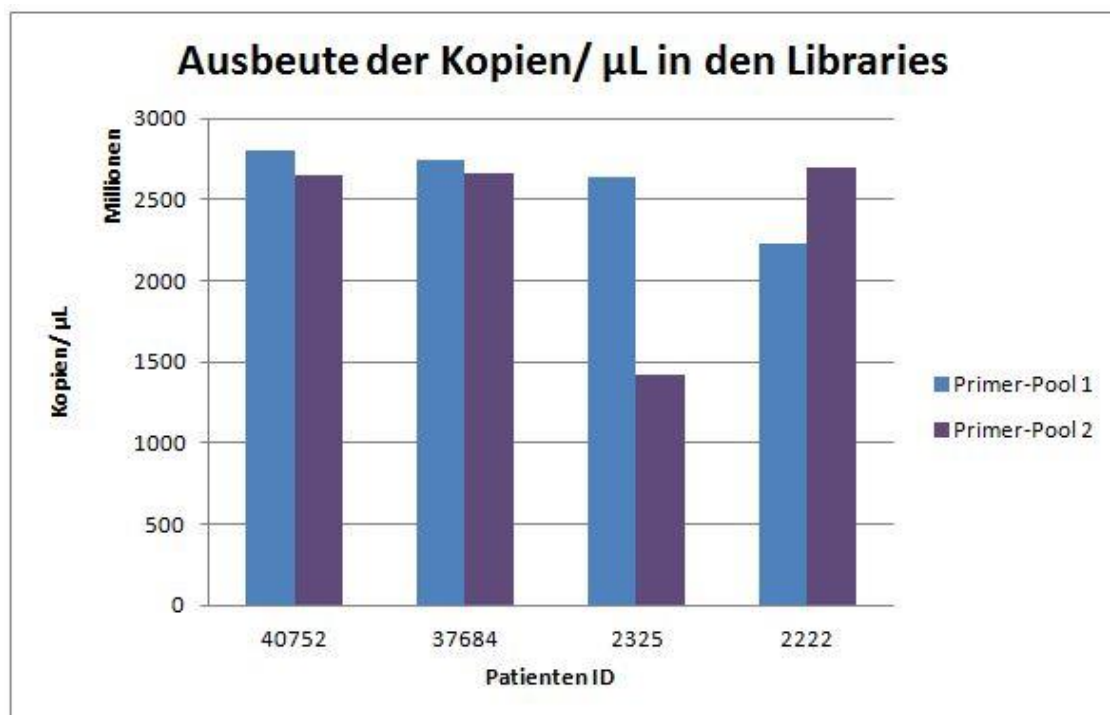


Abbildung 14: Graphische Darstellung der Ausbeute an DNA-Fragmenten (Kopien/  $\mu\text{L}$ ), die sowohl den P1- und den A-Adapter gebunden haben, in den Libraries von vier verschiedenen Patientenproben des Sequenzierungsverlaufs 20150608\_2



Abbildung 14 zeigt, dass die Ausbeute an DNA-Fragmenten, die beide Adaptoren, den P1- und den A-Adapter, gebunden haben, in den Libraries nicht identisch war. Eine Kontrolle mit der quantitativen Echtzeit-PCR war somit wichtig, um die Volumina der Libraries vor der Vereinigung für die Emulsions-PCR entsprechend anzupassen. Es wurden äquivalente DNA-Mengen jeder Library als Ausgangsmaterial bei der Emulsions-PCR eingesetzt, indem die Volumina entsprechend angepasst wurden.

Die berechneten Ergebnisse für die Kopienzahlen der anderen Libraries der Patientenproben sind im Anhang in Tabelle A23 aufgeführt. Eine graphische Darstellung der berechneten Kopienzahlen für alle Libraries der Patientenproben ist ebenfalls im Anhang in Abbildung A2 dargestellt.

#### **4.1.3.2.2. Volumen Berechnung für die Emulsions-PCR und ISP Quantifizierung**

Die einzelnen Library-Proben wurden für die Emulsions-PCR vereint. Die Konzentration jeder Library musste vorher auf 100 pM eingestellt werden. Anhand der mittels linearer Interpolation berechneten Ausbeute der tatsächlichen Menge an Kopien/  $\mu\text{L}$  in jeder Library-Probe, wurde das Library-Volumen, welches 100 pM entspricht, ermittelt. Zu bestimmen war der empirische Korrekturfaktor, der einer Library-Konzentration von 100 pM entspricht. Der Quotient aus diesem empirischen Wert und der berechneten Ausbeute der Kopienzahl/  $\mu\text{L}$  für jede Library ergab das Library-Volumen mit einer Konzentration von 100 pM. Nach Vereinigung der Libraries erfolgte die Emulsions-PCR mit dem OneTouch 2. Anschließend wurden die unangereicherten ISPs bestimmt. Der Wert für die unangereicherten ISPs wurde anhand der Fluoreszenzmessergebnisse mit dem Qubit von der Probe und einer Negativkontrolle mittels eines *Conversion Factors* (empirischer Korrekturfaktor des Herstellers) experimentell bestimmt. Der Toleranzbereich für die unangereicherten ISPs lag zwischen 10-30%.

Als Startwert zur Bestimmung des empirischen Faktors diente  $280 \times 10^6$  (Hersteller-Angabe des verwendeten Kits). Mit diesem Faktor zur Berechnung der Library-Volumina wurden nach der Emulsions-PCR zu hohe Anteile an unangereicherten ISPs erzielt. Über eine empirische Messreihe anhand der Patientenprobe 2325 (s. Tabelle 20) wurde der empirische Wert mit  $80 \times 10^6$  Kopien  $\hat{=}$  100 pM experimentell bestimmt. Die Berechnung mit diesem neu ermittelten empirischen Wert für die Library-Volumina für die Emulsions-PCR reduzierte anschließend den Anteil der unangereicherten ISPs auf den Sollbereich zwischen 10-30% (s. Tabelle 20).

Tabelle 20: Messreihe zur Bestimmung des empirischen Werts zur Berechnung des jeweiligen Library-Volumen für die Emulsions-PCR und den ermittelten Anteilen der unangereicherten ISPs. Patientenprobe = 2325 mit Primer-Pool 1 und 2

\*Berechnung erfolgte mit der oben genannten Formel für die lineare Interpolation bei einfacher logarithmischer Darstellung

Patientenprobe	Mittelwert der Ausbeute der Kopien/ $\mu\text{L}$ *	empirischer Korrekturfaktor	Library-Volumen [ $\mu\text{L}$ ] $\triangleq$ 100 pM	Laufende Nummer Emulsions-PCR	unangereicherte ISPs
2325 Pool 1	177214798	280000000	1,58	1	39,18%
2325 Pool 2	124757996		2,24		
2325 Pool 1	177214798	100000000	0,56	2	27,44%
2325 Pool 2	124757996		0,80		
2325 Pool 1	177214798	80000000	0,45	3	21,47%
2325 Pool 2	124757996		0,64		

Die Tabelle 20 zeigt, dass mit dem empirischen Wert von  $80 \times 10^6$  der beste Wert für die unangereicherten ISPs erzielt wurde. Der Wert von 21,47% liegt in der Mitte des empfohlenen Optimums von 10-30%.

Nach der Bestimmung des empirischen Werts wurden alle weiteren Library-Volumina für die Emulsions-PCR mit diesem Wert berechnet.

Die Abbildung 15 zeigt exemplarisch für vier Patientenproben die berechnete Library-Volumina mit dem ermittelten empirischen Wert  $80 \times 10^6$  für das Vereinen der Libraries für die Emulsions-PCR.

Die berechneten Ergebnisse sowie deren graphische Darstellung für die Library-Volumina aller Patientenproben sind im Anhang in Tabelle A23 und Abbildung A3 aufgeführt.

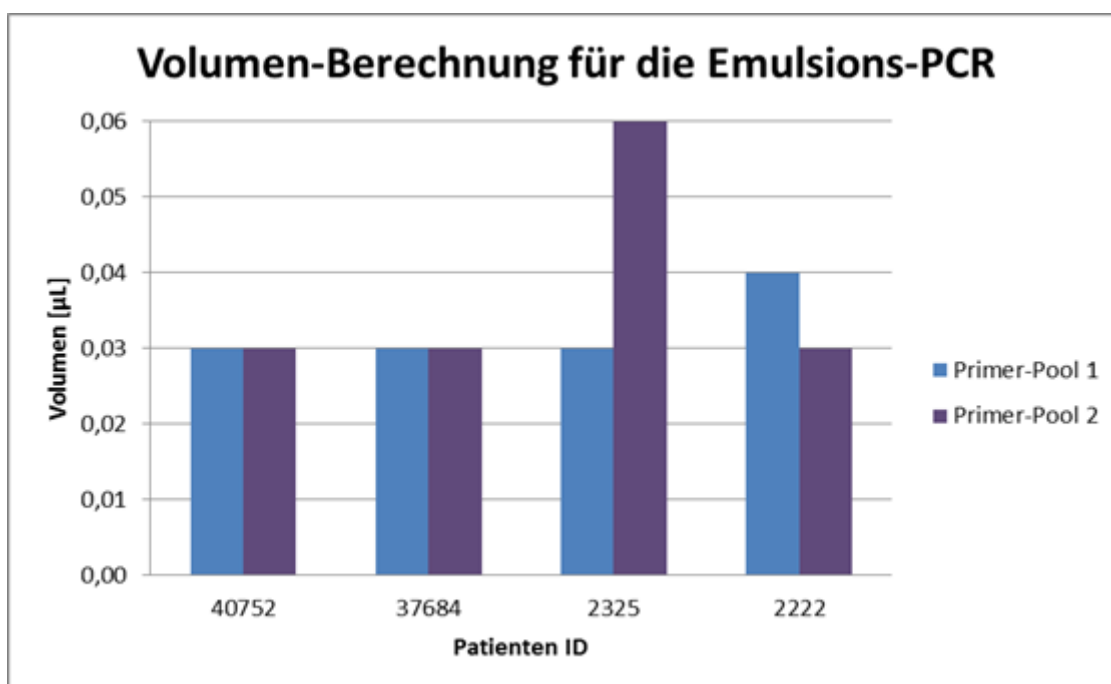


Abbildung 15: Exemplarische Graphische Darstellung der berechneten Library-Volumina mit dem ermittelten empirischen Wert von  $80 \times 10^6$  für die Emulsions-PCR. Die vier Patientenproben stammen aus dem Sequenzierungslauf 20150608\_2

Die nachfolgende Tabelle 21 zeigt die Werte der unangereicherten ISPs für alle Proben, die nach der Emulsions-PCR mit dem PGM sequenziert und ausgewertet wurden. Weitere Zwischenergebnisse dieser Optimierungsarbeiten sind im Anhang in Tabelle A24 dargestellt.

Tabelle 21: Werte der unangereicherten ISPs für die Proben nach der Emulsions-PCR, die nach der Sequenzierung ausgewertet wurden (28 Patienten)

Laufende Nummer	Sequenzierungslauf ID	unangereicherte ISPs [%]	Patienten ID
1	20140429	14,75	2241, 13265, 2272, 37634, 2276, 30988 und 19864
2	20140430	12,74	30772, 29371, 19369, 31365, 29334, 32116 und 33573
3	20150520	28,54	2328, 37327, 18477 und 29244
4	20150521	12,86	18087, 34718, 31173 und 4159
5	20150608_1	11,06	18087, 34718, 31173 und 4159
6	20150608_2	21,51	2325, 40752, 37684 und 2222
7	20150630	9,56	2607, 2973, 2 Referenzproben

Der Messwert sollte für die unangereicherten ISPs mit gebundenem Template einen Wert zwischen 10%-30% erreichen, um in der Sequenzierung eine gute Datenqualität und eine optimale Chip-Beladung zu erreichen. Die Werte in Tabelle 21 variieren zwischen 9,56% und 28,54%.

### **4.1.3.3. Rohdatenauswertung und Sequenzierergebnisse**

#### **4.1.3.3.1. Bewertung der Rohdaten**

Der PGM erstellte zu jedem Sequenzierungslauf einen Runreport mit verschiedenen Informationen, die die Bewertung des Laufes schon vor der eigentlichen Auswertung der Sequenzen erlaubten. Nachfolgend ist jeweils ein Runreport während der Optimierungsmaßnahmen und nach Beendigung der Optimierungsmaßnahmen exemplarisch gezeigt (s. Abbildung 16+17).

Bereits zu Beginn der Optimierungsmaßnahmen wurde der PGM und auch der OT 2 mit einer Abdeckung versehen, um Luftströme und Temperaturschwankungen zu minimieren. Der PGM sequenziert über die Messung von pH-Wert-Änderungen bei der enzymatischen Verlängerung des DNA-Stranges um ein Nukleotid während der Sequenzreaktion. Diese pH-Wert-Änderungen sind temperaturabhängig, sodass die Sequenzierung in einer konstanten Umgebungstemperatur erfolgen sollte.

Abbildung 16 zeigt den Runreport für einen Chip mit ungenügender ISP Beladung vor den Optimierungsmaßnahmen: AmpliSeq-PCR mit 18 Zyklen; von jeder Library (verdünnt auf 100 pM) wurden jeweils 5 µL vereint und aus diesem Gesamtvolumen 2 µL + 23 µL Reinstwasser in der Emulsions-PCR eingesetzt.

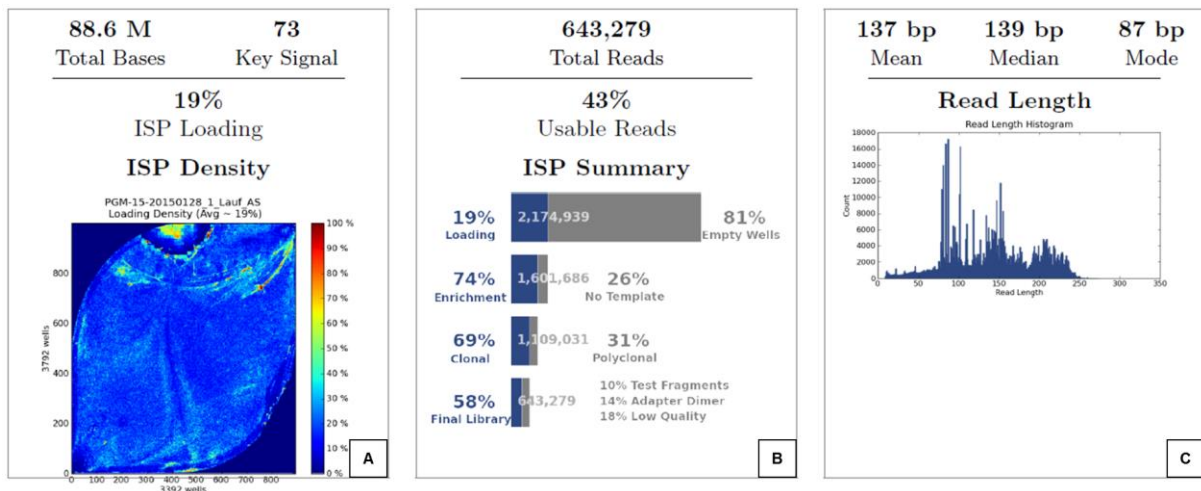


Abbildung 16: Runreport für einen Sequenzierungslauf während der Optimierungsmaßnahmen. A = Heat Map des Chips: rot = Ion Spheres, die sequenziert werden können; blau = Luftblasen, keine Ion Spheres; B = Qualitätsdaten über die Anreicherung der Ion Spheres mit gebundenem Template, die Beladung des Chips und die Sequenzierung; C = mittlere Sequenzierlänge in Basenpaaren.

Abbildung 17 zeigt den Runreport für einen Chip mit guter ISP Beladung nach dem optimierten und etablierten Protokoll: Die AmpliSeq-PCR erfolgte mit 21 Zyklen. Die einzelnen Libraries wurden entsprechend der Normalisierungsberechnung (s. Abschnitt 4.1.3.2.) mit  $80 \times 10^6$  Kopien in der Emulsions-PCR eingesetzt.

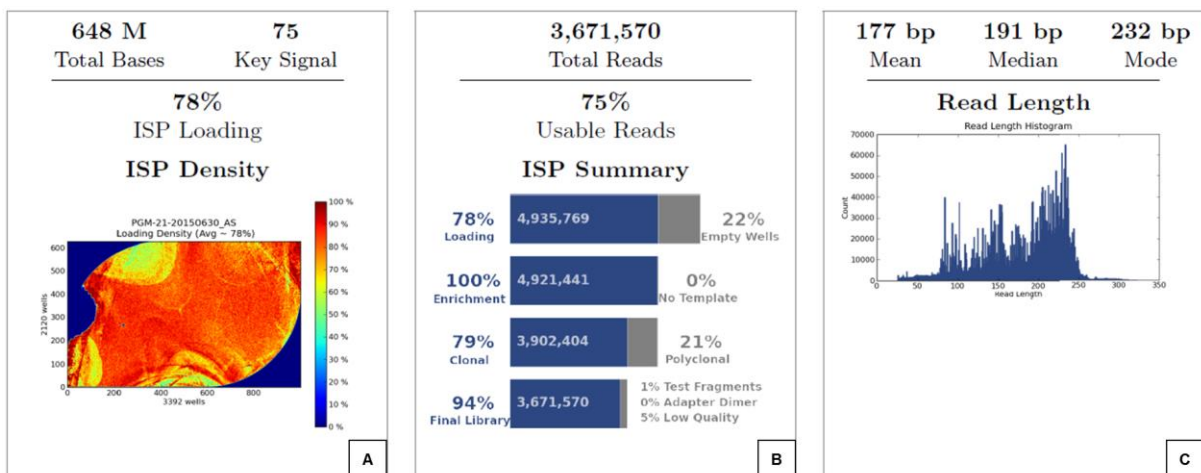


Abbildung 17: Runreport für einen Sequenzierungslauf nach Beendigung der Optimierungsmaßnahmen. A = Heat Map des Chips: rot = Ion Spheres, die sequenziert werden können; blau = Luftblasen, keine Ion Spheres; B = Qualitätsdaten über die Anreicherung der Ion Spheres mit gebundenem Template, die Beladung des Chips und die Sequenzierung; C = mittlere Sequenzierlänge in Basenpaaren.

Nach der erfolgreichen Etablierung des Protokolls wurden alle 28 Patientenproben nach dieser Methode für das Panel „Phäochromozytom“ bearbeitet.

Die Analysedaten der einzelnen Sequenzierungsläufe sind in Tabelle 22 dargestellt. Insgesamt wurden vier Sequenzierungsläufe nach dem Basis-Protokoll, neun während der Optimierungsmaßnahmen und drei nach dem endgültigen Protokoll durchgeführt.

Tabelle 22: Analysedaten der einzelnen Sequenzierungsläufe

Daten zur Sequenzierungs-ID, Chip-Größe, Anzahl der Patienten auf dem Chip, ISP-Beladung, Gesamtmenge der Reads, Usable Reads, Clonal Reads, Polyclonal Reads, mittleren Sequenzlänge und zum Optimierungsstand des Protokolls.

\* Ein Read entspricht einem sequenzierten DNA-Fragment

\*<sup>2</sup> Clonal = ein DNA-Fragment, welches an ein ISP gebunden hat und an der Oberfläche des ISPs klonal amplifiziert wurde

\*<sup>3</sup> Polyclonal = zwei bis mehrere DNA-Fragmente, die zusammen an ein ISP gebunden haben und an der Oberfläche des ISPs klonal amplifiziert wurden

Laufende Nummer	Sequenzierungs-ID	Chip-Typ	Anzahl der Patienten	ISP Beladung [%]	Anzahl Reads* <sup>1</sup>	Usable Reads [%]	Clonal* <sup>2</sup> Reads [%]	Polyclonal* <sup>3</sup> Reads [%]	Mittlere Sequenzlänge [bp]	Optimierungsstand
1	20130830	314	K*	18	15.643	21	36	64	70	Basis-Protokoll
2	20130919_1	316	K*	44	12	0	93	7	53	Basis-Protokoll
3	20130919_2	314	K*	53	246.809	41	60	40	178	Basis-Protokoll
4	20131002	314	K*	12	32.226	49	71	29	127	Basis-Protokoll
5	20131113	314	K*	58	398.644	59	74	26	237	Optimierungsmaßnahmen
6	20140226	316	1	66	2.112.760	51	70	30	158	Optimierungsmaßnahmen
7	20140313	314	1	64	452.898	58	67	33	176	Optimierungsmaßnahmen
8	20140429	318	7	80	5.364.148	60	74	26	189	Optimierungsmaßnahmen
9	20140430	318	7	40	2.640.495	63	87	13	171	Optimierungsmaßnahmen
10	20150128	318	10	19	643.279	43	69	31	139	Optimierungsmaßnahmen
11	20150129	318	10	35	2.253.924	63	88	12	147	Optimierungsmaßnahmen
12	20150520	316	4	84	2.589.999	49	55	45	191	Optimierungsmaßnahmen
13	20150521	316	4	82	2.977.485	58	61	39	195	Optimierungsmaßnahmen
14	20150608_1	316	4	75	3.248.882	69	73	27	182	endgültiges Protokoll
15	20150608_2	316	4	83	2.777.480	53	57	43	193	endgültiges Protokoll
16	20150630	316	4	78	3.671.570	75	79	21	191	endgültiges Protokoll

\* Kontroll-Library von Thermo Fisher Scientific: *E.coli\_DH10B Control 200 Library (Ion PGM Controls Kit v2)*

#### 4.1.3.3.2. Analyse der NGS-Daten zur Identifizierung von Sequenzvarianten

Die Datenanalyse für alle 28 Patienten erfolgte mit dem Programm „SeqPilot“ und dabei mit dem NGS-Modul „SeqNext“ (s. Abbildung 18). Als zusätzliches Programm wurde der Integrative Genomics Viewer (IGV) verwendet.

Die ausführliche Darstellung der ermittelten Sequenzvarianten erfolgt im Abschnitt 4.2. zur besseren Übersichtlichkeit im direkten Vergleich zur Sanger-Methode. Insgesamt wurden 2 Nonsense-, 18 Missense-, 31 Silent- und 64 Intron-Varianten mit dem NGS nachgewiesen.

Eine genauere Bewertung aller nachgewiesenen Insertionen, Deletionen, Nonsense-, Missense- und Silent-Varianten erfolgt in Abschnitt 5.5. der Diskussion. Komplexe Sequenzveränderungen wurden, mit Ausnahme der heterozygoten Deletion der Exons 2-8 des *SDHB*-Gens der Patientenprobe 32116, nicht nachgewiesen. Alle weiteren in den Intronbereichen gefundenen Varianten sind im Anhang (s. Tabelle A25 im Abschnitt Anhang) aufgeführt.

Exemplarisch sind in der Abbildung 18 die Sequenzdaten für die heterozygote Variante c.292T>C (p.Tyr98His) im Exon 1 des *VHL*-Gens gezeigt.

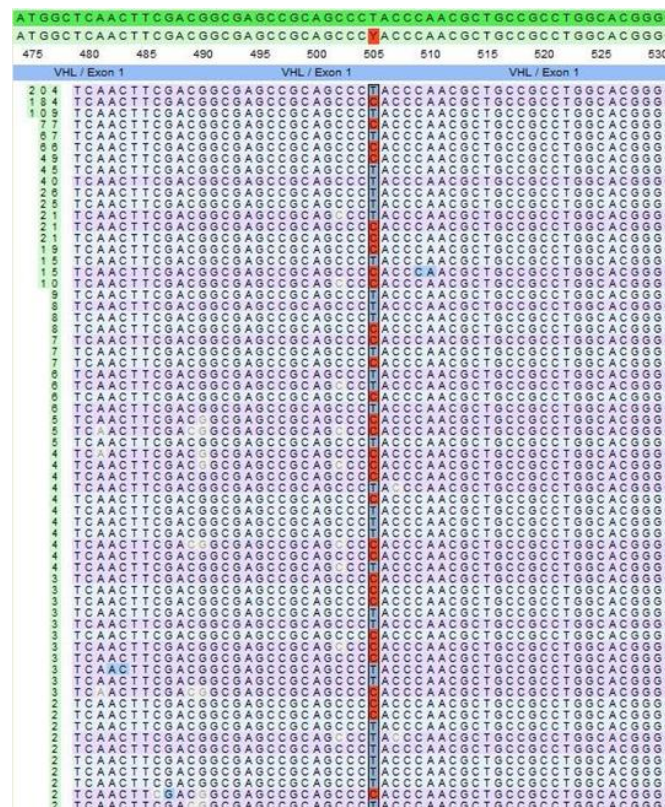


Abbildung 18: Darstellung der Variante c.292T>C (p.Tyr98His) im Exon 1 des *VHL*-Gens: Gezeigt ist ein Ausschnitt von allen für diesen Abschnitt erhaltenen forward (hellblau) und reverse (lila) orientierten Sequenzdaten für das Exon 1 des Gens *VHL*. Die hellgrün unterlegten Nummern links neben der Sequenz geben die Anzahl vollständig identischer Sequenzen an.

Eine Veränderung im Genom wurde auf Basis der angewendeten Filtereinstellungen als Variante eingestuft, wenn die Veränderung in beiden Sequenzrichtungen mehr als 5% der Gesamtmenge der Reads auftrat. Lag eine Veränderung in beiden Richtungen oder nur in einer Richtung unter diesen 5%, wurde sie als Artefakt bewertet (s. Abbildung 19).

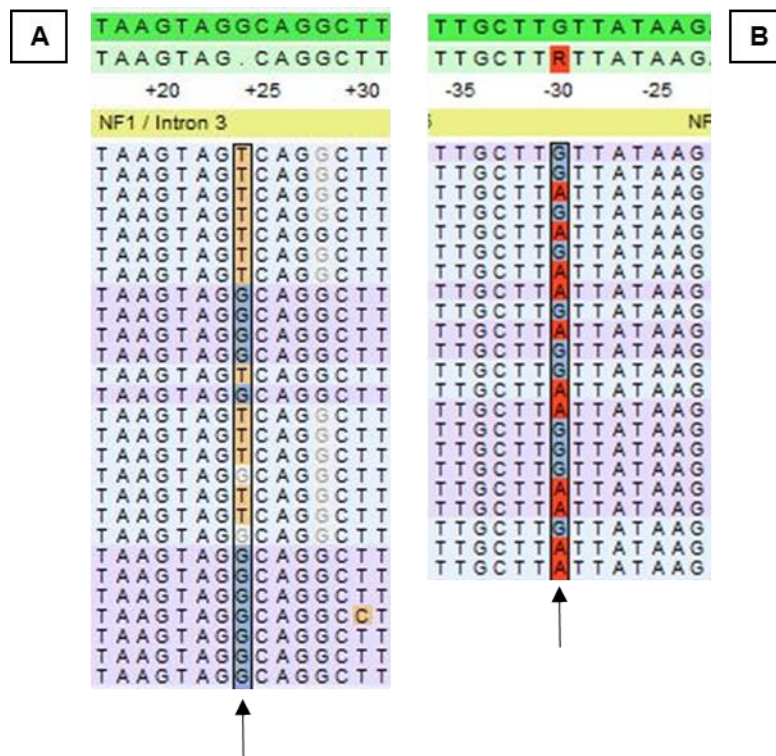


Abbildung 19: A = Darstellung einer von der Software als Artefakt (gelb hinterlegt; nur in der forward Sequenz) gewerteten Basen-Veränderung im Intron 3 des *NFI*-Gens des Patienten 2973 und B = Darstellung einer als Variante (rot hinterlegt) gewerteten Basen-Veränderung im Intron 55 des *NFI*-Gens des Patienten 2973: Gezeigt ist jeweils ein Ausschnitt von allen für diesen Abschnitt erhaltenen forward (hellblau) und reverse (lila) Sequenzen für das Intron 3 und das Intron 55 des *NFI*-Gens.

Wird die von der Referenzsequenz abweichende Base mit einem Anteil von  $>5\%$  aber deutlich unter  $50\%$  beobachtet, obliegt die Entscheidung dem Anwender, ob eine von der Software markierte Veränderung als solche gewertet wird. Dazu wurden die NGS-Ergebnisse mit den Daten aus der Sanger-Sequenzierung verglichen.

Auch bei homopolymeren Sequenzmotiven ist es die Entscheidung des Nutzers, ob der entsprechende Sequenzabschnitt verlässlich auswertbar ist.



#### 4.2. Nachgewiesene Sequenzveränderungen im Methodenvergleich NGS/ Sanger-Sequenzierung

In den Tabelle 23+24 sind alle nachgewiesenen Varianten mit der Sanger-Sequenzierung und dem Next Generation Sequencing in den Genen *NF1*, *VHL*, *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHAF2*, *RET*, *TMEM127*, *MAX* und *KIF1B* dargestellt.

Die Tabellen sind wie nachfolgend beschrieben aufgebaut. In der linken (Sanger-Sequenzierung) bzw. rechten (NGS) Spalte sind die nachgewiesenen Varianten aufgeführt. In der Kopfzeile der Tabelle steht die DNA ID und in der rechten (Sanger-Sequenzierung) bzw. linken (NGS) Spalte ist die Exonnummerierung der Gene angegeben. Die Exonnummerierungen beziehen sich auf die verwendeten Referenzsequenzen für die Gene (s. Tabelle 12 im Abschnitt Material und Methoden). Beim *KIF1B*-Gen wurde mit der Sanger-Sequenzierung zusätzlich das erste untranslatierte Exon untersucht. Beim *RET*-Gen wurden nur die Exons 8, 10, 11, 13, 14, 15 und 16 ausgewertet, da alle bisher bekannten PCC und PGL auslösenden Mutationen in ausschließlich diesen Exons nachgewiesen wurden [1, 2].

Homozygote Varianten wurden mit der Zahl „1“ und einer „orangenen Färbung“ gekennzeichnet. Heterozygote Varianten mit der Zahl „0,5“ und einer „braunen Färbung“. Keine Variante in einem Exon wurde mit „-“ markiert. Alle Varianten, die aus Gründen der Primerbindungsstelle nur von einer der beiden Methoden nachgewiesen werden konnten, sind „dunkelgrau“ hinterlegt. Varianten, die in dem Bereich der Primerbindungsstelle der Sanger-Sequenzierung und des NGS lagen und trotzdem nur mit einer Methode nachgewiesen wurden, sind mit einer „roten Färbung“ (jeweils nur mit einer Methode nachgewiesene Variante) hinterlegt. In der Spalte mit den Exonnummerierungen beim NGS wurden Exons, die aufgrund des *in silico* Designs nicht komplett analysierbar waren (s. Tabelle 19), mit einer „lila Färbung“ gekennzeichnet. Das Exon 1 vom *KIF1B*-Gen ist untranslatiert und wurde mit dem NGS somit nicht analysiert, da entsprechend den Design-Vorgaben nur kodierende Sequenzabschnitte einbezogen wurden. Zusätzlich wurden in den NGS-Datentabellen die Bereiche mit unzureichender Datenqualität mit einer „rosa Färbung“ markiert. Gründe für die mangelnde Qualität sind z.B. homopolymere Sequenzmotive, schlechte Sequenz-Qualität oder eine nicht den Filtervorgaben entsprechende Coverage für das entsprechende Exon. Auch die Exons, die aufgrund des *in silico* Designs nicht komplett analysierbar waren, wurden mit schlechter Qualität bewertet. Varianten, die mit einer „braun/ rosa Schattierung“ (heterozygot) oder einer „orange/ rosa Schattierung“ (homozygot) dargestellt wurden, sind Varianten, die trotz schlechter Qualität eindeutig nachweisbar waren!



















Die Auswertung der Tabellen zeigt, dass bis auf drei Varianten im *SDHA*-Gen und zwei Varianten im *SDHB*-Gen, die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung und des NGS identisch sind. Die folgenden fünf Varianten wurden, in dem mit beiden Methoden erfassten experimentellen Bereich, nur von einer der beiden Methoden nachgewiesen:

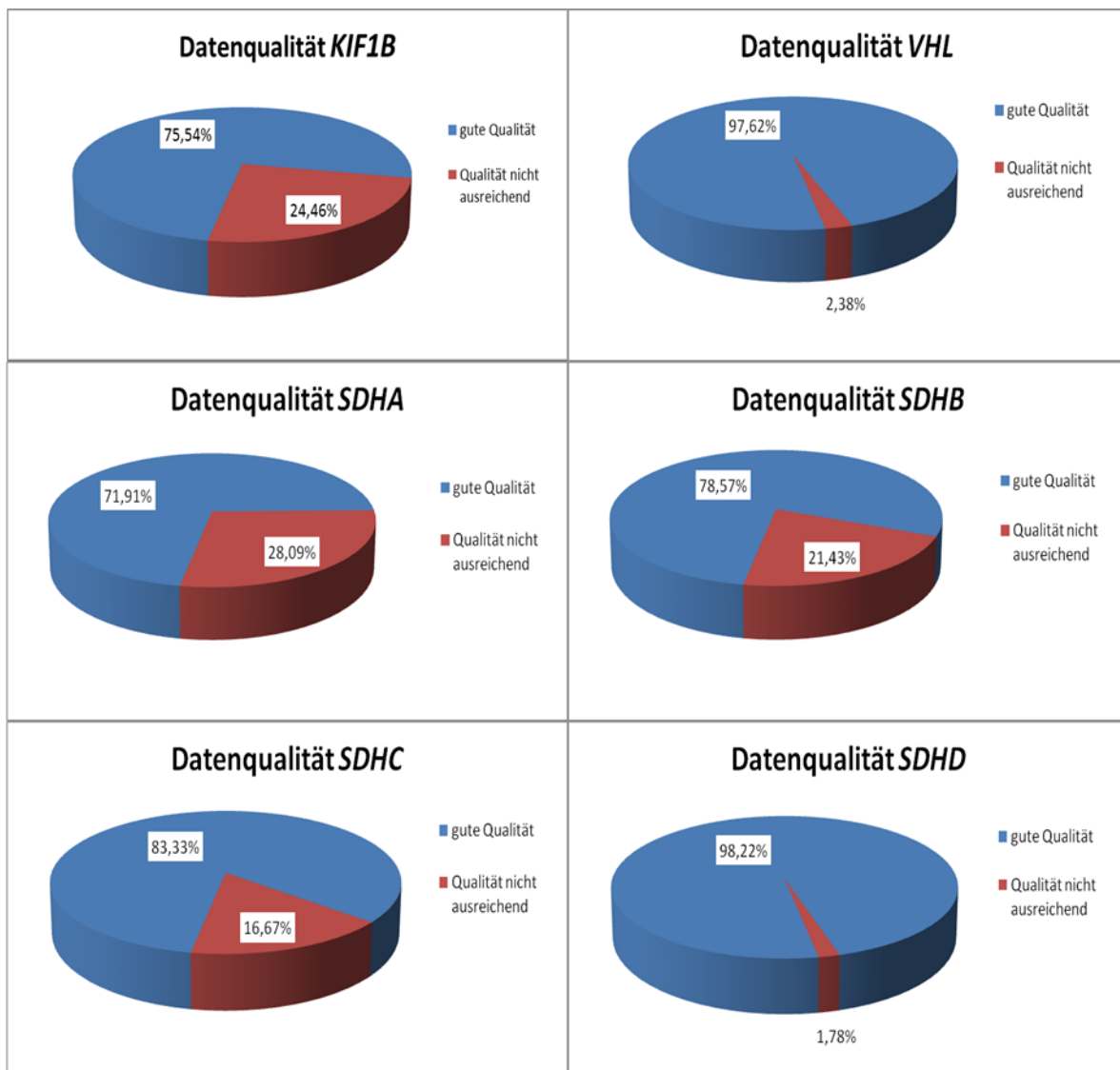
- 1.) c.1-83insC → *SDHA*-Gen → nur mit der Sanger-Sequenzierung nachgewiesen
- 2.) c.1064+10A>G → *SDHA*-Gen → nur mit NGS beobachtet, nicht abschließend geklärtes Ergebnis
- 3.) c.1064+79C>A → *SDHA*-Gen → nur mit NGS beobachtet, nicht abschließend geklärtes Ergebnis
- 4.) c.200+33G>A → *SDHB*-Gen → nur mit NGS nachgewiesen
- 5.) c.200+35G>A → *SDHB*-Gen → nur mit NGS nachgewiesen

Als Zwischenergebnis wurden zwei falsch-positive Ergebnisse beobachtet. Die zwei nicht abschließend geklärten Varianten liegen weit im Intron-Bereich, der in der Regel diagnostisch nicht untersucht wird.

Eine Variante wurde nicht mit dem NGS und zwei Varianten wurden nicht mit der Sanger-Sequenzierung nachgewiesen. Die „dunkelgrau“ markierten Varianten waren bedingt durch den Primerbindungsort nur mit einer der beiden Methoden nachweisbar.

#### 4.2.1. Erzielte Qualität der Sequenzierergebnisse mit dem Next Generation Sequencing

Beim Next Generation Sequencing wurde bei der Auswertung der Ergebnisse auch die Qualität der Sequenz-Ergebnisse subjektiv mit bewertet. Aus dieser Bewertung ergeben sich die folgenden Qualitätsergebnisse für die elf Gene mit ausgewerteten 28 Patientenproben.



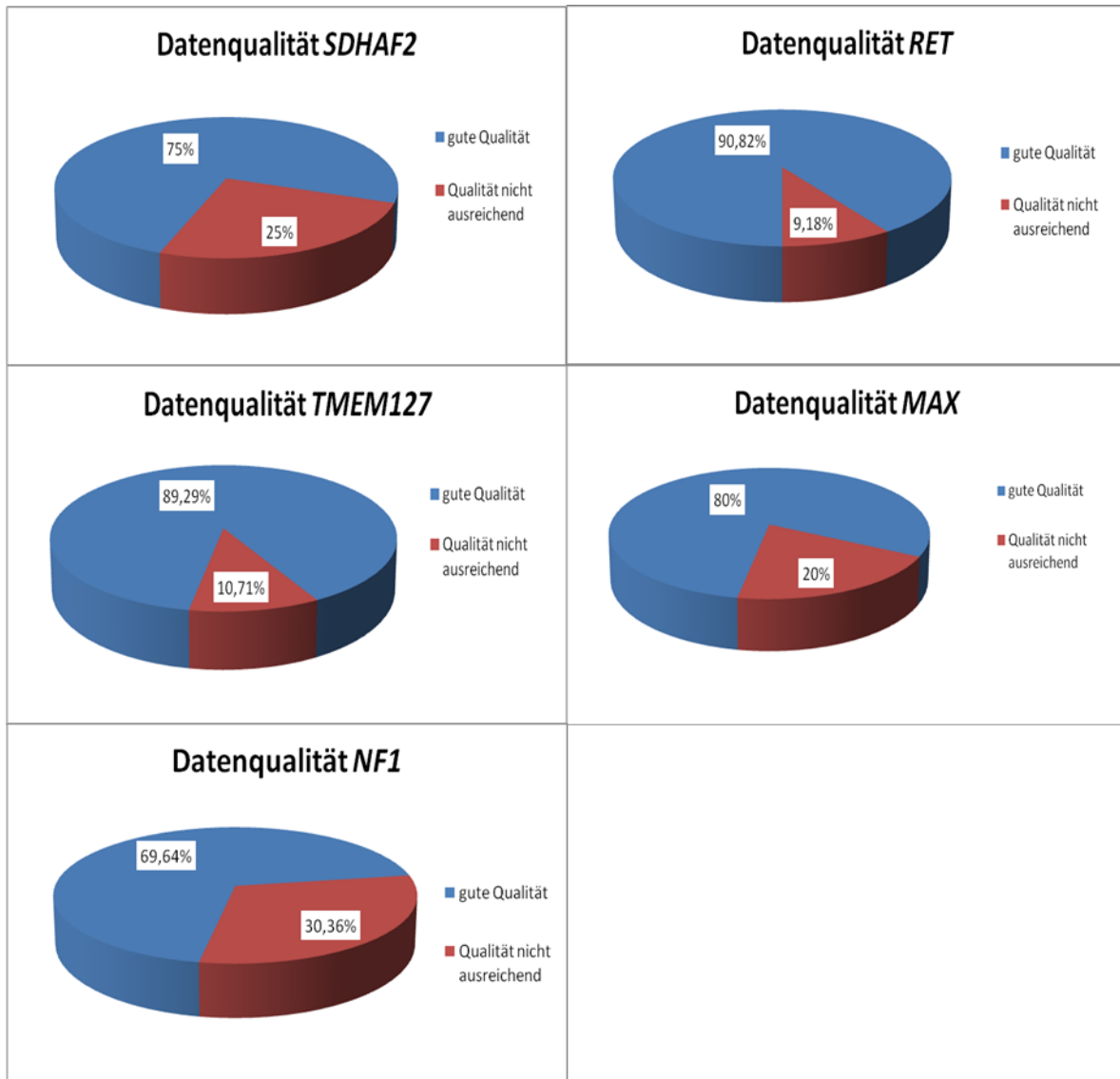


Abbildung 20: Graphische Darstellung der Datenqualität in den einzelnen Genen für die Sequenz-Ergebnisse der 28 Patientenproben.

### **4.3. Gegenüberstellung der mit Sanger-Sequenzierung bzw. NGS identifizierten Sequenzvarianten im Exonbereich und exonnahen Intronbereich**

Diese Arbeit sollte die Fragestellung betrachten, ob das NGS in Spezifität und Sensitivität die Erfordernisse eines diagnostischen Labortests für komplexe Krankheitsbilder, bei denen viele Gene und/oder sehr große chromosomale Bereiche auf Sequenzvarianten untersucht werden müssen, der Sanger-Sequenzierung vorzuziehen ist. Aus diesem Grund wurden die in Tabelle 23+24 identifizierten Sequenzvarianten noch einmal komprimierter betrachtet. Es wurden für alle Gene alle nachgewiesenen Varianten in den kodierenden Exons, sowie in der flankierenden Intronsequenz, (jeweils 10 bp) - ausgehend vom NGS - zusammengefasst und mit den entsprechenden Ergebnissen der Sanger-Sequenzierung verglichen. Der Hintergrund ist hierbei, dass krankheitsrelevante Mutationen meist in den kodierenden Bereichen der Gene und ein weiterer geringerer Teil als Spleißvarianten in exonnahen Intronbereichen auftreten. Es werden ausschließlich die aus (subjektiver) Anwenderbewertung als „eindeutig nachweisbar“ gruppierten Varianten betrachtet.

Der Aufbau der nachfolgenden Tabellen entspricht den Tabellen 23+24 mit der Ausnahme, dass alle Gene in einer Tabelle zusammengefasst wurden. Die Gene sind in der Spalte links (NGS) bzw. rechts (Sanger-Sequenzierung) von den Varianten aufgeführt. Für alle mit dem NGS nachgewiesenen Varianten, in den für die molekulargenetische Diagnostik wichtigen Sequenzbereichen der Gene, ergibt sich somit folgendes Ergebnis (s. Tabelle 25+26):





#### **4.4. Datenanalyse der Kopienzahl-Veränderungen (CNV) beim Next Generation Sequencing**

Das NGS hat das Potenzial CNV bei der Datenanalyse zu analysieren. Bei der CNV-Analyse mit „SeqNext“ werden die Daten aller parallel analysierten Proben jeweils einzeln gegen die anderen abgeglichen. Dabei wird die durchschnittliche Coverage der Kontrollproben gegen die relative Coverage der Patientenprobe verglichen, indem für jedes der elf Gene ein „Analyse Modus“ definiert wird, sodass jedes Gen gegen ein beliebiges anderes Gen (als Kontrolle) abgeglichen wird.

##### **4.4.1. Vergleich der Kopienzahl-Veränderungen der MLPA mit der CNV-Analyse des NGS**

Alle 28 Patientenproben wurden mit der multiplexen ligationsabhängigen Sondenamplifikation (MLPA) als Ergänzung zur Sanger-Sequenzierung auf größere Deletionen oder Duplikationen hin untersucht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 27 dargestellt. Die Tabelle ist wie nachfolgend beschrieben aufgebaut. In der linken Spalte sind die fünf verwendeten Sondenmixe aufgeführt. In den obersten drei Zeilen sind die Patienten 1-28, die DNA ID und das Geschlecht des Patienten aufgeführt. Die Information zum Geschlecht wurde aus den MLPA-Ergebnissen für die XY-spezifischen Sonden ermittelt. Homozygote Varianten wurden mit der Zahl „1“ und einer „orangenen Färbung“ gekennzeichnet. Heterozygote Varianten mit der Zahl „0,5“ und einer „braunen Färbung“. Keine Variante in einem Exon wurde mit „-“ markiert. Zellen mit einer „dunkelroten Färbung“ waren MLPA-Ergebnisse, die laut den Herstellerangaben (MRC Holland) in der Probenqualität grenzwertig waren, aber nicht wiederholt werden konnten. Diese experimentellen Ergebnisse wurden dennoch zur Auswertung herangezogen, da die Daten der genspezifischen Sonden homogen und stabil beobachtet wurden. Somit konnte eine eindeutige Aussage zum Vorliegen einer Deletion oder Duplikation getroffen werden.



Tabelle 27: MLPA-Ergebnisse für alle 28 Patientenproben mit allen fünf verwendeten Sondenmischen

\* detaillierte Erklärungen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit im Text (Abschnitt 4.4.1.) beschrieben

\*1 Sondenmix für die Gene *SDHB*, *SDHC*, *SDHD* und *SDHAF2*

DNA ID \ MLPA-Sondenmix	IO	IO	IO	IO	IO	IO	O <sub>3</sub>	IO	IO	O <sub>3</sub>	O <sub>3</sub>	IO	O <sub>3</sub>	O <sub>3</sub>	IO	O <sub>3</sub>	O <sub>3</sub>	IO	O <sub>3</sub>	IO	O <sub>3</sub>	IO	IO	IO	O <sub>3</sub>		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
P016 - <i>VHL</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P081 - <i>NF1</i> Mix 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P082 - <i>NF1</i> Mix 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P226 - <i>SDH</i> *1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P429 - <i>SDHA-MAX</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Die Tabelle 27 und die Abbildung 12 zeigen, dass nur in der Patientenprobe 32116 mit dem SDH-Sondenmix eine heterozygote Deletion der Exons 2-8 im *SDHB*-Gen nachgewiesen werden konnte. In keiner anderen Patientenprobe wurde eine Deletion oder Duplikation nachgewiesen.

Mit der CNV-Analyse der Patientenprobe 32116 beim NGS ließ sich die heterozygote Deletion der Exons 2-8 im *SDHB*-Gen ebenfalls nachweisen (s. Abbildung 21).

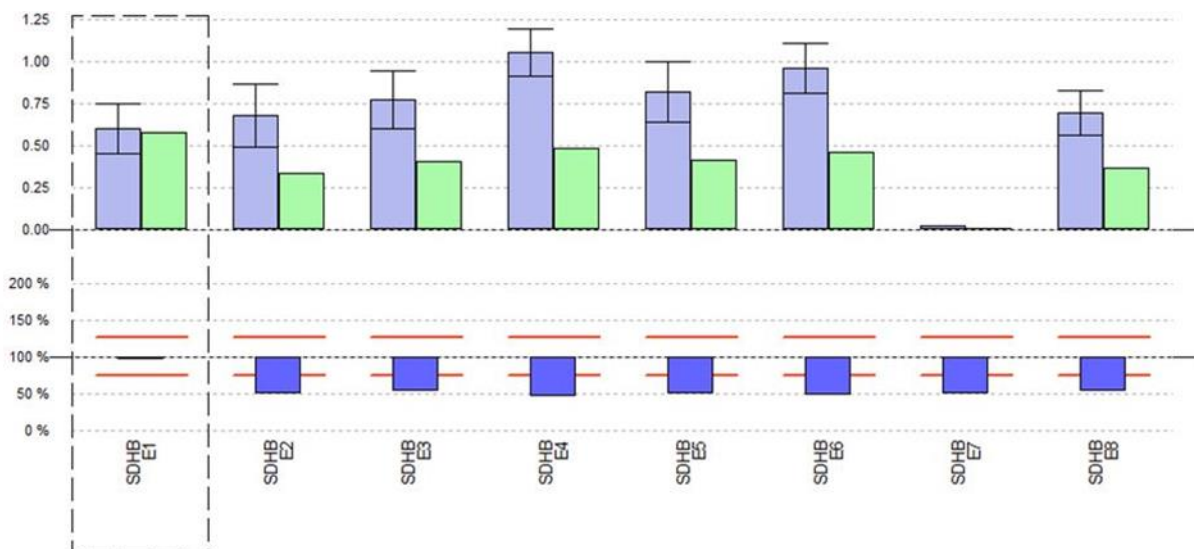


Abbildung 21: Darstellung der CNV-Analyse mit dem „SeqNext“ Modul von „SeqPilot“: Die roten Grenzwerte zeigen die Grenzwerte 75% = Deletion und 135% = Duplikation; die hellblauen Balken entsprechen der durchschnittlichen Coverage der Patientenkontrollproben (mit berechneter Standardabweichung), die hellgrünen Balken entsprechen der relativen Coverage des Patienten 32116

Ein Vergleich der weiteren Ergebnisse der CNV-Analyse für die anderen Patientenproben mit den MLPA Ergebnissen ergab keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Die Ergebnisse der MLPA für diese Patientenproben ließen sich mit der CNV-Analyse nicht bestätigen. Aus diesem Grund wurde die weitere Auswertung bzgl. der CNV abgebrochen. Um stabile reproduzierbare Daten zu gewährleisten, sind weitere Optimierungen und/oder verbesserte Software-Algorithmen nötig.

## 5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit verfolgte das Ziel der Etablierung eines diagnostischen Panels für die molekulargenetische Analyse von Genen, mit Relevanz für das Krankheitsbild eines hereditären Phäochromozytoms oder Paraganglioms. Für dieses Krankheitsbild ist eine Vielzahl an Varianten in 11 Genen bekannt, sodass eine genetische Untersuchung mit etablierten molekulargenetischen Methoden, wie der Sanger-Sequenzierung, sehr material- und zeitaufwendig ist [2, 5, 11, 12, 13, 14, 15, 16]. Mit dem Next Generation Sequencing sollen komplexe molekulargenetische Diagnosen vereinfacht werden, indem alle diagnostisch relevanten Gene parallel in einem Analysegang sequenziert werden. Die Validierung des NGS-Protokolls erfolgte anhand von 28 Patientenproben mit einem nachgewiesenen PCC oder PGL. Es erfolgte ein Vergleich aller nachgewiesenen Varianten mit den Ergebnissen aus der Sanger-Sequenzierung. Grundsätzlich hat die eingesetzte NGS-Methode das Potenzial, aus den Rohdaten auch Aussagen zu abweichenden Kopienzahlen (CNV) zu gewinnen. Für diese Auswertung wurde das Programm „SeqNext“ eingesetzt und die Ergebnisse mit denen aus der MLPA-Analyse verglichen. Weiterhin wurde eine Kosten- und Zeitanalyse durchgeführt, um die Wirtschaftlichkeit des NGS gegenüber der etablierten Sanger-Sequenzierung zu untersuchen.

### 5.1. Design und Optimierung des NGS-Protokolls „Phäochromozytom“

Mit dem entworfenen Primer-Panel können die elf Gene *KIF1B*, *MAX*, *NF1*, *RET*, *SDHAF2*, *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *TMEM127* und *VHL* in einem Analysegang untersucht werden. Von den fünf *in silico* Primer-Panels mit verschiedenen Einstellungen für das Exonpadding (Basen zwischen Primer und Exon) von 5 bp, 10 bp, 25 bp, 50 bp und 100 bp wurde nur das Primer Panel mit der größtmöglichen analytisch erfassbaren Zielsequenz (Coverage) der 11 Gene ausgewählt. Das *in silico* Primer-Panel mit einer Exonpadding-Einstellung von 10 bp und einer Gesamt-Coverage von 98,99% (s. Tabelle 18 im Abschnitt Ergebnisse) bot für alle 11 Gene die besten theoretischen Voraussetzungen zur Analyse der Zielsequenzen und wurde im praktischen Experiment getestet.

Aktuelle Studien mit besonderem Fokus auf diagnostisch relevante Gene für das Krankheitsbild von Phäochromozytomen und Paragangliomen beschreiben bei verschiedenen NGS-Plattformen (Illumina und Roche 454) ebenfalls, dass keine vollständige Analysierbarkeit der Gene zu erreichen war. Selbst die Ergebnisse der *in silico* Überprüfung der zu erreichenden Analysierbarkeit der einzelnen Exons im Vorfeld, wurden nicht bei jeder

Sequenzierung erfüllt. Die betroffenen Exons wurden mit der Sanger-Sequenzierung analysiert [20, 73, 74, 75].

Durch Veränderung der Exonpadding-Einstellung wird die analytische Erfassbarkeit der einzelnen Gene verbessert oder verschlechtert. Ein niedrigerer Coverage-Wert bedeutet nicht zwingend, dass weniger von der kodierenden Gensequenz analysiert werden kann, da die Zielsequenz sowohl das Exon als auch die flankierenden Basen entsprechend dem eingestellten Exonpadding beinhaltet.

Eine Erhöhung der Exonpadding-Einstellung z.B. auf 100 bp verbessert nicht immer die theoretische Analysierbarkeit eines Gens. Es entstehen zwar mehr Möglichkeiten für Primerbindestellen, aber auch die gesamte Zielsequenz wird größer. Hinzu kommt, dass die mit einer vergrößerten Exonpadding-Einstellung verbundene Verlängerung der primären Zielsequenz oft zur Erhöhung der notwendigen Amplikonanzahl und z.T. auch zu zusätzlichen Primer-Pools führt. Somit würde die Analyseeffizienz reduziert und die Vorteile des NGS durch zusätzliche Reaktionen teilweise wieder aufgehoben. Durch eine Vergrößerung des Exonpadding werden auch mehr Intronsequenzen sequenziert, die hinsichtlich der diagnostischen Fragestellung keine analytische Relevanz besitzen.

Der seit Juli 2016 neu geregelte einheitliche Bewertungsmaßstab (EBM) zur Vergütung von humangenetischen Leistungen besagt, dass im Rahmen einer Mutationssuche zum Nachweis oder Ausschluss einer krankheitsrelevanten, genomischen Variante, als Standardanalyse ohne weitere Genehmigung 25 Kilobasen kodierender Sequenz untersucht werden dürfen. Analysen von Intronsequenzen und zusätzlichen Basenpaaren werden nicht mehr erstattet und müssen beim Panel-Design für ein Labor, wie das der Bioglobe GmbH, für molekulargenetische Dienstleistungen aus wirtschaftlichen Gründen minimiert werden [91].

In Abbildung 22 sind die Auswirkungen unterschiedlicher Exonpadding-Einstellungen auf die *in silico* Designergebnisse am Beispiel des Exon 36 im *NF1*-Gen veranschaulicht.

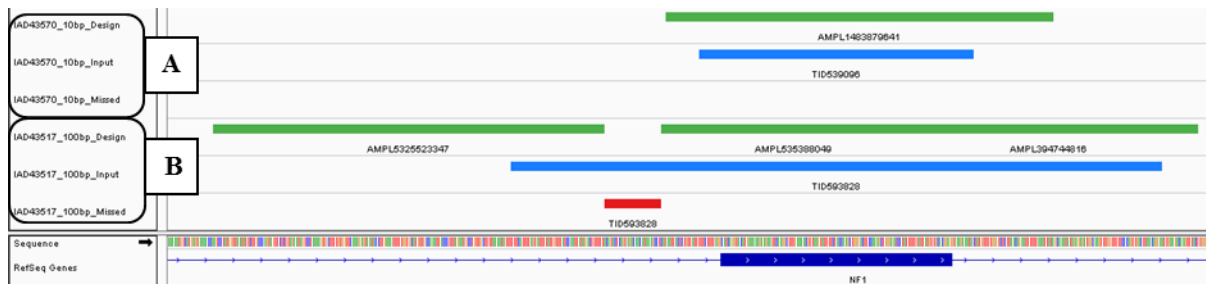


Abbildung 22: Auswirkungen des Exonpadding auf die Ergebnisse des *in silico* Primer Designs  
 Vergleich der *in silico* Primer-Panel A = IAD43570 (Exonpadding 10 bp) und B = IAD43517 (Exonpadding 100 bp) am Exon 36 im *NF1*-Gen: dunkelblauer Balken = Exon 36 des *NF1*-Gens; hellblaue Balken = Zielsequenz; grüne Balken = designte Amplikons; roter Balken = *in silico* nicht analysierbare Basen mit dem Primer-Panel B

Das neu etablierte NGS-Protokoll zur genetischen Analyse eines hereditären PCCs und PGLs wurde auf Basis des Standardprotokolls des Systemherstellers entwickelt [49].

Die Reaktionsbedingungen bei den Einzelschritten der Library-Preparation bis zur Sequenzierung wurden anhand der Ergebnisse der beiden Kontrollschritte, qPCR und Werte für die unangereicherten ISPs, optimiert. Ziel war es, Sequenzierungsdaten mit einer sehr guten Qualität und Spezifität zu generieren. Nach erfolgter Datenanalyse /-auswertung wurden die Ergebnisse mit denen der Sanger-Sequenzierung verglichen.

Die Qualität der Sequenzierungsdaten konnte anhand des Runreports bewertet werden und wird im Abschnitt 5.2. näher erläutert.

Die Spezifität der Daten basiert auf dem Primer Design. Die Auswertung mit „SeqNext“ zeigte, dass im *SDHA*-Gen vereinzelt auch Pseudogen-Sequenzen amplifiziert wurden. Durch angepasste Filtereinstellungen konnten diese Pseudogen-Sequenzen allerdings ausgeblendet werden. Falsch negative Ergebnisse wären somit möglich, konnten aber in diesem Fall durch Validierung mit der Sanger-Sequenzierung ausgeschlossen werden.

Andere Arbeitsgruppen, die am Krankheitsbild von PCCs und PGLs forschen, berichten von der Amplifikation von Pseudogenen sowohl beim *SHDA*- als auch beim *NF1*-Gen. So designten Rattenberry *et al.* für die verwendete Roche 454 NGS-Plattform eigene Primer, um die Amplifikation der sehr homologen *SDHA*-Pseudogene zu verhindern [74, 76, 77]. Bei dem Design des Gen-Panels für das Krankheitsbild „Phäochromozytom“ für die verwendete Ion Torrent-Plattform war dies nicht notwendig. Beim *NF1*-Gen wurden bei dem entwickelten NGS-Assay keine, durch die *NF1*-Pseudogene verursachten, Nebenprodukte beobachtet.

Um die Ausbeute an DNA-Fragmenten in den einzelnen Libraries zu erhöhen und somit bessere Ergebnisse in der Sequenzierung zu erzielen, wurde die Zyklenzahl der AmpliSeq-PCR von 18 auf 21 erhöht. Die empfohlene Zyklenzahl von 18 Zyklen richtete sich nach der

Anzahl der Primerpaare des Primer-Panels [49]. Für das selbstdesignte Primer-Panel musste die empfohlene Zyklenzahl (Pool 1: 137 und Pool 2: 132 Primerpaare; 97-192 Primerpaare = 18 Zyklen) angehoben werden, um das Messergebnis der unangereicherten ISPs nach der Emulsions-PCR (s. Tabelle 21 im Abschnitt Ergebnisse) und somit auch die Qualität der Sequenzdaten zu verbessern.

Die ermittelten Produktausbeuten zeigten, trotz gleicher Probenbehandlung aller Libraries, in vielen Fällen sehr diverse Werte zwischen 1.424.019.476 Kopien/  $\mu\text{L}$  (Patienten-Probe 2325, Primer-Pool 2) und 2.805.339.135 Kopien/  $\mu\text{L}$  (Patienten-Probe 40752, Primer-Pool 1) nach der qPCR (s. Abbildung 14 im Abschnitt Ergebnisse und Tabelle A23 und Abbildung A2 im Abschnitt Anhang). Ursachen hierfür können Variabilitäten beim Pipettieren oder der nicht exakte Einsatz von 10 ng als Ausgangsmaterial sein. In verschiedenen Multiplex-PCR-Ansätzen ist außerdem die Primer-Konzentration nicht immer 100% identisch. Außerdem kann durch das sehr hohe Multiplex-Niveau beim NGS eine wechselseitige Interaktion der Primer untereinander nie komplett ausgeschlossen werden. Schwierigkeiten bei den Multiplex-Ansätzen wurden auch bei Welander *et al.* bei Forschungen mit der Illumina-Plattform erwähnt, insbesondere bei Exons mit einem hohen GC-Gehalt [20, 78]. Auch die effektive Amplifikationsrate, die sowohl von der Produktlänge als auch der Sequenz abhängig ist, beeinflusst die Ausbeuten und ist nicht immer homogen. Um diese variablen PCR-Ausbeuten zu berücksichtigen, wurden die Library-Konzentrationen in einer Kontrollreaktion mittels q-PCR bestimmt. Besonders für die Sequenzreaktion ist ein Angleichen der Templatemengen in der Emulsions-PCR essentiell, um für alle in einer Reaktion analysierten Proben später ähnliche Datenmengen zu erhalten und zu verhindern, dass die Amplikons einer Library z.B. doppelt so viel sequenziert werden, als von einer anderen Library. Nur mit angeglichenen Templatemengen der Libraries ist die Qualität der Sequenzdaten für alle Libraries bzw. Proben gleich.

Im Verlauf der Arbeit zeigte sich die qPCR-basierte Prozesskontrolle als zwingend notwendig und wurde gegenüber dem Einsatz des Equalizer Kits zur Library-Angleichung bevorzugt. Mit dem Equalizer Kit sollten die einzelnen Libraries über mehrere Reaktionsschritte direkt auf eine Konzentration von 100 pM eingestellt werden. Das Kit wurde im Rahmen der Optimierungsmaßnahmen getestet, lieferte aber keine stabilen und zufriedenstellenden Ergebnisse. Daher wurde diese Methode nicht weiter verfolgt.

Der zweite Kontrollschritt zeigte die zu erwartende Qualität der Sequenzierungs-Ergebnisse. Der ermittelte Wert für die unangereicherten klonalen als auch die polyklonalen ISPs sollte, den Herstellerangaben entsprechend, idealerweise im Bereich zwischen 10-30% liegen [49].

Anfänglich variierte der Anteil der unangereicherten ISPs sehr stark zwischen 1,41-81,48% (s. Tabelle A24 im Abschnitt Anhang). Um stabilere Ergebnisse im Bereich zwischen 10-30% zu erreichen, wurde zusätzlich zu der Optimierung der PCR-Zyklenzahl von 18 auf 21 Zyklen, der OneTouch 2 während der Emulsions-PCR abgedeckt, um eine konstante Temperatur während der gesamten Reaktion zu gewährleisten. Dieser Schutz des Gerätes erwies sich als hilfreich, da der OT 2 in einem klimatisierten Raum direkt unter einem einströmenden kalten Luftstrom stand. Gleichzeitig wurden die Mengenverhältnisse der einzelnen Libraries für die Emulsions-PCR auf Grundlage der Ergebnisse der qPCR angepasst.

Die Library-Proben wurden hierfür auf 100 pM eingestellt. Die Herausforderung war hierbei, dass zwei Geräte, die nicht aufeinander abgestimmt waren, verwendet wurden. Das verwendete Real Time PCR System (ABI PRISM 7000) ist ein sehr altes Gerätesystem, welches im Basis-Protokoll des Systemherstellers nicht empfohlen wurde und für das es keinen wissenschaftlichen und technischen Support für NGS-Anwendung gab. Der empirische Korrekturfaktor war nach den Kit-Herstellerangaben (für den ABI PRISM 7000)  $280 \times 10^6$  Kopien, was einer Library-Konzentration von 100 pM entspricht [50]. Berechnungen mit diesem empirischen Korrekturfaktor für die Mengen der einzelnen Libraries in der Emulsions-PCR zeigten anschließend sehr diverse und instabile Werte für die unangereicherten ISPs von 1,41-74,07% (s. Tabelle A24 im Abschnitt Anhang). Anhand einer Anpassung des empirischen Korrekturfaktors von  $280 \times 10^6$  Kopien auf  $80 \times 10^6$  Kopien, konnten stabile Werte für die unangereicherten ISPs im Bereich von 10-30% erzielt werden (s. Tabelle 21 im Abschnitt Ergebnisse).

Diese Anpassung des empirischen Korrekturfaktors führte zu ausgewogeneren Sequenzierdaten mit besserer Qualität. Der ermittelte empirische Korrekturfaktor kann auch für Libraries, die anhand eines anderen Primer-Panels erstellt wurden, verwendet werden.

Die Ergebnisse für alle berechneten Kopienzahlen/  $\mu\text{L}$  in jeder Library sind im Anhang in Tabelle A23 und Abbildung A2 aufgeführt.

Bei den ersten Sequenzierungen in der Personal Genome Machine wurden im Gerät zu starke Temperaturschwankungen angezeigt. Das Messprinzip des Gerätes bei den Sequenzreaktionen auf dem Halbleiterchip beruht auf Messung der pH-Wert-Veränderung bei

jeder enzymatischen Verlängerung des DNA-Stranges um ein Nukleotid. Aufgrund der Temperaturabhängigkeit des pH-Wertes und den nur minimalen Änderungen, die das Analyseprinzip des PGM begründen, sollten Temperaturschwankungen bei der Analyse nicht größer als 1-2 Grad sein. Durch eine Einhausung des Gerätes wie beim OneTouch 2, wurde der Luftstrom der Klimaanlage abgeschirmt und klimaanlagenbedingte Schwankungen verhindert. Als weitere Anpassung während des Initialisierungs-Prozesses des PGM, wurde der Ausgangs-pH-Wert erhöht, um die Gerätekalibrierung zu beschleunigen.

Aufgrund von anderen Sequenzierungs-Messprinzipien bei Geräten der Illumina- oder Roche 454-Plattform, haben Temperaturschwankungen bei diesen Plattformen keinen Einfluss auf die Qualität der Sequenzierdaten [27].

## **5.2. Datenauswertung**

Nach den Optimierungsarbeiten sind 28 Proben mit sieben Sequenzierungen sequenziert worden (s. Tabelle 28). Zu jedem Sequenzierungslauf erstellte der PGM einen Runreport (s. Abbildung 16+17 und Tabelle 22 im Abschnitt Ergebnisse) mit einer ersten Übersicht über die Qualität des Sequenzierungslaufes und der Sequenzergebnisse. Eine rote „Heat Map“ mit vielen ISPs, die erfolgreich sequenziert wurden, gibt einen ersten Hinweis auf eine zufriedenstellende Datenqualität. Der Wert für die auswertbaren Reads sollte >50%, der Wert für die klonalen Reads >55% und der Wert für die polyklonalen Reads sollte unter 40% sein.

Aus der Erfahrung dieser Arbeit wurden diese Werte in der Mehrzahl der Experimente mit dem optimierten Protokoll erreicht (s. Tabelle 28). Sequenzierungen, die diese Werte nicht erreichen, stellen in der Regel eine geringere Datenqualität dar. Sie können aber trotzdem zuverlässig ausgewertet werden. Mit einem Wert von >50% für die polyklonalen Reads ist eine Auswertung der Daten nicht mehr sinnvoll.

Es wurden zusammengefügte Library-Proben mit einem Anteil an unangereicherten ISPs im Bereich von 9,56-28,54% sequenziert und anschließend erfolgreich ausgewertet. Aus statistischen und methodischen Gründen ist immer ein gewisser Anteil an ISPs unangereichert. Um vor allem klonale Reads in der Emulsions-PCR zu generieren, sind die Chemikalien, wie z.B. die ISPs zu den DNA-Fragmenten, im Überschuss vorhanden. Wird eine zu große Menge an DNA-Fragmenten in der Emulsions-PCR eingesetzt, ändert sich das Verhältnis DNA-Fragmente zu ISPs und es entstehen mehr polyklonale Reads [27]. Der in diesem Projekt beobachtete Schwankungsbereich von 9.56%-28,54% erscheint zunächst recht hoch, entspricht aber den Empfehlungen des Herstellers (10-30%) [49] und ist methodisch



erklärbar. Andererseits wird hier auch die insgesamt sehr hohe Stabilität und Robustheit der Methode gegenüber experimentellen Schwankungen deutlich, sodass hiermit die Grundlage für eine verlässliche Diagnostik gelegt ist.

Die Daten der Runreports für diese Sequenzierreaktionen sind in Tabelle 28 dargestellt.

Tabelle 28: Analysedaten der Sequenzierungen:

Sequenzierungs-Lauf ID, Chip-Größe, Anzahl der analysierten Proben, ISP-Beladung, Gesamtmenge der Reads, auswertbare Reads, klonale Reads, polyklonale Reads, mittlere Sequenzlänge

Sequenzierungs-Lauf ID	Chiptyp	Anzahl der analysierten Proben	ISP Beladung [%]	Gesamtmenge Reads	Auswertbare Reads [%]	Klonale Reads [%]	Polyklonale Reads [%]	Mittlere Sequenzlänge [bp]
20140429	318	7	80	5.364.148	60	74	26	189
20140430	318	7	40	2.640.495	63	87	13	171
20150520	316	4	84	2.589.999	49	55	45	191
20150521	316	4	82	2.977.485	58	61	39	195
20150608_1	316	4	75	3.248.882	69	73	27	182
20150608_2	316	4	83	2.777.480	53	57	43	193
20150630	316	4	78	3.671.570	75	79	21	191

Die Beladung mit den ISPs variierte bei sechs der sieben Analysen zwischen 75-84%. Der Wert von 40%, bei der zweiten Analyse beobachtet, wird als „Ausreißer-Wert“ betrachtet. Die ISP-Beladung zeigt als Wert die Anzahl der Ion Spheres, die auf dem Chip sequenziert werden konnten, gibt aber noch keine Aussage zur Datenqualität. Der Wert von 40% kann aus einem Verlust eines Teils der Probe während der Vorbereitung auf die Sequenzierreaktion resultieren. Weitere Ursachen können Fehler beim Pipettieren der Probe auf den Chip oder eine zu geringe Library-Menge als Template in der Emulsions-PCR sein. Trotz der mit 40% geringen Chip-Beladung und den dadurch weniger vorhandenen sequenzierbaren ISPs, zeigte die weitere Auswertung, dass die Sequenzdaten der einzelnen Libraries eine gute Qualität besaßen. Auch die Werte von 87% für die klonalen Reads und 13% bei den polyklonalen Reads zeigten die gute Datenqualität.

Die Gesamtmenge der Reads variierte zwischen 2.589.999 und 5.364.148 und berücksichtigte alle Reads, die zur Analyse zur Verfügung standen. Um die Datenqualität einschätzen zu können, musste sowohl die Beladung des Chips mit sequenzierbaren ISPs, die Gesamtmenge an Reads in Relation zur Chipgröße sowie die Anzahl der klonalen und polyklonalen Reads

betrachtet werden. Verdeutlicht werden kann dies z.B. am Sequenzierungs-Lauf „20150608\_1“ mit Werten von 75% bei der ISP Beladung und 3.248.882 als Gesamtmenge der Reads im Vergleich zum Sequenzierungs-Lauf „20150520“ mit Werten von 84% bei der ISP Beladung, aber nur 2.589.999 als Gesamtmenge der Reads. Der Sequenzierungs-Lauf „20150520“ hat eine höhere ISP Beladung, die Daten-Qualität der Sequenzierung ist jedoch schlechter (55% klonale Reads zu 45% polyklonale Reads) als die Daten-Qualität beim Lauf „20150608\_1“ (73% klonale Reads zu 27% polyklonale Reads). Dies erklärt, warum der Wert für die Gesamtmenge der Reads bei Lauf „20150520“, trotz höherer ISP Beladung, geringer ist, als beim Lauf „20150608\_1“ mit weniger ISP Beladung. Ein hoher Wert bei der ISP Beladung gibt somit keine Rückschlüsse auf die Qualität der erzeugten Daten, wohingegen die Menge der Gesamtzahl der Reads abhängig ist von der Qualität der erzeugten Daten.

Klonale Reads werden von ISPs erhalten, die während der Emulsions-PCR nur ein Fragment gebunden haben, welches klonal amplifiziert wurde. Polyklonale Reads werden von ISPs erhalten, die zwei oder mehr verschiedene Fragmente gebunden haben und somit eine „Mischsequenz“ besitzen, die zufällige Basendaten liefern und nicht sequenzspezifisch ausgewertet werden können. Für die sieben Sequenzreaktionen lagen die Werte für die klonalen Reads zwischen 55-87% und für die polyklonalen Reads zwischen 13-45%. Polyklonale Reads können verringert werden, indem das Volumen der Probe (zusammengefügte Libraries) für die Emulsions-PCR reduziert wird. Entsteht hier ein Ungleichgewicht zwischen den verfügbaren ISPs und einer zu hohen Menge an eingesetzten DNA-Fragmenten, können zu viele polyklonale Reads gebildet werden [27]. Allerdings können auch zu wenige DNA-Fragmente eingesetzt werden, sodass eine geringere Menge an klonalen Reads und somit ein sehr hoher Anteil an ISPs ohne gebundenes Template entsteht, was eine geringe Ausbeute an sequenzierbaren ISPs auf dem Chip bedeuten würde.

Als weiteres Merkmal für die Qualität der Daten wurde das Verhältnis der sequenzierten Reads der einzelnen Libraries untereinander kontrolliert, welches möglichst ausgeglichen sein sollte. Ist die Gesamtmenge der Reads bei einer Library deutlich höher als die der anderen Libraries aus einem Sequenzierungslauf, kann ein Fehler beim Zusammenfügen der Libraries aufgetreten sein. In der Emulsions-PCR würden somit mehr DNA-Fragmente dieser Library an die ISPs binden und könnten die DNA-Fragmente der anderen Libraries verdrängen. Auch die Verlässlichkeit der Ergebnisse sinkt mit einer niedrigen Repräsentanz der Amplikons für eine Probe.

Die mittlere Sequenzlänge variierte bei der Sequenzierung zwischen 171-195 bp und entsprach somit dem erwarteten und zu erreichenden Wert von Sequenzlängen von ca. 200 bp, die auch im *in silico* Design als Amplikonlänge festgelegt wurde [27].

Die Tabelle 22 im Abschnitt Ergebnisse zeigt die sieben ausgewerteten Sequenzierungsläufe mit guter Datenqualität sowie die Sequenzierungsläufe, die eine schlechte Datenqualität besaßen. Im Verlauf der Optimierungsmaßnahmen wurden viele Analysen bereits nach dem zweiten Kontrollschritt - der Bestimmung der unangereicherten ISPs - abgebrochen (s. Tabelle A24 im Abschnitt Anhang). Diese hohe Menge an sofort verworfenen Analysen und Analysen, die trotz schlechter Werte für die unangereicherten ISPs sequenziert wurden, ergibt sich durch die Komplexität des NGS-Protokolls. Es konnten nicht alle Reaktionsbedingungen der einzelnen Protokoll-Schritte gleichzeitig verändert werden. Die Protokoll Optimierung erfolgte über die schrittweise Veränderung/ Anpassung der Reaktionsbedingungen bei den einzelnen Protokoll-Schritten. Die vielen negativen Zwischenergebnisse besaßen somit eine wichtige Funktion, um für jeden Protokoll-Schritt die besten Reaktionsbedingungen herauszufinden.

### **5.3. Datenauswertung mit SeqPilot**

Die Auswertung der NGS-Rohdaten erfolgte mit dem Modul „SeqNext“ des Programmpaketes „SeqPilot“. Es wurden Software-Settings bzw. Analyseparameter verwendet, die vom Software-Hersteller speziell für die angewendete Methode des Ion Torrent angepasst sind [51]. Im Folgenden werden die wichtigsten Filtereinstellungen und der Einfluss deren Änderung auf die diagnostischen Ergebnisse betrachtet.

Der Ion PGM misst bei den Sequenzierreaktionen die pH-Wert-Veränderung bei der enzymatischen Verlängerung des DNA-Stranges durch ein Nukleotid. Die vier Nukleotide werden bei der Sequenzierung nacheinander über den Halbleiterchip gespült. Es werden keine terminierenden Nukleotide verwendet [27, 79]. Bei homopolymeren Sequenzmotiven ab ca. sechs gleichen aufeinanderfolgenden Basen in der Ausgangssequenz, ist es dem Gerät messtechnisch nicht mehr möglich, eine lineare Abhängigkeit der pH-Wert-Änderung von der Anzahl der inkorporierten Basen darzustellen. Diese Problematik wurde bei den Einstellungen für die Sequenzauswertung mit „SeqNext“ berücksichtigt. Ab drei gleichartigen Nukleotiden prüft das Programm auf eine mögliche homopolymere Struktur und bewertet unklare Sequenzabschnitte als „Homopolymer“. Alle Sequenzierergebnisse dieser homopolymeren Abschnitte müssen in jedem Fall vom Anwender kontrolliert werden, da die automatische

Auswertung aufgrund der Datenvariabilität nicht verlässlich genug ist. Gegebenenfalls musste mit der Sanger-Sequenzierung verifiziert werden. Neben der Ion Torrent-Plattform sind auch bei der Roche 454-Plattform Schwierigkeiten mit homopolymeren Sequenzmotiven bekannt. Rattenberry *et al.* berichteten z.B. von einem chemieabhängigen Problem, welches ein erhöhtes Risiko für falsch-positiv detektierte Varianten in diesen homopolymeren Sequenzabschnitten beinhaltet. Auch ein repetitives Sequenzmotiv wie „TTC TTC TTC“ führte bei der Verwendung der Roche 454-Plattform zu einer falschen Detektion einer Variante [74, 78]. Mit der Ion Torrent-Plattform wurden keine Schwierigkeiten mit repetitiven Sequenzmotiven für das hier untersuchte NGS-Assay beobachtet. Die Auswertung der Daten ergab, dass beim Ion PGM in den meisten Fällen, ab einer homopolymeren Region von sechs gleichen Nukleotiden in der Sequenz, Schwierigkeiten bei der Datenauswertung auftraten. Homopolymere Sequenzmotive unterscheiden sich häufig in ihrer Länge von Individuum zu Individuum und können demnach nicht aus der Datenanalyse ausgeschlossen werden. Einige der homopolymeren Sequenzmotive im Exonbereich der Gene mussten bei allen Patientenproben mit der Sanger-Sequenzierung überprüft werden. Im Methodenvergleich wurden allerdings auch bei der Sanger-Sequenzierung, bei homopolymeren Sequenzabschnitten ab ca. sieben bis zehn gleichartigen Nukleotiden, nicht eindeutig auswertbare Chromatogramme beobachtet. Dass homopolymere Sequenzmotive auch bei der Sanger-Sequenzierung eine Herausforderung darstellen, beschreibt Kieleczawa [80]. Bei einer guten Qualität der NGS-Sequenzierungsdaten war die Homopolymer-Problematik geringer, als bei schlechter Qualität der NGS-Sequenzierungsdaten.

Die subjektiv bewertete Qualität der Sequenzdaten aus den sieben guten Sequenzierungsläufen wurde in der Abbildung 20 im Abschnitt Ergebnisse für jedes Gen einzeln dargestellt. Die Kreisdiagramme schließen Bereiche und Exons mit ein, die aufgrund von mangelnder Qualität z.B. homopolymere Sequenzmotive oder nicht komplette Analysierbarkeit aufgrund des *in silico* Designs, in der Routine-Diagnostik mit der Sanger-Sequenzierung verifiziert wurden.

Um die Sequenzierung von homopolymeren Sequenzmotiven zu verbessern, sind seit kurzem verbesserte Kits auf dem Markt (so genannte „Hi-Q Chemie“). Für diese Arbeit wurde die neue Chemie nicht mehr getestet. Auch bei den Auswertprogrammen wird z.T. nachgebessert, um die Homopolymer-Problematik mit anderen Einstellungsmöglichkeiten besser lösen zu können [66].

Im Gen *NFI* kam es zudem bei allen 28 Patientenproben zu einem kompletten Amplikonausfall im Exon 43 des Gens (Abbildung 23). Die Anzahl der auswertbaren Sequenzen fiel unter die vorgenommene Coverage-Einstellung von mindestens 20 Reads pro Sequenzier-Richtung. Eine mögliche Ursache für diesen Amplikonausfall bei allen Patientenproben ist, dass das Primerpaar für dieses Amplikon durch das hohe Multiplexniveau (in einer Reaktion zusammengefasste Assays) von anderen Primerpaaren des Primerpools gehemmt wird und nicht so effizient bindet [20, 78]. Die Primer für die Primer-Panel werden nur *in silico* erstellt und nicht vor der Bestellung praktisch getestet.

Es wäre möglich, die Menge des Primerpaares für dieses Amplikon im Primer-Pool zu erhöhen, allerdings besteht gleichzeitig das Risiko, die Reaktionsbedingungen zu ändern und andere Primerpaare zu hemmen.



Abbildung 23: Fehlende Reads für das dritte Amplikon im Exon 43 des *NFI*-Gens:

Das Exon wird anhand von vier Amplikons analysiert.

A = Verhältnis der forward Reads (hellblau) zu den reverse Reads (lila); B = Anzahl der jeweils identischen Reads

Eine eingeschränkte PCR-Effizienz durch ein erhöhtes False-Priming-Potential dieser Primer wurde mittels PrimerBLAST-Analyse ausgeschlossen.

Die Auswertung der Daten erfolgte durch das manuelle Überprüfen aller von der „SeqNext“-Software reportierten Sequenzvarianten für alle Patienten. Den Einstellungen zufolge wurde eine Veränderung vom Programm als eine Variante eingestuft, wenn sie bei mehr als 5% der Reads an dieser Position auftrat. Dieser Wert von 5% erwies sich empirisch als sinnvoll. Wurde die Einstellung auf 3% gesetzt, erhöhten sich die falsch positiven Ergebnisse um den Faktor 1,8. Wenn die Veränderung unter dem Grenzwert von 5% lag oder nur in einer Richtung über mehr als 5% auftrat, wurde die Variante vom Programm als Artefakt eingestuft (s. Abbildung 19 im Abschnitt Ergebnisse). Solche Programmentscheidungen wurden jeweils

manuell kontrolliert. Außerdem war es die Operator-Entscheidung, ob bei Veränderungen, bei denen das Verhältnis Wildtyp-Base zur veränderten Base nicht ca. 50% zu 50% betrug, die Veränderung als Variante gewertet wurde oder nicht (s. Abbildung 19 im Abschnitt Ergebnisse und Abbildung 24). Auch Rattenberry *et al.* und Toledo *et al.* berichten in ihren Experimenten von Varianten, die heterozygot mit z.T. sehr variablen Häufigkeiten mit der Roche 454-Plattform nachgewiesen wurden [74, 78].

Besonders im Bereich der Problematik mit den Homopolymeren haben z.B. die Geräte der NGS-Plattform von Illumina Vorteile gegenüber der Ion Torrent-Plattform. Bei der NGS-Plattform von Illumina werden, anders als bei der Ion Torrent-Plattform, alle vier Nukleotide gleichzeitig über eine Glasplatte mit den gebundenen DNA-Fragmenten der Libraries gespült. Bei diesen Nukleotiden handelt es sich um terminierende Nukleotide, die zusätzlich einen Fluoreszenzfarbstoff gebunden haben. Nach jedem Flutungs-Durchgang über die Glasplatte werden mit einer Kamera die fluoreszierenden Farbstoffe detektiert und anschließend die Blockgruppe enzymatisch abgespalten. Durch diese Technik können auch homopolymere Sequenzmotive besser sequenziert werden. Methodisch bedingt sind modifizierte, terminierende Nukleotide und eine Fluoreszenzdetektion mittels Laser notwendig, wodurch die Kosten bei der Sequenzierung mit Geräten der Illumina-Plattform höher sind, als bei Geräten der Ion Torrent-Plattform [27, 66, 74].

#### **5.4. Validierung des Next Generation Sequencing**

Für die Validierung der Ergebnisse mit dem neu etablierten NGS-Assay wurden alle 28 Proben parallel mit der Sanger-Sequenzierung analysiert.

Der Vergleich (s. Tabelle 23+24 im Abschnitt Ergebnisse) ergab, dass insgesamt mit der Sanger-Sequenzierung 120 Varianten und mit dem NGS 115 Varianten in den untersuchten Genen nachgewiesen wurden. Diese Zahlen berücksichtigen jedoch noch nicht die unterschiedlichen Primerbindungsstelle der zwei verschiedenen Methoden. Nur 96 aller nachgewiesenen Varianten befinden sich in dem Bereich, der mit beiden Methoden erfassbar war. In diesem vergleichbaren Analysebereich wurden mit der Sanger-Sequenzierung 92 Varianten und mit dem NGS 95 Varianten nachgewiesen (s. Tabelle 29).

Tabelle 29: Übersicht über die nachgewiesenen Varianten in den untersuchten Genen mit den Methoden der Sanger-Sequenzierung und dem NGS

\* Unter vergleichbaren Analysebereichen sind die Sequenzabschnitte zu verstehen, die von beiden Methoden äquivalent erfasst wurden

Gene	Gesamtzahl aller nachgewiesenen Varianten		mit beiden Methoden identisch nachgewiesene Varianten		Anzahl der nachweisbaren Varianten im vergleichbaren* Analysebereich
	Sanger	NGS	Sanger	NGS	Sanger/ NGS
<i>NF1</i>	15	18	13	13	13
<i>VHL</i>	10	9	9	9	9
<i>SDHA</i>	25	27	21	22	23
<i>SDHB</i>	6	8	6	8	8
<i>SDHC</i>	3	5	1	1	1
<i>SDHD</i>	6	10	6	6	6
<i>SDHAF2</i>	1	1	1	1	1
<i>RET</i>	10	9	8	8	8
<i>TMEM127</i>	1	1	1	1	1
<i>MAX</i>	5	2	2	2	2
<i>KIF1B</i>	38	25	24	24	24
<b>Insgesamt</b>	<b>120</b>	<b>115</b>	<b>92</b>	<b>95</b>	<b>96</b>

Die folgenden fünf Varianten wurden nur mit einer der beiden Methoden nachgewiesen, obwohl sie im vergleichbaren Analysebereich lagen (s. Tabelle 23+24 im Abschnitt Ergebnisse).

1.) c.1-83insC → *SDHA*-Gen → nur mit der Sanger-Sequenzierung nachgewiesen

In dem Sequenzbereich ist eine homopolymere C-Region, die mit dem PGM nicht eindeutig ausgewertet werden konnte und mit der Sanger-Sequenzierung überprüft wurde.

2.) c.1064+10A>G → *SDHA*-Gen → nur mit NGS nachgewiesen

3.) c.1064+79C>A → *SDHA*-Gen → nur mit NGS nachgewiesen

Beide Varianten stellen Beispiele für potenzielle Artefakte der NGS-Methodik (s. Abbildung 24) dar und müssten weiter validiert werden. Die Häufigkeit (s. Abbildung 24), mit der die Variante in 12 der 28 Patientenproben gefunden wurde, weist eher auf ein Artefakt als eine somatische Mutation hin. Das Vorliegen einer somatischen Mutation ist außerdem unwahrscheinlich, da es sich beim untersuchten Material um EDTA-Blutproben handelte und nicht um Tumorgewebe. Ein Polymorphismus mit dieser Häufigkeit wäre in den Datenbanken registriert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht abschließend geklärt werden, ob es sich bei den beiden Varianten wirklich um Artefakte handelt.

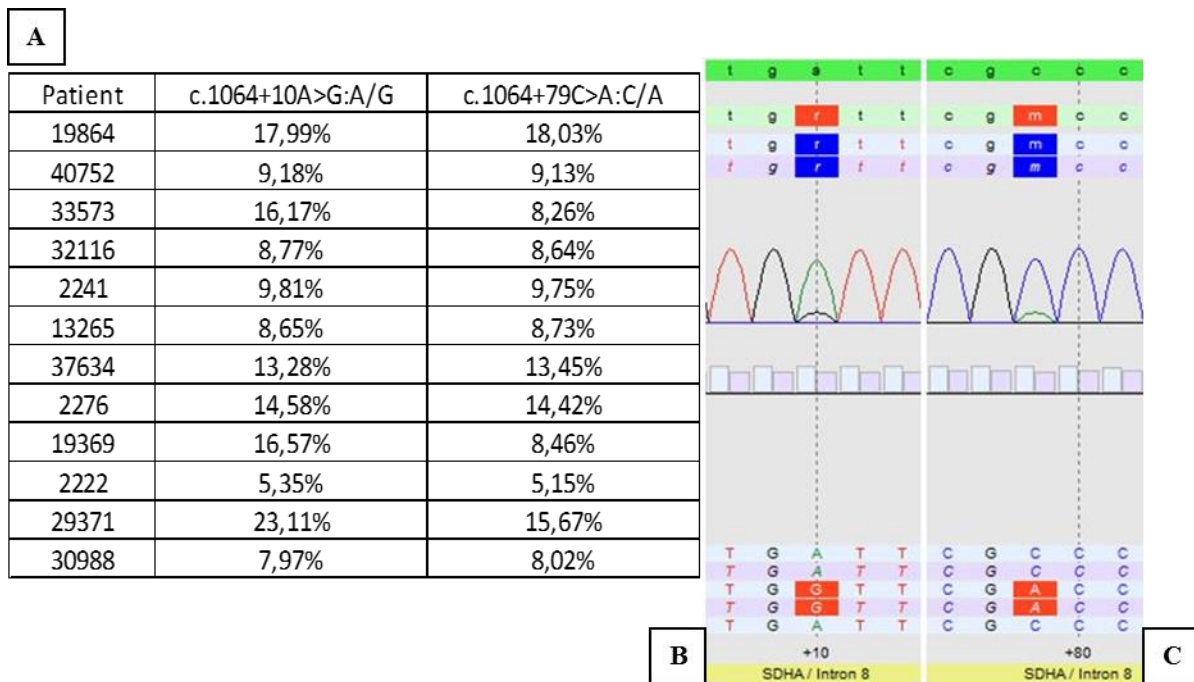


Abbildung 24: Übersicht über zwei nur mit dem NGS im *SDHA*-Gen nachgewiesene Varianten c.1064+10A>G und c.1064+79C>A  
 A = Relative Häufigkeiten, mit der die Sequenzvarianten in den einzelnen Analysen nachgewiesen wurden; B + C = graphische Darstellung der beiden Varianten c.1064+10A>G (B) und c.1064+79C>A (C) des Patienten 2276

- 4.) c.200+33G>A → *SDHB*-Gen → nur mit NGS nachgewiesen
- 5.) c.200+35G>A → *SDHB*-Gen → nur mit NGS nachgewiesen

Diese beiden Varianten waren mit der Sanger-Sequenzierung nicht nachweisbar, da der forward Primer in der Sequenzreaktion aufgrund einer homopolymeren T-Region in der Zielsequenz nicht effizient binden konnte und somit das Sequenzprodukt nicht vollständig ausgewertet werden konnte. Die Sequenzierdaten, die mit dem reverse Primer erhalten wurden, sind nicht bis +33 bp bzw. +35 bp auswertbar.

Über die Sensitivität müssen bedingte Aussagen getroffen werden. Aus den oben genannten Ergebnissen (s. Tabelle 29) würde die Sensitivität der Sanger-Sequenzierung mit vier nicht nachgewiesenen Varianten nur mit ca. 96% bewertet werden. Allerdings sind in diesen vier Varianten die zwei möglichen NGS-Artefakte enthalten, die nicht abschließend geklärt werden konnten. Die anderen beiden Varianten hätten durch ein neues Design der Primer für das Exon 2 des *SDHB*-Gens vermutlich nachgewiesen werden können, wobei sich beide Varianten im diagnostisch nicht mehr relevanten Bereich außerhalb von +/- 10 bp befinden [53]. Im diagnostisch relevanten Bereich entspricht die Sensitivität der Sanger-



Sequenzierung somit 100%. Mit einer nicht nachgewiesenen Variante ist die Sensitivität des NGS mit 99% zu bewerten. Im diagnostisch relevanten Bereich ist sie sogar 100%. Sollte eine Überprüfung der beiden potenziellen NGS-Artefakte diesen Verdacht nicht bestätigen, wäre das NGS gegenüber der Sanger-Sequenzierung sogar als sensitiver anzusehen.

Crona *et al.* berichten von einer großen Variantenvielfalt des NGS im Vergleich zur Sanger-Sequenzierung und somit einer Sensitivität zwischen 83-100% mit verschiedenen Auswerteprogrammen. Nur mit einem Auswerteprogramm konnten 100% der pathogenen Varianten identifiziert werden [76]. Rattenberry *et al.* beschreiben für ihr anhand von Exon und Intron Varianten validiertes NGS-Assay für das Krankheitsbild „Phäochromozytom“, eine Sensitivität von 98,7% [73, 74]. Diese 98,7% entsprechen der Sensitivität von ca. 99% für das in dieser Arbeit entwickelte NGS-Assay, wobei das NGS-Assay von Rattenberry *et al.* nicht die beiden großen Gene *NFI* und *KIF1B* sowie die Exons 8, 14 und 15 des *RET*-Gens enthält [74].

#### **5.4.1. Validierung des Next Generation Sequencing in den kodierenden Gen-Bereichen sowie jeweils 10 bp der flankierenden Intronsequenz als molekulargenetischer Test**

Um zu prüfen, inwieweit das NGS die Möglichkeit bietet, die Erfordernisse eines diagnostischen Labortests hinsichtlich Spezifität und Sensitivität zu erfüllen, sind vor allem die nachgewiesenen Varianten in den Exonbereichen und exonnahen Intronbereichen entscheidend. Für den exonnahen Intronbereich wurden die 10 bp der flankierenden Intronsequenz zu jeder Seite des Exons betrachtet. Diese Region entspricht dem ausgewählten Exonpadding beim Assaydesign und beinhaltet auch den von Caminsky *et al.* beschriebenen Bereich, in dem Spleißmutationen am häufigsten auftreten [53].

Die Ergebnisbetrachtung zeigt, dass in dem für die molekulare Diagnostik relevanten Sequenzbereich der Exons eine nahezu 100%ige Übereinstimmung der nachgewiesenen Varianten mit beiden Methoden vorliegt. Im exonnahen Intronbereich von +/-10 bp wurde eine Variante nur mit dem NGS nachgewiesen. Hierbei handelt es sich um die oben bereits beschriebene Variante c.1064+10A>G im *SDHA*-Gen.

Das neu etablierte NGS-Protokoll für das Krankheitsbild eines hereditären Phäochromozytoms oder Paraganglioms erfüllt somit im momentan klinisch relevanten Sequenzbereich mit 10 bp der flankierenden Intronsequenz zu jeder Seite des Exons zu nahezu 100% die Anforderungen eines molekulargenetischen Tests. Allerdings müssen bei

der Auswertung der NGS-Daten mit großer Vorsicht die Ergebnisse manuell bewertet werden. Sie ist somit sehr zeitaufwendig.

### **5.5. Bewertung der nachgewiesenen Nonsense-, Missense- und Silent-Varianten**

Insgesamt wurden 2 Nonsense-, 18 Missense-, 31 Silent- und 92 Intron-Varianten mit der Sanger-Sequenzierung und dem NGS nachgewiesen.

Während die 92 Intron-Varianten im Anhang aufgeführt sind (s. Tabelle A25), werden die Nonsense-, Missense- und Silent-Varianten im Folgenden genauer betrachtet und auf eine mögliche Krankheitsrelevanz für hereditäre Phäochromozytome und Paragangliome hin untersucht. Die Bewertung erfolgte mithilfe der HGMD Datenbank, den *in silico* Anwendungstools „Mutation Taster“, „PolyPhen2“ und „MutPred“ sowie der *Minor Allele Frequency* (MAF) aus dem 1000 Genom Projekt oder - bei zwei Varianten - aus dem Exome Aggregation Consortium (ExAC). „Mutation Taster“, „PolyPhen2“ und „MutPred“ sind *in silico* Anwendungstools, welche das Potenzial einer Sequenzvariante bewerten und ihre Pathogenität vorhersagen können. Es werden sowohl strukturelle als auch funktionelle Auswirkungen berücksichtigt.

„Mutation Taster“ und „PolyPhen2“ wurden als *in silico* Tools verwendet, da es sich um weit verbreitete Anwendungstools bei der Bewertung von unklaren Varianten handelt, die auch bei der Bioglobe GmbH verwendet werden. Aktuelle Studien an diagnostisch relevanten Genen für das Krankheitsbild „Phäochromozytom“ mit dem NGS, z.B. von Bennedbaek *et al.* und Fishbein *et al.*, verwenden ebenfalls die *in silico* Anwendungstools „PolyPhen2“ und „Mutation Taster“ zur Bewertung von Varianten, die nicht in den Literaturdaten beschrieben sind [81, 82]. Anders als in den erwähnten Studien, wurde „MutPred“ als drittes Anwendungstool ausgewählt, weil es bei einem Vergleich von Walters-Sen *et al.* von 17 verschiedenen Vorhersage-Tools aus dem Jahr 2014 die besten Vorhersagen zur Pathogenität von Sequenzvarianten erzielte [54].

Tabelle 30: Bewertung der nachgewiesenen Nonsense-Varianten

Die *in silico* Tools „PolyPhen2“ und „MutPred“ konnten nicht angewendet werden, da es keine Eingabemöglichkeit für ein Stopcodon gab.

Gen	Nr.	Variante	rs-Nummer	Beschreibung der Variante	Mutation Taster	Bewertung
<i>SDHB</i>	1	c.761dupC (p.Lys255*)	-	Phäochromozytom → krankheitsverursachende Mutation (HGMD; CI062283) [59]	krankheitsverursachend	höchstwahrscheinlich krankheits-assoziiierend
<i>SDHD</i>	2	c.14G>A (p.Trp5*)	rs104894310	Phäochromozytom → krankheitsverursachende Mutation (HGMD; CM020972) [58]	krankheitsverursachend	höchstwahrscheinlich krankheits-assoziiierend

Tabelle 31: Bewertung der nachgewiesenen Missense-Varianten:

- \*<sup>1</sup> Minor Allelfrequenz basierend auf Daten des 1000 Genom Projektes
- \*<sup>2</sup> pathologisch/ Polymorphismus/ unklar
- \*<sup>3</sup> Gastrointestinaler Stromatumor
- \*<sup>4</sup> keine Literaturdaten verfügbar
- \*<sup>5</sup> Minor Allelfrequenz basierend auf Daten des Exome Aggregation Consortium (ExAC)

Gen	Nr.	Variante	rs-Nummer	Beschreibung der Variante	dbSNP MAF <sup>*1</sup>	Mutation Taster	PolyPhen2	MutPred	Bewertung <sup>*2</sup>
<i>VHL</i>	1	c.193T>A (p.Ser65Thr)	-	somatische Mutation → krankheitsverursachende Mutation [68]	-	möglicherweise krankheitsverursachend	möglicherweise schädliche	möglicherweise krankheits-assoziiert	0/0/3
	2	c.256C>T (p.Pro86Ser)	rs398123481	Von Hippel-Lindau Syndrom → krankheitsverursachende Mutation (HGMD; CM952019) [65]	-	krankheitsverursachend	wahrscheinlich schädlich	höchstwahrscheinlich krankheits-assoziiert	3/0/0
	3	c.292T>C (p.Tyr98His)	rs5030809	Von Hippel-Lindau Syndrom → krankheitsverursachende Mutation (HGMD; CM941370) [63]	-	krankheitsverursachend	wahrscheinlich schädlich	höchstwahrscheinlich krankheits-assoziiert	3/0/0
	4	c.347T>C (p.Leu116Pro)	-	nachgewiesen bei einem Patienten mit PCC → krankheitsverursachende Mutation? [2]	-	krankheitsverursachend	möglicherweise schädliche	höchstwahrscheinlich krankheits-assoziiert	2/0/1
	5	c.407T>G (p.Phe136Cys)	rs5030833	Von Hippel-Lindau Syndrom → krankheitsverursachende Mutation (HGMD; CM941377) [58]	C=0.000008/1 → 0,0008% (ExAC) <sup>*5</sup>	möglicherweise krankheitsverursachend	wahrscheinlich schädlich	höchstwahrscheinlich krankheits-assoziiert	2/0/1
	6	c.453C>G (p.Ile151Met)	-	Hämangioblastom → krankheitsverursachende Mutation (HGMD; CM108929) [64]	-	krankheitsverursachend	wahrscheinlich schädlich	höchstwahrscheinlich krankheits-assoziiert	3/0/0
	7	c.467A>G (p.Tyr156Cys)	rs397516441	Phäochromozytom → krankheitsverursachende Mutation; (HGMD; CM020981) [58, 63]	-	Polymorphismus	wahrscheinlich schädlich	höchstwahrscheinlich krankheits-assoziiert	2/1/0
	8	c.593T>A (p.Leu198Gln)	-	Phäochromozytom → krankheitsverursachende Mutation (HGMD; CM020982) [58]	-	krankheitsverursachend	wahrscheinlich schädlich	höchstwahrscheinlich krankheits-assoziiert	3/0/0
<i>SDHA</i>	9	c.113A>T (p.Asp38Val)	rs34635677	benigne → nicht für PCCs und PGLs beschrieben; assoziiert mit GIST <sup>*3</sup> Tumoren (ClinVar; Variation ID: 224957) [67]	T=0.0186/93 → 1,86%	Polymorphismus	benigne	höchstwahrscheinlich nicht krankheits-assoziiert	0/3/0
	10	c.1799G>A (p.Arg600Gln)	rs1126568	nachgewiesen bei einer Patientin mit einem PGL → krankheitsverursachende Mutation? [71]	A=0.00004/2 → 0,004% (ExAC) <sup>*5</sup>	krankheitsverursachend	wahrscheinlich schädlich	möglicherweise krankheits-assoziiert	2/0/1
	11	c.1969G>A (p.Val657Ile)	rs6962	wahrscheinlich benigne → Polymorphismus (ClinVar; Variation ID: 130279) [69]	A=0.1753/878 → 17,53%	möglicherweise Polymorphismus	benigne	höchstwahrscheinlich nicht krankheits-assoziiert	0/2/1
<i>SDHD</i>	12	c.34G>A (p.Gly12Ser)	rs3467591	Paragangliom → krankheitsverursachende Mutation? (HGMD; CM003169) [60, 61]	A=0.0050/25 → 0,50%	möglicherweise krankheitsverursachend	benigne	höchstwahrscheinlich nicht krankheits-assoziiert	0/2/1
	13	c.149A>G (p.His50Arg)	rs11214077	Paragangliom → krankheitsverursachende Mutation? (HGMD; CM022444) [61]	G=0.0066/33 → 0,66%	krankheitsverursachend	wahrscheinlich schädlich	höchstwahrscheinlich nicht krankheits-assoziiert	2/1/0
<i>RET</i>	14	c.1901G>A (p.Cys634Tyr)	rs75996173	Multiple endokrine Neoplasie 2A → krankheitsverursachende Mutation (HGMD; CM941237) [58]	T=0.000008/1 → 0,0008% (ExAC) <sup>*5</sup>	krankheitsverursachend	wahrscheinlich schädlich	höchstwahrscheinlich krankheits-assoziiert	3/0/0
	15	c.2071G>A (p.Gly691Ser)	rs1799939	assoziiert mit Hirschsprung-Krankheit → krankheitsassoziierter Polymorphismus (HGMD; CM023821) [62]	A=0.1691/847 → 16,91%	Polymorphismus	benigne	höchstwahrscheinlich nicht krankheits-assoziiert	0/3/0
<i>KIF1B</i>	16	c.1930A>C (p.Lys644Gln)	-	keine Literaturdaten verfügbar <sup>*4</sup>	-	krankheitsverursachend	wahrscheinlich schädlich	höchstwahrscheinlich nicht krankheits-assoziiert	2/1/0
	17	c.2107T>C (p.Trp703Arg)	rs551543997	benigne; ClinVar; Variation ID: 240956; keine Literaturdaten verfügbar <sup>*4</sup>	C=0.0054/27 → 0,54%	krankheitsverursachend	wahrscheinlich schädlich	höchstwahrscheinlich nicht krankheits-assoziiert	2/1/0
	18	c.3260A>G (p.Tyr1087Cys)	rs2297881	Polymorphismus [70]	G=0.0397/199 → 3,97%	möglicherweise Polymorphismus	wahrscheinlich schädlich	höchstwahrscheinlich nicht krankheits-assoziiert	1/1/1

Tabelle 32: Bewertung der nachgewiesenen Silent-Varianten nach den Kriterien A-C

\*<sup>1</sup> A.) die Allelfrequenz ist auffallend niedrig (< 1%); B.) Splice Site Prediction zeigte keine Veränderungen und C.) die nachgewiesene Variante wurde nur bei einzelnen der untersuchten Populationen beim 1000 Genom Projekt nachgewiesen

\*<sup>2</sup> keine Literaturdaten verfügbar

\*<sup>3</sup> Minor Allelfrequenz basierend auf Daten des Exome Aggregation Consortium (ExAC)

Gen	Nr.	Variante	rsNummer	dbSNP MAF (Minor Allele Frequency)	Bewertung
NF1	1	c.168C>T (p.Ser56=)	rs17881168	T=0.0046/23 → 0,46%	eine krankheitsrelevante Variante kann nicht ausgeschlossen werden* <sup>1</sup>
	2	c.696A>G (p.Thr232=)	rs368691517	G=0,00007/9 → 0,007%* <sup>3</sup>	eine krankheitsrelevante Variante kann nicht ausgeschlossen werden* <sup>1</sup>
	3	c.702G>A (p.Leu234=)	rs1801052	G=0.4882/2445 → 48,82%	höchstwahrscheinlich ein Polymorphismus
	4	c.2034G>A (p.Pro678=)	rs2285892	A=0.4968/2488 → 49,68%	höchstwahrscheinlich ein Polymorphismus
	5	c.3468C>T (p.Asn1156=)	rs147955381	T=0.0010/5 → 0,10%	eine krankheitsrelevante Variante kann nicht ausgeschlossen werden* <sup>1</sup>
SDHA	6	c.309A>G (p.Ala103=)	rs1139424	G=0.2400/1202 → 24%	höchstwahrscheinlich ein Polymorphismus
	7	c.619A>C (p.Arg207=)	rs6555055	C=0.2474/1239 → 24,74%	höchstwahrscheinlich ein Polymorphismus
	8	c.684T>C (p.Asn228=)	rs2115272	C=0.2474/1239 → 24,74%	höchstwahrscheinlich ein Polymorphismus
	9	c.891T>C (p.Pro297=)	rs1126417	T=0.3466/1736 → 34,66%	höchstwahrscheinlich ein Polymorphismus
	10	c.1026G>T (p.Val342=)	-	-	keine Literaturdaten verfügbar* <sup>2</sup>
	11	c.1038C>G (p.Ser346=)	rs1041949	G=0.2578/1291 → 25,78%	höchstwahrscheinlich ein Polymorphismus
	12	c.1305G>T (p.Leu435=)	rs150831951	T=0.0152/76 → 1,52%	höchstwahrscheinlich ein Polymorphismus
	13	c.1680G>A (p.Thr560=)	rs10039029	A=0.2484/1244 → 24,84%	höchstwahrscheinlich ein Polymorphismus
	14	c.1752A>G (p.Ala584=)	rs77210621	G=0.2484/1244 → 24,84%	höchstwahrscheinlich ein Polymorphismus
15	c.1932G>A (p.Val644=)	rs6961	A=0.3353/1679 → 33,53%	höchstwahrscheinlich ein Polymorphismus	
SDHB	16	c.18C>A (p.Ala6=)	rs2746462	G=0.0429/215 → 4,29%	höchstwahrscheinlich ein Polymorphismus
	17	c.24C>T (p.Ser8=)	rs148738139	A=0.0012/6 → 0,12%	eine krankheitsrelevante Variante kann nicht ausgeschlossen werden* <sup>1</sup>
	18	c.300T>C (p.Ser100=)	rs11541235	G=0.0004/2 → 0,04%	eine krankheitsrelevante Variante kann nicht ausgeschlossen werden* <sup>1</sup>
SDHD	19	c.204C>T (p.Ser68=)	rs9919552	T=0.1134/568 → 11,34%	höchstwahrscheinlich ein Polymorphismus
RET	20	c.2307G>T (p.Leu769=)	rs1800861	G=0.2875/1440 → 28,75%	höchstwahrscheinlich ein Polymorphismus
	21	c.2418C>T (p.Tyr806=)	rs553418132	T=0.0002/1 → 0,02%	eine krankheitsrelevante Variante kann nicht ausgeschlossen werden* <sup>1</sup>
	22	c.2508C>T (p.Ser836=)	rs1800862	T=0.0359/180 → 3,59%	höchstwahrscheinlich ein Polymorphismus
	23	c.2712C>G (p.Ser904=)	rs1800863	G=0.1725/864 → 17,25%	höchstwahrscheinlich ein Polymorphismus
TMEM127	24	c.621G>A (p.Ala207=)	rs3852673	T=0.1394/698 → 13,94%	höchstwahrscheinlich ein Polymorphismus
KIF1B	25	c.285C>G (p.Ala95=)	rs12402052	G=0.2300/1152 → 23%	höchstwahrscheinlich ein Polymorphismus
	26	c.1227G>A (p.Thr409=)	rs17034660	A=0.0411/206 → 4,11%	höchstwahrscheinlich ein Polymorphismus
	27	c.3708G>A (p.Gly1236=)	rs374156057	A=0,000008/1 → 0,0008%* <sup>3</sup>	eine krankheitsrelevante Variante kann nicht ausgeschlossen werden* <sup>1</sup>
	28	c.4161A>G (p.Pro1387=)	rs12125492	G=0.0803/402 → 8,03%	höchstwahrscheinlich ein Polymorphismus
	29	c.4458C>T (p.Pro1486=)	rs147066476	T=0.0004/2 → 0,04%	eine krankheitsrelevante Variante kann nicht ausgeschlossen werden* <sup>1</sup>
	30	c.5112A>G (p.Ala1704=)	rs75413741	G=0.0018/9 → 0,18%	eine krankheitsrelevante Variante kann nicht ausgeschlossen werden* <sup>1</sup>
	31	c.5163C>A (p.Thr1721=)	rs11121552	A=0.2316/1160 → 23,16%	höchstwahrscheinlich ein Polymorphismus

Beide Nonsense-Varianten c.761dupC (p.Lys255\*) im *SDHB*-Gen des Patienten 29334 und c.14G>A (p.Trp5\*) im *SDHD*-Gen des Patienten 37684 sind in der HGMD Datenbank von Neumann *et al.* und Benn *et al.* als krankheitsauslösende Varianten für ein Phäochromozytom aufgeführt [58, 59].

Die nachgewiesenen Missense-Varianten wurden auf Basis der Ergebnisse der *in silico* Anwendungstools „Mutation Taster“, „Poly Phen2“ und „MutPred“ sowie der bei dbSNP angegebenen *Minor Allele Frequency* (MAF) basierend auf dem 1000 Genome Project bewertet.

Von den insgesamt 18 nachgewiesenen Missense-Varianten sind sechs Varianten in der HGMD Datenbank als krankheitsrelevante Mutationen im Zusammenhang mit dem von Hippel-Lindau Syndrom, einem Phäochromozytom oder der Multiplen Endokrinen Neoplasie 2A beschrieben [15, 58, 63, 65].

Waren Missense-Varianten nicht in der Datenbank HGMD aufgeführt, wurde eine Bewertung der Variante anhand der Ergebnisse der verwendeten Simulationsprogramme „Mutation Taster“, „PolyPhen2“ und „MutPred“ vorgenommen. Diese Ergebnisse wurden für eine eigene Bewertungsskala verwendet. In dieser wurde eine Zählung von „0“ bis „3“ Punkten in den Beurteilungskriterien „pathologisch/ Polymorphismus/ unklar“ verteilt, entsprechend der Ergebnisse der drei Anwendungstools.

Die Ergebnisse können allerdings in allen Fällen nur als Unterstützung für eine Einschätzung der Variante genutzt werden. Für eine fundierte diagnostische Bewertung sind die Ergebnisse solcher *in silico* Anwendungstools in den meisten Fällen zu divers. Dies wird am Beispiel der Variante c.149A>G (p.His50Arg) des *SDHD*-Gens deutlich. Die Ergebnisse der *in silico* Tools waren zweimal pathologisch und einmal Polymorphismus. In diesem Fall kann nur die Tendenz zu „möglicherweise pathologisch“ ausgesprochen werden. Im Fall der Variante c.113A>T (p.Asp38Val) des *SDHA*-Gens haben alle drei Anwendungstools übereinstimmende Ergebnisse. Die Tendenz weist hierbei auf einen nicht-pathologischen Polymorphismus hin. Bei nicht vorhandenen Literaturdaten ist eine exakte diagnostische Einschätzung der Missense-Varianten nicht möglich! In diesen Fällen wird auf die Überprüfung der Variante bei Eltern und/ oder Geschwistern verwiesen.

Russell *et al.* berichten über eine nachgewiesene, unklassifizierte Variante im *VHL*-Gen einer Patientin mit einem metastasierenden Phäochromozytom. Verschiedene *in silico* Anwendungstools zeigten keine übereinstimmenden Ergebnisse. Dieselbe Variante sowie PCCs wurden auch in einer Verwandten ersten Grades nachgewiesen. Obwohl eine

Familienanamnese vorzuliegen scheint, werden in der Studie weitere funktionelle Studien angeraten, bevor eine endgültige Bewertung der Variante erfolgen kann [83].

Alle der insgesamt 31 nachgewiesenen Silent-Varianten wurden anhand der, in dbSNP und - in zwei Fällen - im Exome Aggregation Consortium (ExAC) angegebenen, *Minor Allele Frequency* (MAF) bewertet. Alle Varianten, die mit einer Allelfrequenz (MAF) von >1% in der Allgemeinbevölkerung auftreten, wurden als Variante mit ausreichendem Beleg für eine nicht-pathogene Wirkung und somit als Polymorphismus gewertet. Insbesondere, weil Phäochromozytome sehr seltene Tumore sind, die mit einer Häufigkeit von nur ca. 0,0002-0,0008% in der Bevölkerung auftreten [56]. Der Begriff Variante wird hierbei als neutraler Begriff für eine nachgewiesene Veränderung in der Sequenz verwendet. Besitzt eine Variante eine Frequenz von >1% in der Gesamtbevölkerung, wird sie allgemein hin als Polymorphismus bezeichnet [57]. Diese Klassifizierung traf auf 21 der 31 Silent-Varianten zu (s. Tabelle 32). Für eine der 31 Varianten war keine Angabe zur MAF verfügbar. Es konnte somit auch keine weitere Bewertung erfolgen (s. Tabelle 32). Die anderen 7 Varianten besitzen eine MAF von <1% und besitzen somit eine unklare Signifikanz. Eine Krankheitsrelevanz kann nicht ausgeschlossen werden (s. Tabelle 32). Weitere Untersuchungen mit dem *in silico* Anwendungstool „Splice Site Prediction“ für diese 7 Varianten zeigten keine Veränderungen wie z.B. neu entstandene Spleißstellen.

Insgesamt wurden in 21 der 28 Patientenproben heterozygote Missense- oder Nonsense-Varianten nachgewiesen. In einer Patientenprobe wurde eine heterozygote Deletion der Exons 2-8 im *SDHB*-Gen nachgewiesen. In 7 Patientenproben wurden keine Missense- oder Nonsense-Varianten gefunden (s. Tabelle 33).

Tabelle 33: Übersicht über die krankheitsrelevanten Varianten in den einzelnen Patientenproben:

Alle nachgewiesenen Varianten waren heterozygot

<sup>1</sup> assoziiert mit Haemangioblastom

<sup>2</sup> assoziiert mit Hirschsprung-Krankheit

<sup>3</sup> unklare Signifikanz: bisher in der Literatur nicht beschrieben; mit *in silico* Tools untersucht

<sup>4</sup> in der Literatur aufgeführt

Nr.	Patienten ID	Varianten	Referenzen
1	34718	<i>SDHA</i> : c.1969G>A (p.Val657Ile) <sup>4</sup>	[69]
2	18087	<i>RET</i> : c.2071G>A (p.Gly691Ser) <sup>2</sup>	[62]
3	31173	<i>VHL</i> : c.292T>C (p.Tyr98His) <sup>4</sup> ; <i>RET</i> : c.2071G>A (p.Gly691Ser) <sup>2</sup>	[62, 63]
4	4159	-	
5	2325	<i>VHL</i> : c.453C>G (p.Ile151Met) <sup>1</sup> ; <i>RET</i> : c.2071G>A (p.Gly691Ser) <sup>2</sup> ; <i>KIF1B</i> : c.1930A>C (p.Lys644Gln) <sup>3</sup>	[62, 64]
6	2328	-	
7	37327	<i>VHL</i> : c.347T>C (p.Leu116Pro) <sup>4</sup> ; <i>SDHA</i> : c.1969G>A (p.Val657Ile) <sup>4</sup>	[2, 69]
8	18477	<i>KIF1B</i> : c.3260A>G (p.Tyr1087Cys) <sup>4</sup>	[70]
9	29244	<i>SDHA</i> : c.1969G>A (p.Val657Ile) <sup>4</sup>	[69]
10	19864	-	
11	40752	<i>VHL</i> : c.467A>G (p.Tyr156Cys) <sup>4</sup>	[58, 63]
12	33573	<i>RET</i> : c.2071G>A (p.Gly691Ser) <sup>2</sup>	[62]
13	30772	<i>VHL</i> : c.193T>A (p.Ser65Thr) <sup>4</sup> ; <i>KIF1B</i> : c.2107T>C (p.Trp703Arg) <sup>3</sup>	[68]
14	29334	<i>SDHB</i> : c.761dupC (p.Lys255*) <sup>4</sup> ; <i>RET</i> : c.2071G>A (p.Gly691Ser) <sup>2</sup>	[59, 62]
15	37684	<i>SDHD</i> : c.14G>A (p.Trp5*) <sup>4</sup> ; <i>RET</i> : c.2071G>A (p.Gly691Ser) <sup>2</sup>	[58, 62]
16	31365	<i>VHL</i> : c.407T>G (p.Phe136Cys) <sup>4</sup> ; <i>RET</i> : c.2071G>A (p.Gly691Ser) <sup>2</sup> ; <i>SDHA</i> : c.1969G>A (p.Val657Ile) <sup>4</sup>	[58, 62, 69]
17	32116	<i>SDHB</i> : Exon 2-8 deletiert	
18	2241	<i>SDHD</i> : c.149A>G (p.His50Arg) <sup>4</sup> ; <i>SDHA</i> : c.113A>T (p.Asp38Val) <sup>4</sup>	[61, 67]
19	13265	<i>SDHA</i> : c.1799G>A (p.Arg600Gln) <sup>4</sup>	[71]
20	2272	-	
21	37634	-	
22	2276	<i>SDHD</i> : c.34G>A (p.Gly12Ser) <sup>4</sup>	[60, 61]
23	19369	<i>VHL</i> : c.256C>T (p.Pro86Ser) <sup>4</sup> ; <i>SDHA</i> : c.1969G>A (p.Val657Ile) <sup>4</sup>	[65, 69]
24	2222	<i>VHL</i> : c.593T>A (p.Leu198Gln) <sup>4</sup> ; <i>SDHA</i> : c.1969G>A (p.Val657Ile) <sup>4</sup>	[58, 69]
25	2607	-	
26	29371	<i>RET</i> : c.2071G>A (p.Gly691Ser) <sup>2</sup>	[62]
27	30988	<i>RET</i> : c.1901G>A (p.Cys634Tyr) <sup>4</sup> ; <i>RET</i> : c.2071G>A (p.Gly691Ser) <sup>2</sup> ; <i>SDHA</i> : c.1969G>A (p.Val657Ile) <sup>4</sup>	[58, 62, 69]
28	2973	-	

In den 7 Proben, in denen keine Missense- oder Nonsense-Varianten identifiziert wurden, müssten weitere Untersuchungen in anderen Genen vorgenommen werden. Es könnten auch mRNA Untersuchungen durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob z.B. tief-intronische Spleißvarianten ein „pathologisches“ Transkript generieren.

2011 berichteten Welander *et al.*, dass etwa 30% der Phäochromozytome und Paragangliome hereditär sind [1]. Eine neue Studie aus dem Jahr 2015 von Burnichon *et al.* besagt sogar 40% und empfiehlt aus diesem Grund einen Gentest für alle Patienten mit einem nachgewiesenen PCC oder PGL [84]. Zusätzlich sind auch *de novo* Mutationen möglich, beim *RET*-Gen z.B. bei ≤ 5% der Patienten mit einer MEN2A und in ca. 50% der Patienten mit einer MEN2B [72]. Beim *VHL*-Gen sind ca. 20% der Erkrankungen auf eine *de novo* Mutation

zurückzuführen [10]. Für die anderen Gene sind keine Daten bekannt. In jedem Fall ist jedoch eine Panel-Untersuchung auch in Fällen sinnvoll, bei denen keine Familienanamnese vorliegt. In einer Studie aus dem Jahr 2014 wird z.B. berichtet, dass bei mindestens 25% aller Patienten mit einem scheinbar sporadischen und nicht-syndromalen PCC oder PGL, eine unentdeckte genetische Veränderung vorliegt [85].

Hinzu kommt, dass eine Phänotyp-Genotyp Korrelation meist nur in wenigen Fällen festgestellt werden kann (s. Tabelle 8 im Abschnitt Aktueller Stand der Forschung). Casey *et al.* konnten z.B. in einer untersuchten Patienten-Kohorte (31 Patienten) mit einem PCC oder PGL bei ca. einem Drittel eine genetische Veränderung nachweisen. Allerdings war eine Phänotyp-Genotyp Korrelation nur in ca. 50% dieser Patienten vorhanden. Aus diesem Grund ist eine Panel-Untersuchung, mit der mehrere diagnostisch relevante Gene parallel analysiert werden können, von großem Vorteil [86].

### **5.6. MLPA und CNV-Analyse**

Mit der MLPA wurden die acht Gene *MAX*, *NF1*, *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHAF2* und *VHL* auf große Deletionen und Duplikationen hin untersucht. Für die drei Gene *KIF1B*, *RET* und *TMEM127* sind bisher keine kommerziellen Sondenmixe verfügbar. Dem Fokus der Arbeit entsprechend, die NGS-Methodik zu etablieren, wurden keine Sonden zur MLPA-Charakterisierung dieser drei Gene neu entwickelt.

Eine Analyse der 28 Patientenproben mittels MLPA auf große Deletionen und Duplikationen ergab, dass nur in der Patientenprobe 32116 eine Deletion der Exons 2-8 des *SDHB*-Gens (s. Abbildung 12 und Tabelle 27 im Abschnitt Ergebnisse) nachgewiesen werden konnte. Die Sequenzierungsergebnisse unterstützen diesen Befund, da alle für den Patienten 32116 nachgewiesenen Varianten im *SDHB*-Gen homozygot waren. Alle anderen Patientenproben waren ohne Befund bezüglich der MLPA-Analyse.

NGS-Analysen haben das Potenzial, CNV bei der Datenauswertung zu identifizieren. Dabei werden bei „SeqNext“ die Daten eines Gens einzeln semiquantitativ gegen ein anderes Gen aus demselben Sequenzierungslauf verglichen [51]. Somit könnte das NGS beide Methoden, die Sanger-Sequenzierung und die MLPA ersetzen (s. Abbildung 25). Für die CNV-Datenanalyse ist es besonders wichtig, die Templatemengen der einzelnen Libraries anzugleichen, um eine gesicherte Aussage über eine Duplikation oder Deletion treffen zu können.



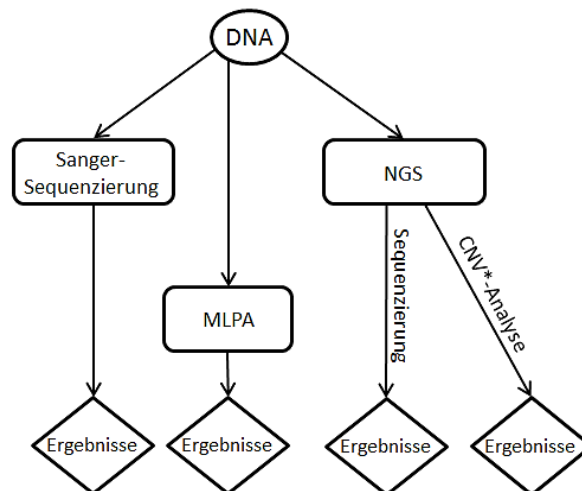


Abbildung 25: Schematische Darstellung der drei verwendeten Methoden und den daraus resultierenden Ergebnissen: \*CNV = Kopienzahl-Veränderung

Über diese CNV-Auswertung war es möglich, den Befund bei dem Patienten 32116 zu bestätigen (s. Abbildung 21 im Abschnitt Ergebnisse). Die weiteren CNV-Analysen waren jedoch nicht zufriedenstellend und konnten die MLPA Ergebnisse für die restlichen Patientenproben nicht reproduzieren. Aus diesem Grund wurde die weitere Auswertung der CNV-Analysen abgebrochen.

Andere Studien mit verschiedenen NGS-Plattformen berichten, dass zusätzlich zur NGS-Analyse die MLPA angewendet wurde, um größere Deletionen und Duplikationen nachweisen zu können [74, 78, 82, 86, 87, 88]. Toledo *et al.* und Rattenberry *et al.* berichten in ihren Forschungsergebnissen, dass die MLPA als Ergänzung zum NGS notwendig war, um Veränderungen der Kopienzahl nachweisen zu können [74, 78].

Da methodisch die Voraussetzungen für eine CNV-Analyse gegeben sind (äquivalente DNA-Konzentrationen aller Proben und Konzentrationen der Primer), sollten die beobachteten Abweichungen der Ergebnisse ihren Ursprung in den Auswertalgorithmen haben. Im Rahmen der Arbeit wurde jedoch keine Softwareentwicklung angestrebt.

Daher bleibt zum jetzigen Zeitpunkt die MLPA die Methode der Wahl zum Nachweis großer Deletionen und Duplikationen für das Krankheitsbild Phäochromozytom und Paragangliom.

## 5.7. Wirtschaftliche Betrachtungen: Zeit- und Kostenanalyse Sanger-Sequenzierung vs. NGS

Neben den technisch-methodischen Aspekten ist für den Einsatz in der Routineanwendung auch die Wirtschaftlichkeit einer Methode von großer Bedeutung. Daher wird im Folgenden eine vergleichende Zeit- und Kostenanalyse für die beiden Methoden erstellt. Zu Grunde gelegt wird hier die optimale Verfügbarkeit der Laborgeräte (100%; entsprechen acht Thermocyclern, einem Pipettierroboter, zwei 3500xL Genetic Analyzern und einem Ion Torrent PGM-System). Die sich technisch ergebenden zusätzlichen Mehrarbeiten für die Umsetzung des NGS-Protokolls durch „Nachsängern“, sowie der Aufwand für die MLPA-Analyse, sind entsprechend berücksichtigt. Die Zeit- und Kostenanalyse basiert auf dem im Rahmen der Arbeit entwickelten NGS-Panels für das Krankheitsbild „Phäochromozytom“.

Für die Zeit- und Kostenanalyse wurden die drei verschiedenen Chipgrößen, 314er, 316er und 318er Chip, des Ion PGM als Vergleichsbasis herangezogen. Als Berechnungsgrundlage wurde die Panel-Größe von 46,48 kb und die Coverage mit einem Wert von 1000 Reads je möglicher Variante festgesetzt.

Es wurden jeweils eine 100%ige Auslastung der Chips mit Patientenproben vorausgesetzt.

Die sich aus der Chipgröße und Chipanzahl ergebende Anzahl von Patientenproben wurde für die Berechnung der Vergleichskosten mit der Sanger-Sequenzierung und der MLPA angewendet.

Für alle drei Methoden setzt sich die Funktion für die Kostenberechnung aus der Patientenanzahl, den Chemikalien- und den Verbrauchsmaterialkosten zusammen. Bei den Chemikalien- und Verbrauchsmaterialkosten wurden aktuelle Einkaufspreise verwendet.

Als Basis dienten bei der Sanger-Sequenzierung, der MLPA und dem NGS bis zur Emulsions-PCR die Kosten der Chemikalien, berechnet für eine Sequenzierreaktion in einem Well einer 96well-Mikrotiterplatte. Für die elf Gene zusammen wurden je Patient ca. 160 Sequenzierreaktionen (ca. 160 Exons) in eine Richtung und 320 Sequenzierreaktionen in beide Richtungen zur Analyse benötigt (s. Abbildung 27 und 29). Vor der Emulsions-PCR werden die einzelnen Patientenproben entsprechend der verwendeten Chipgröße zusammengefasst. Die Chemikalienkosten wurden für alle weiteren Arbeitsschritte, bezogen auf die Menge an möglichen Emulsion-PCRs, Anreicherungen, Kontrollschritten und Sequenzierungen, berechnet, die mit den einzelnen Kits möglich waren.

Um eine effiziente Chemikalienverwertung zu gewährleisten, müssen und können mit dem Ion PGM je Geräte-Initialisierung zwei Chips sequenziert werden (s. Abbildung 26-31).

Für die Zeitanalyse wurden von allen drei verwendeten Methoden die Gerätelaufzeiten und die Dauer der Arbeitsschritte ermittelt und in Abhängigkeit zur Patientenzahl berechnet (s. Abbildung 26 und 28). Es wurden bei der Sanger-Sequenzierung, der MLPA und dem NGS keine Wiederholungen für fehlgeschlagene Reaktionen berücksichtigt.

Es wurden die Arbeitszeit und die Auswertzeit in der Berechnung berücksichtigt. Für die Auswertzeit ist zu bedenken, dass der Auswertzeit-Aufwand, je nach verwendeter Software und Automatisierung der Prozesse, variieren kann. Die Zeit- und Kostenanalyse wurde jeweils für die Sanger-Sequenzierung nur in eine Richtung (Laborpraxis) und in beide Richtungen (entsprechend dem NGS) berechnet.

Als abschließendes Fallbeispiel wurde eine nicht 100%ige sondern nur 40%ige Auslastung des mittleren 316er Chips betrachtet. Dies entspricht acht Patientenproben und somit vier Patientenproben auf beiden 316er Chips.

## Zeitanalyse Sanger-Sequenzierung in eine Richtung vs. NGS

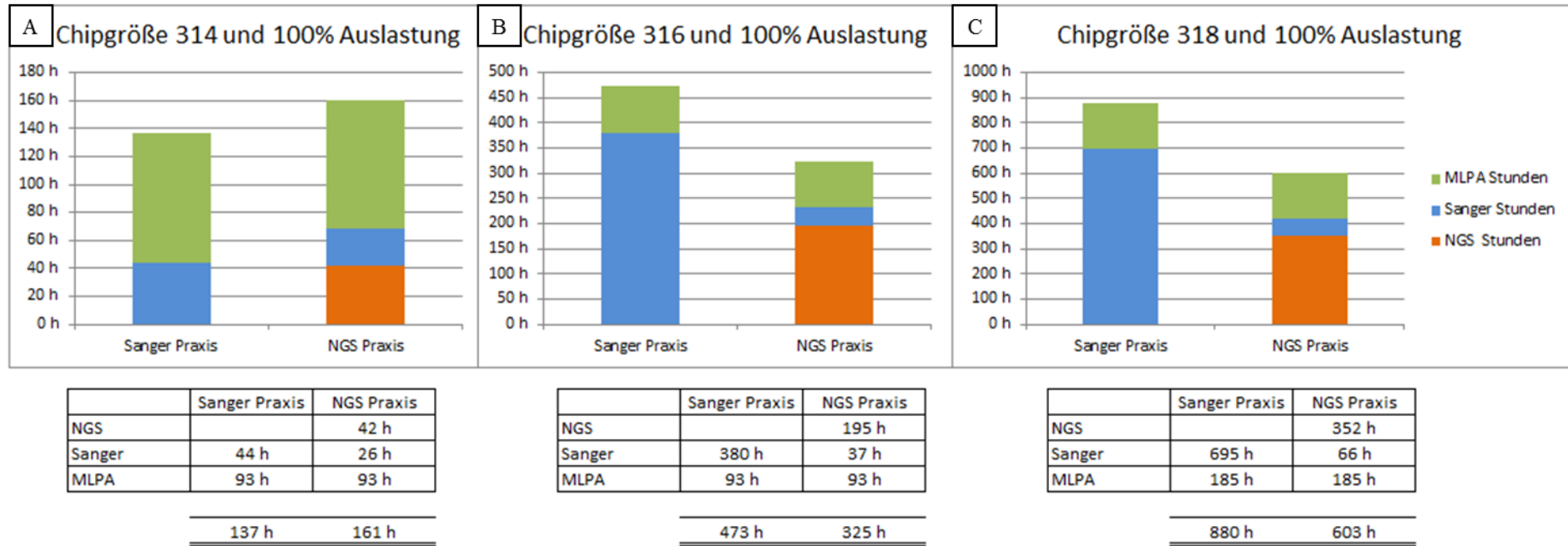


Abbildung 26: Darstellung der Arbeitszeitanalyse für die Sanger-Sequenzierung in nur eine Richtung vs. NGS in der Praxis bei 100% verfügbarer Laborgeräte:

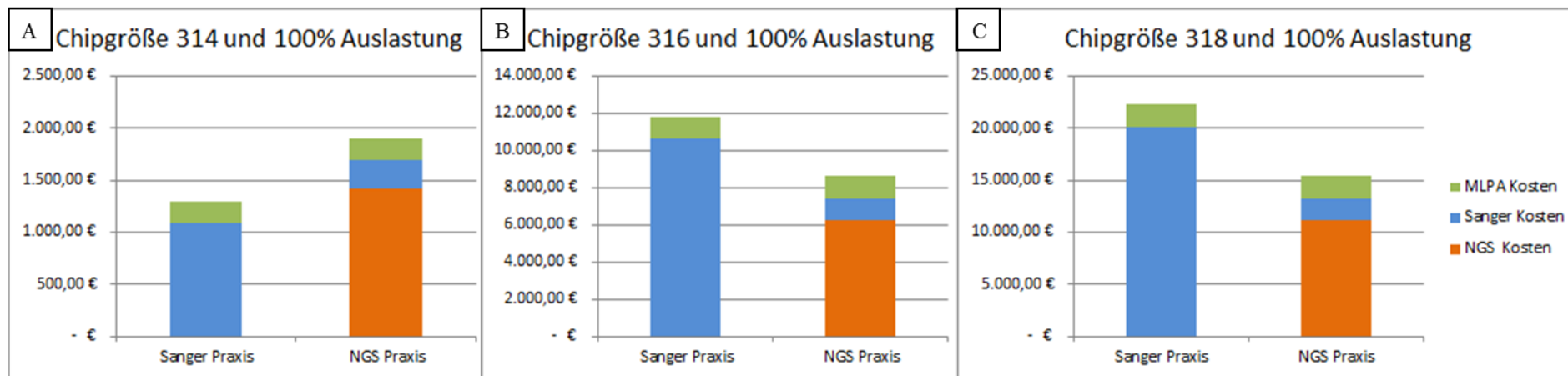
Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Skalierungen der Diagramme separat gewählt.

A = 2 Patienten (1 Patient je Chip); verwendete Chipgröße 2x314 mit 100% Auslastung

B = 20 Patienten (10 Patienten je Chip); verwendete Chipgröße 2x316 mit 100% Auslastung

C = 38 Patienten (19 Patienten je Chip); verwendete Chipgröße 2x318 mit 100% Auslastung

## Kostenanalyse Sanger-Sequenzierung in eine Richtung vs. NGS



	Sanger Praxis	NGS Praxis
NGS		1.420,32 €
Sanger	1.090,76 €	279,52 €
MLPA	208,53 €	208,53 €

1.299,29 €    1.908,37 €

	Sanger Praxis	NGS Praxis
NGS		6.272,23 €
Sanger	10.620,62 €	1.166,66 €
MLPA	1.198,46 €	1.198,46 €

11.819,08 €    8.637,35 €

	Sanger Praxis	NGS Praxis
NGS		11.136,51 €
Sanger	20.150,68 €	2.053,85 €
MLPA	2.188,43 €	2.188,43 €

22.339,11 €    15.378,79 €

Abbildung 27: Darstellung der Kostenanalyse für die Sanger-Sequenzierung in nur eine Richtung vs. NGS in der Praxis bei 100% verfügbarer Laborgeräte:

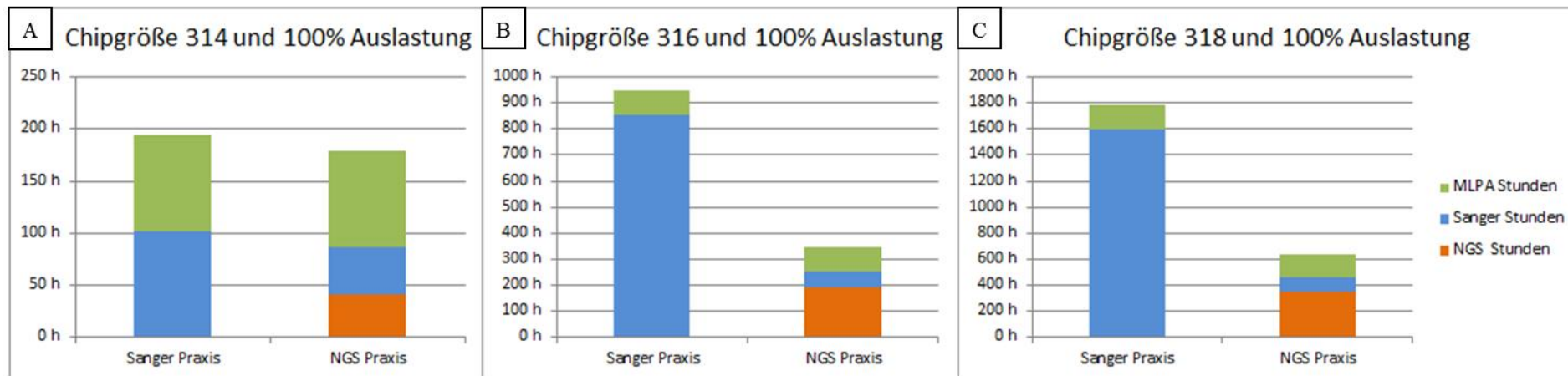
Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Skalierungen der Diagramme separat gewählt.

A = 2 Patienten (1 Patient je Chip); verwendete Chipgröße 2x314 mit 100% Auslastung

B = 20 Patienten (10 Patienten je Chip); verwendete Chipgröße 2x316 mit 100% Auslastung

C = 38 Patienten (19 Patienten je Chip); verwendete Chipgröße 2x318 mit 100% Auslastung

## Zeitanalyse Sanger-Sequenzierung in beide Richtungen vs. NGS



	Sanger Praxis	NGS Praxis
NGS		42 h
Sanger	102 h	45 h
MLPA	93 h	93 h
	<u>195 h</u>	<u>180 h</u>

	Sanger Praxis	NGS Praxis
NGS		195 h
Sanger	853 h	57 h
MLPA	93 h	93 h
	<u>946 h</u>	<u>345 h</u>

	Sanger Praxis	NGS Praxis
NGS		352 h
Sanger	1599 h	106 h
MLPA	185 h	185 h
	<u>1784 h</u>	<u>643 h</u>

Abbildung 28: Darstellung der Arbeitszeitanalyse für die Sanger-Sequenzierung in beide Richtungen vs. NGS in der Praxis bei 100% verfügbarer Laborgeräte:

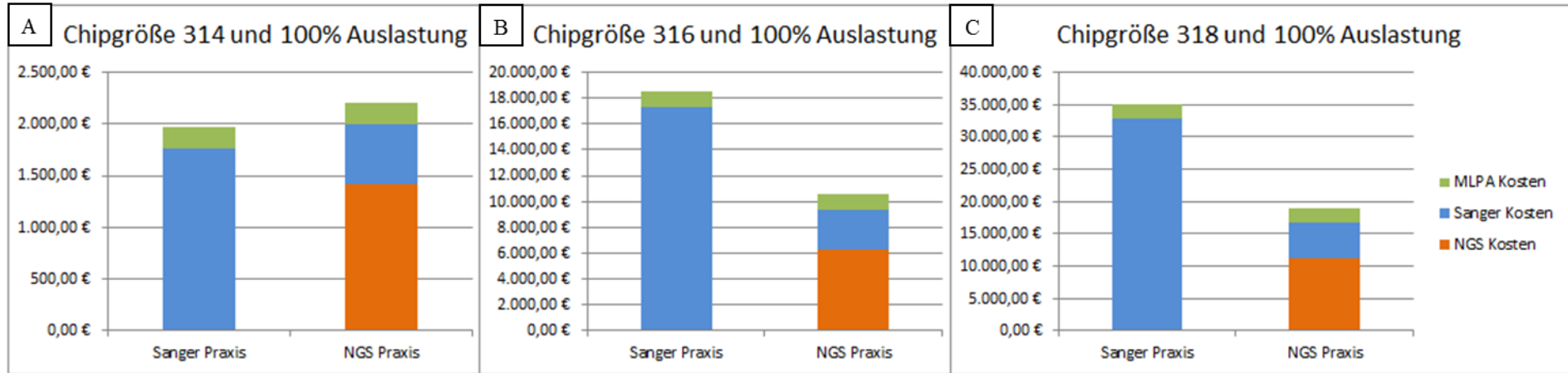
Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Skalierungen der Diagramme separat gewählt.

A = 2 Patienten (1 Patient je Chip); verwendete Chipgröße 2x314 mit 100% Auslastung

B = 20 Patienten (10 Patienten je Chip); verwendete Chipgröße 2x316 mit 100% Auslastung

C = 38 Patienten (19 Patienten je Chip); verwendete Chipgröße 2x318 mit 100% Auslastung

## Kostenanalyse Sanger-Sequenzierung in beide Richtungen vs. NGS



	Sanger Praxis	NGS Praxis
NGS		1.420,32 €
Sanger	1.761,58 €	572,28 €
MLPA	208,53 €	208,53 €

1.970,11 €    2.201,13 €

	Sanger Praxis	NGS Praxis
NGS		6.272,23 €
Sanger	17.328,74 €	3.080,24 €
MLPA	1.198,46 €	1.198,46 €

18.527,20 €    10.550,93 €

	Sanger Praxis	NGS Praxis
NGS		11.136,51 €
Sanger	32.898,47 €	5.590,61 €
MLPA	2.188,43 €	2.188,43 €

35.086,90 €    18.915,55 €

Abbildung 29: Darstellung der Kostenanalyse für die Sanger-Sequenzierung in beide Richtungen vs. NGS in der Praxis bei 100% verfügbarer Laborgeräte:

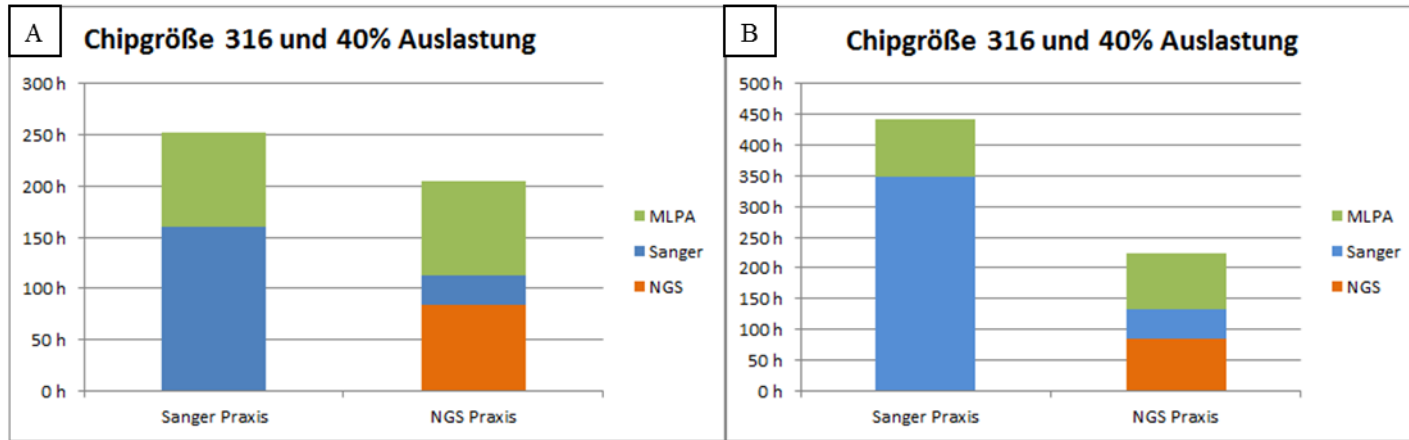
Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Skalierungen der Diagramme separat gewählt.

A = 2 Patienten (1 Patient je Chip); verwendete Chipgröße 2x314 mit 100% Auslastung

B = 20 Patienten (10 Patienten je Chip); verwendete Chipgröße 2x316 mit 100% Auslastung

C = 38 Patienten (19 Patienten je Chip); verwendete Chipgröße 2x318 mit 100% Auslastung

**Zeitanalyse  
Sanger-Sequenzierung vs. NGS**



	Sanger Praxis	NGS Praxis
NGS		83 h
Sanger	160 h	29 h
MLPA	93 h	93 h
	<u>253 h</u>	<u>205 h</u>

	Sanger Praxis	NGS Praxis
NGS		83 h
Sanger	349 h	48 h
MLPA	93 h	93 h
	<u>442 h</u>	<u>224 h</u>

Abbildung 30: Darstellung einer beispielhaften Arbeitszeitanalyse in der Praxis bei 100% verfügbarer Laborgeräte:

Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Skalierungen der Diagramme separat gewählt.

A = 8 Patienten (4 Patienten je Chip); verwendete Chipgröße 2x316 mit 40% Auslastung; Sanger-Sequenzierung in einer Richtung vs. NGS

B = 8 Patienten (4 Patienten je Chip); verwendete Chipgröße 2x316 mit 40% Auslastung; Sanger-Sequenzierung in beide Richtungen vs. NGS



### Kostenanalyse Sanger-Sequenzierung vs. NGS

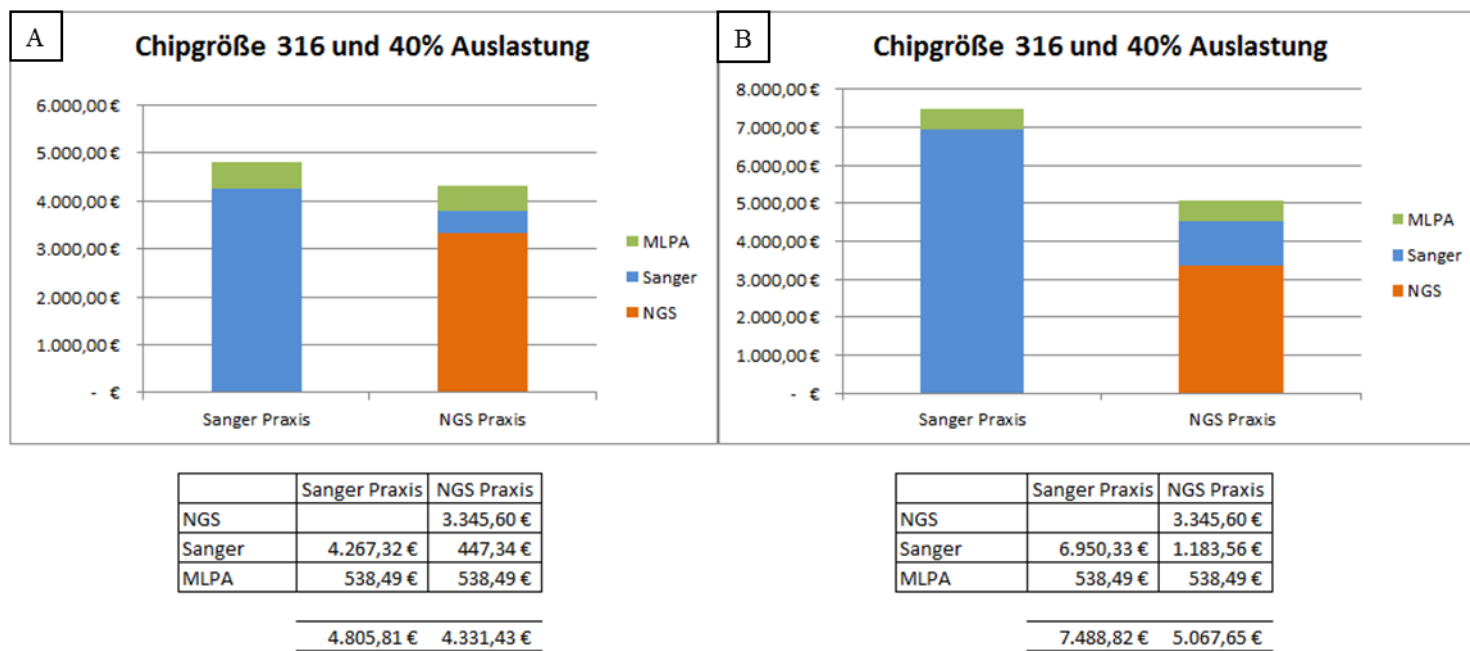


Abbildung 31: Darstellung einer beispielhaften Kostenanalyse in der Praxis bei 100% verfügbarer Laborgeräte:

Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Skalierungen der Diagramme separat gewählt.

A = 8 Patienten (4 Patienten je Chip); verwendete Chipgröße 2x316 mit 40% Auslastung; Sanger-Sequenzierung in einer Richtung vs. NGS

B = 8 Patienten (4 Patienten je Chip); verwendete Chipgröße 2x316 mit 40% Auslastung; Sanger-Sequenzierung in beide Richtungen vs. NGS

Die Zeit- und Kostenanalyse zeigt, dass das NGS erst ab höheren Patientenzahlen einen Vorteil gegenüber der Sanger-Sequenzierung bietet (s. Abbildung 26-31). Insbesondere durch die Probenvorbereitungszeit von 3-4 Tagen bis zur Sequenzierung mit dem PGM und der anschließenden Auswertung der Daten, ist das NGS erst für die beiden größeren Chipgrößen 316 und 318 interessant (s. Abbildung 26 und 28). Auch die Kostenanalyse stützt diese Aussage (s. Abbildung 27 und 29). Das Fallbeispiel mit 8 Patientenproben verteilt auf zwei 316er Chips spiegelt die Laborpraxis wieder. Das Beispiel zeigt, dass ein mit vier Patienten nur zu 40% ausgelasteter 316er Chip sowohl in der Bearbeitungszeit als auch in den Kosten nur einen geringen Vorteil gegenüber der Sanger-Sequenzierung darstellt (s. Abbildung 30 und 31). Es sollte zu beachten sein, dass für die optimale Chemikalienverwertung und somit auch die Kostensenkung je Geräte-Initialisierung, immer zwei Chips mit einer guten Probenauslastung sequenziert werden sollten.

Die Zeit- und Kostenanalyse mit der Sanger-Sequenzierung nur in eine Richtung entspricht der gängigen Laborpraxis und ist bei der standardisiert guten Datenqualität ausreichend. Um beide Methoden aber im Hinblick auf den Informationsgehalt wirklich vergleichen zu können, sollte auch die Sanger-Sequenzierung in beide Richtungen betrachtet werden, da das NGS methodenspezifisch immer beide Richtungen sequenziert.

Obwohl das NGS ab höheren Patientenzahlen der Sanger-Sequenzierung deutlich überlegen ist, ist die Gesamtbearbeitungszeit recht lang. In Fällen von Teilanalysen bzw. Stufendiagnostik besitzt die Sanger-Sequenzierung somit nach wie vor ihre Berechtigung. Damit stimmen die Ergebnisse mit dem allgemeinen Konsens überein und wurden in vielen Studien entsprechend beschrieben [20, 74, 78, 84, 86, 87, 89].

## 5.8. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Entwicklung und Validierung eines NGS-basierten Tests für das Krankheitsbild „Phäochromozytom“ das Next Generation Sequencing erfolgreich für die Routinediagnostik etabliert werden. Der zuvor mit der Sanger-Sequenzierung durchgeführte Patiententest für dieses Krankheitsbild konnte anhand der Ergebnisse dieser Arbeit auf die neue Stufe der Sequenzierung der nächsten Generation angepasst werden. Es bleibt jedoch zu berücksichtigen, dass zur Bewältigung der großen Datenmengen eine gute Software und Hardware mit entsprechender Rechenleistung sowie Speicherkapazität zwingend notwendig ist. Ohne Softwareunterstützung bei der Auswertung kann der methodische Vorteil, viele Patientenproben und Gene gleichzeitig zu untersuchen, nicht aufrechterhalten werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können als wissenschaftlicher Studiencharakter an einem Patientenkollektiv z.B. auch dazu genutzt werden, die Datensammlung für die Zukunft für die bisher weniger untersuchten Gene *MAX*, *TMEM127*, *SDHA*, *SDHAF2* und *KIF1B* zu erweitern. Es sind jedoch auch einige Fragen offen geblieben. Die zwei nur mit dem NGS nachgewiesenen Varianten im *SDHA*-Gen c.1064+10A>G und c.1064+79C>A liegen weit im Intron-Bereich, der in der Regel diagnostisch nicht untersucht wird. Diese konnten jedoch nicht abschließend aufgeklärt werden und müssten mit anderen Methoden näher auf ihre Identität untersucht werden. Als Gegenstand weiterer Arbeiten ist auch die Untersuchung der Gene *KIF1B*, *RET* und *TMEM127* für das Krankheitsbild „Phäochromozytom“ mittels MLPA in Betracht zu ziehen.

Durch Einsatz des NGS im Rahmen von klinischen Studien, findet eine große Entwicklung bei der Entdeckung weiterer diagnostisch relevanter Gene für viele Krankheitsbilder statt. Diese Gene wie z.B. *EGLN1/PHD2*, *EPAS1/HIF2A*, *MEN1*, *IDH1*, *FH*, *EGLN2*, *MDH2* und *GDNF* für das Krankheitsbild „Phäochromozytom“ könnten im Hinblick auf die 7 Proben, in denen keine Missense- oder Nonsense-Varianten nachgewiesen wurden, weiter untersucht werden. Es gibt bereits Bestrebungen, Panels in dieser Hinsicht zu erweitern, was ein weiterer Hinweis auf die Wichtigkeit der genetischen Analyse der diagnostisch relevanten Gene für dieses Krankheitsbild ist [1, 5, 14, 15, 19, 20, 90].

Auch in Bezug auf die Problematik beim Sequenzieren der Homopolymere gibt es weitere Entwicklungen. Seit einiger Zeit sind verbesserte Kits (Hi-Q Chemie) auf dem Markt, die die Sequenzierung von schwierigen Sequenzmotiven verbessern sollen.

NGS-Analysen haben das Potenzial, CNV bei der Datenauswertung zu identifizieren. Um allerdings robuste und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, wird eine weitere Entwicklung bei der Rohdatenanalyse, zumindest bei dem in dieser Arbeit verwendeten Programm „SeqPilot“, nötig sein.

Im Bereich des Panel-Designs sind bereits Neuerungen von Seiten des Systemanbieters implementiert worden. Inzwischen kann ein *in silico* Primer-Panel manuell weiter optimiert werden. Durch das „Neu-Designen“ einzelner Amplikons oder den Austausch der Amplikons eines Gens gegen Amplikons für dieses Gen aus einem besseren *in silico* Design, kann die Analysierbarkeit der im Panel enthaltenen Gene verbessert werden. Die Qualität für „neu-designte“ Primer-Panels kann somit weiter optimiert und die Ergebnisse in der praktischen Anwendung verbessert werden. Mittlerweile wurden auf diesem Weg für die Bioglobe GmbH weitere NGS-Assays für andere Krankheitsbilder entwickelt und als „Multi-Panels“ mit verschiedenen Patientenproben gemeinsam auf einem Chip sequenziert. Obwohl sich die Möglichkeiten beim Panel-Design verbessert haben, ist eine 100%ige Analysierbarkeit bei allen Genen in einem Panel weiterhin schwierig z.B. bei sehr GC-reichen Regionen. Aus diesem Grund kann bisher nicht auf die Sanger-Sequenzierung als Ergänzung zum NGS verzichtet werden. Es wird allerdings auch deutlich, dass ein fertiges Panel eine Limitation beinhaltet. Werden für ein Krankheitsbild in zukünftigen Studien weitere diagnostisch relevante Gene beschrieben, können diese Gene nicht in ein fertiges Panel integriert werden. Es müsste ein neues, verbessertes Panel designed werden. Gleichzeitig beinhalten größere Panels oder ganze Exom-Untersuchungen mit dem NGS aber auch die Gefahr „zufällig“ identifizierter Varianten, die eine klinische Bedeutung für ein anderes Krankheitsbild als das untersuchte haben können. Wie mit derartigen Informationen auch im Sinne des Gendiagnostikgesetzes umgegangen werden soll, ist ein sehr breites Diskussionsfeld [78, 92]. Somit wird zusammenfassend aus den Ergebnissen dieser Arbeit geschlussfolgert, dass das NGS bei entsprechender Patientenzahl und somit Chipauslastung als moderne Sequenzierungstechnologie in Zukunft eine kostengünstige und zeitersparende Alternative zur Sanger-Sequenzierung darstellt!

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] Welander, J., Söderkvist, P., Gimm, O. (2011). Genetics and clinical characteristics of hereditary pheochromocytomas and paragangliomas. *Endocrine-Related Cancer*, (2011), 18, R253–R276.
- [2] Neumann, H.P.H. (2014). Phäochromozytome, Paragangliome, Glomustumoren und assoziierte Syndrome: von Hippel-Lindau Syndrom, Multiple Endokrine Neoplasie Typ 2, Neurofibromatose Typ 1 und Paragangliom-Syndrome Typ 1-4. Phäochromozytom Informationsschrift, Fassung 10.11.2014.
- [3] Adler, J.T., Meyer-Rochow, G.Y., Chen, H., Benn, D.E., Robinson, B.G., Sippel, R.S., Sidhu, S.B. (2008). Pheochromocytoma: Current Approaches and Future Directions. *The Oncologist*, 2008.
- [4] Trombetta, M., Silverman, J., Colonias, A., Lee, V., Mohanty, A., Parda, D. (2008). Paraganglioma: A Potentially Challenging Tumor. *Oncology Journal, Brain Tumors*, March 01, 2008.
- [5] Kirmani, S., Young, W.F. (2008). Hereditary Paraganglioma-Pheochromocytoma Syndromes. *GeneReviews*, May 21, 2008.
- [6] Wilson, D.P., Rassekh, C. (1998). Paragangliomas. *UTMB Dept. of Otolaryngology Grand Rounds*, December 2, 1998.
- [7] Müller, W., Frings, S. (2007). *Tier- und Humanphysiologie*. Springer Verlag, 3. Auflage, Kapitel 11 Hormonale Steuerung, S. 285 ff.
- [8] Müller, W., Frings, S. (2007). *Tier- und Humanphysiologie*. Springer Verlag, 3. Auflage, Kapitel 10 Das vegetative Nervensystem, S. 253 ff.
- [9] Zuber, S.M., Kantorovich, V., Pacak, K. (2011). Hypertension in Pheochromocytoma: Characteristics and Treatment. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2011 Jun; 40(2): 295–311, Doi: 10.1016/j.ecl.2011.02.002.
- [10] Frantzen, C., Klasson, T.D., Links, T.P., Giles, R.H. (2000). Von Hippel-Lindau Syndrome. *GeneReviews*, University of Washington, Bookshelf ID: NBK1463PMID: 20301636.
- [11] Mannelli, M., Lenders, J.W.M., Pacak, K., Parenti, G., Eisenhofer, G. (2012). Subclinical Phaeochromocytoma. 2012 May 22.

[12] Bausch, B., Malinoc, A., Maruschke, L., Offergeld, C., Gläsker, S., Rischke, H.C., Brauckhoff, M., Boedeker, C.C., Neumann, H.P.H. (2012). Genetik der Phäochromozytome. Springer Verlag, Der Chirurg, 6, S. 511ff, online publiziert am 7. April 2012. (<http://www.springermedizin.de/genetik-der-phaeochromozytome/3036124.html>)

[13] Buffet, A., Venisse, A., Nau, V., Roncellin, I., Boccio, V., Le Pottier, N., Bousson, M., Travers, C., Simian, C., Burnichon, N., Abermil, N., Favier, J., Jeunemaitre, X., Gimenez-Roqueplo, A.P. (2012). A Decade (2001-2010) of Genetic Testing for Pheochromocytoma and Paraganglioma. Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, Journal, Hormone and Metabolic Research, 44(5):359-66, 2012.

[14] Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>): #171300 Pheochromocytoma, #168000 Paragangliomas 1 (PGL1), #601650 Paragangliomas 2 (PGL2), #605373 Paragangliomas 3 (PGL3), #115310 Paragangliomas 4 (PGL4), #614165 Paragangliomas 5 (PGL5), \*136850 Fumarate Hydratase (*FH*), \*147700 Isocitrate Dehydrogenase 1 (*IDH1*), \*606425 C. Elegans Homolog of 1 (*EGLN1*), \*603349 Endothelial Pas Domain Protein 1 (*EPAS1*), \*154950 *MAX* Protein; *MAX*, \*613113 Neurofibromin (*NF1*), \*613403 Transmembrane Protein 127 (*TMEM127*), \*608537 *VHL* Gene (*VHL*), +164761 *RET*, \*605995 Kinesin Family Member 1B (*KIF1B*), \*600857 Succinate Dehydrogenase Complex, Subunit A, Flavoprotein (*SDHA*), \*185470 Succinate Dehydrogenase Complex, Subunit B, Iron Sulfur Protein (*SDHB*), \*602413 Succinate Dehydrogenase Complex, Subunit C, Integral Membrane Protein, 15-KD (*SDHC*), \*602690 Succinate Dehydrogenase Complex, Subunit D, Integral Membrane Protein (*SDHD*), \*613019 Succinate Dehydrogenase Complex, Assembly Factor 2 (*SDHAF2*)

[15] HGMD Professional von Biobase Biological Databases

(<https://portal.biobase-international.com>)

→ der Aufruf der einzelnen Gene erfolgte über die Suchfunktion

[16] Welander, J., Larsson, C., Bäckdahl, M., Hareni, N., Sivlér, T., Brauckhoff, M., Söderkvist, P., Gimm, O. (2012). Integrative genomics reveals frequent somatic *NF1* mutations in sporadic pheochromocytomas. Oxford Journals, Human Molecular Genetics, Volume 21, Issue 26, Pp. 5406-5416, 2012.

[17] National Center for Biotechnology Information (NCBI) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) → Gene: Gene ID: 4149 *MAX* (MYC associated factor X), Gene ID: 4763 *NF1* (neurofibromin 1), Gene ID: 55654 *TMEM127* (transmembrane protein 127), Gene ID: 7428 *VHL* (von Hippel-Lindau tumor suppressor; E3 ubiquitin protein ligase), Gene ID: 5979 *RET* (ret proto-oncogene), Gene ID: 23095 *KIF1B* (kinesin family member 1B), Gene ID: 6389 *SDHA* (succinate dehydrogenase complex subunit A, flavoprotein (Fp)), Gene ID: 6390 *SDHB* (succinate dehydrogenase complex subunit B, iron sulfur (Ip)), Gene ID: 6391 *SDHC* (succinate dehydrogenase complex subunit C), Gene ID: 6392 *SDHD* (succinate dehydrogenase complex subunit D, integral membrane protein), Gene ID: 54949 *SDHAF2* (succinate dehydrogenase complex assembly factor 2)

- [18] U.S. National Library of Medicine; Genetics Home Reference (<https://ghr.nlm.nih.gov>): *MAX*; Zugriff am 10.01.2016, *NF1*; Zugriff am 11.01.2016, *TMEM127*; Zugriff am 12.02.2016, *VHL*; Zugriff am 13.01.2016, *RET*; Zugriff am 14.01.2016, *KIF1B*; Zugriff am 15.01.2016, *SDHA*; Zugriff am 15.01.2016, *SDHB*; Zugriff am 15.01.2016, *SDHC*; Zugriff am 15.01.2016, *SDHD*; Zugriff am 15.01.2016, *SDHAF2*; Zugriff am 15.01.2016
- [19] Martins, R., Bugalho, M.J., (2014). Paragangliomas/Pheochromocytomas: Clinically Oriented Genetic Testing. *International Journal of Endocrinology*, Volume 2014, Article ID 794187, 14 pages.
- [20] Welander, J., Andreasson, A., Juhlin, C.C., Wiseman, R.W., Bäckdahl, M., Höög, A., Larsson, C., Gimm, O., Söderkvist, P. (2014). Rare Germline Mutations Identified by Targeted Next-Generation Sequencing of Susceptibility Genes in Pheochromocytoma and Paraganglioma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 99, Issue 7.
- [21] Marquard, J., Eng, C. (1999). Multiple Endocrine Neoplasia Type 2. *GeneReviews*, Bookshelf ID: NBK1257.
- [22] <http://www.spiegel.de/wissenschaft/mensch/sensationelle-fortschritte-jetzt-beginnt-die-gen-revolution-a-530538.html>, Zugriff am 24.01.2016
- [23] <http://www.pflanzenforschung.de/index.php?cID=7121>; Zugriff am 24.01.2016
- [24] Brown, T.A. (2007). *Genome und Gene Lehrbuch der molekularen Genetik*. Spektrum Akademischer Verlag, 3. Auflage, Kapitel 4 Die Sequenzierung von Genomen, S. 111 ff.
- [25] Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.
- [26] Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., et al., and International Human Genome Sequencing Consortium (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- [27] Neveling, K., Hoischen, A. (2014). Einführung in die Grundlagen der Hochdurchsatzsequenzierung. *Springer Medizin, Medizinische Genetik 2014*; Band 26, Heft 2, Juni 2014, S. 231ff
- [28] Brown, T.A. (2007). *Genome und Gene Lehrbuch der molekularen Genetik*. Spektrum Akademischer Verlag, 3. Auflage, Kapitel 16 Mutationen und die Reparatur der DNA, S. 549ff.
- [29] Neumann, R. (2000). SNP (Single Nucleotide Polymorphism). *Laborjournal-Ausgabe 10*. ([http://www.laborjournal.de/rubric/archiv/stichwort/w\\_00\\_10.lasso](http://www.laborjournal.de/rubric/archiv/stichwort/w_00_10.lasso); Zugriff am 24.01.2016)

- [30] Kortüm, F., Abdollahpour, H., Alawi, M., Korenke, G.C., Seemanova, E., Tinschert, S., Zenker, M., Rosenberger, G., Kutsche, K. (2014). Exomsequenzierung zur Identifizierung von Krankheitsgenen für seltene Syndrome – Erfahrungen aus Hamburg. Springer Medizin, Medizinische Genetik, Next Generation Sequencing in der Humangenetik, Band 26, Heft 2, Juni 2014, S. 246-254.
- [31] Mahdieh, N., Rabbani, B. (2013). An Overview of Mutation Detection Methods in Genetic Disorders. *Iran J Pediatr.* 2013 Aug; 23(4): 375–388.
- [32] Veltman, J.A., Schoenmakers, E.F.P.M., Eussen, B.H., Janssen, I., Merkx, G., van Cleef, B., van Ravenswaaij, C.M., Brunner, H.G., Smeets, D., van Kessel, A.G. (2002). High-Throughput Analysis of Subtelomeric Chromosome Rearrangements by Use of Array-Based Comparative Genomic Hybridization. *Am J Hum Genet.* 2002 May; 70(5): 1269–1276.
- [33] Mülhardt, C. (2009). *Der Experimentator Molekularbiologie/ Genomics.* Spektrum Akademischer Verlag, 6. Auflage, Kapitel 9 Untersuchung der Funktion von DNA-Sequenzen, S. 222ff.
- [34] Hurd, P.J., Nelson, C.J. (2009). Advantages of next-generation sequencing versus the microarray in epigenetic research. *Oxford Journals, Science & Mathematics, Briefings in Functional Genomics, Volume 8, Issue 3, Pp. 174-183.*
- [35] Liva, S., Hupé, P., Neuvial, P., Brito, I., Viara, E., La Rosa, P., Barillot, E. (2006). CAPweb: a bioinformatics CGH array Analysis Platform. *Nucleic Acids Res.* 2006 Jul 1; 34(Web Server issue): W477–W481.
- [36] Griffin, T.J., Smith, L.M. (2000). Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Review, Tibtech February 2000 (Vol. 18).*
- [37] Maxam, A.M., Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Feb; 74(2): 560–564.
- [38] Hutchison, C.A. (2007). DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Res.* 2007 Sep; 35(18): 6227–6237.
- [39] Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA, Biochemistry, Vol. 74, No. 12, pp. 5463-5467, December 1977.*
- [40] Schouten, J.P., McElgunn, C.J., Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F., Pals, G. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002 Jun 15;30(12):e57.
- [41] Behjati, S., Tarpey, P.S. (2013). What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 2013 Dec; 98(6): 236–238.



- [42] Baysal, B.E., Lawrence, E.C., Ferrell, R.E. (2007). Sequence variation in human succinate dehydrogenase genes: evidence for long-term balancing selection on *SDHA*. *BMC Biology*, 5:12, Additional file 5.
- [43] QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook. Qiagen; Version 3; Juni 2012; S. 12 + 26ff
- [44] Brown, T.A. (2007). *Genome und Gene Lehrbuch der molekularen Genetik*. Spektrum Akademischer Verlag, 3. Auflage, Kapitel 2 Die Untersuchung der DNA, S. 59 ff.
- [45] Agencourt AMPure XP PCR Purification. Beckman Coulter; Protocol 000387v001; S. 5-6
- [46] Agencourt CleanSEQ Dye-Terminator Removal. Beckman Coulter; Protocol 000600v032; S. 4ff
- [47] MLPA General Protocol Instructions For Use. MRC-Holland; MLPA DNA Protocol version MDP-005; 2014; S. 5ff
- [48] Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A., Berka, J., Braverman, M.S., Chen, Y-J., Chen, Z., Dewell, S.B., Du, L., Fierro, J.M., Gomes, X.V., Godwin, B.C., He, W., Helgesen, S., Ho, C.H., Irzyk, G.P., Jando, S.C., Alenquer, M.L.I., Jarvie, T.P., Jirage, K.B., Kim, J-B., Knight, J.R., Lanza, J.R., Leamon, J.H., Lefkowitz, S.M., Lei, M., Li, J., Lohman, K.L., Lu, H., Makhijani, V.B., McDade, K.E., McKenna, M.P., Myers, E.W., Nickerson, E., Nobile, J.R., Plant, R., Puc, B.P., Ronan, M.T., Roth, G.T., Sarkis, G.J., Simons, J.F., Simpson, J.W., Srinivasan, M., Tartaro, K.R., Tomasz, A., Vogt, K.A., Volkmer, G.A., Wang, S.H., Wang, Y., Weiner, M.P., Yu, P., Begley, R.F., & Rothberg, J.M. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437, 376-380 (15 September 2005).
- [49] Ion Torrent PGM Sequencer. Life Technologies; Schulungsordner; Juli 2013; Kapitel 1b AmpliSeq Library S. 13ff; Kapitel 2 Template Preparation S. 19ff, insbesondere ISPs auf Seite 82ff; Kapitel 3 Sequencing S. 16ff
- [50] KAPA Library Quantification Kits For Ion Torrent platform. Peqlab; Version 3.11; S. 1ff
- [51] Sequence Pilot module SeqNext. JSI Medical Systems GmbH.; Manual; Version 4.2.2; Kapitel 6: Definitions, S. 11 ff; Kapitel 9: Categories and Operations, S. 30 ff; Kapitel 10: Analysis of Copy Number Variations (CNV), S. 190 ff; Kapitel 11: Pool analysis, S. 205 ff; June 2015.
- [52] Qubit 2.0 Fluorometer. Invitrogen by Life Technologies. User Manual; MAN0003231

- [53] Caminsky, N.G., Mucaki, E.J., Rogan, P.K. (2014). Interpretation of mRNA splicing mutations in genetic disease: review of the literature and guidelines for information-theoretical analysis [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research*; 3: 282.
- [54] Walters-Sen, L.C., Hashimoto, S., Thrush, D.L., Reshmi, S., Gastier-Foster, J.M., Astbury, C., Pyatt, R.E. (2014). Variability in pathogenicity prediction programs: impact on clinical diagnostics. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 2015; 3(2): 99-110.
- [55] <http://www.applied-maths.com/applications/multiplex-ligation-dependent-probe-amplification-mlpa-analysis>; Zugriff am 12.09.2015
- [56] <http://www.endokrinologie.net/krankheiten-phaeochromozytom.php>; Zugriff am 12.10.2016 (Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie)
- [57] Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W.W., Hegde, M, Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Rehm, H.L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*; Volume 17; Number 5; 405-424.
- [58] Neumann, H.P.H., Bausch, B., McWhinney, S.R., Bender, B.U., Gimm, O., Franke, G., Schipper, J., Klisch, J., Althoefer, C., Zerres, K., Januszewicz, A., Smith, W.M., Munk, R., Manz, T., Glaesker, S., Apel, T.W., Treier, M., Reineke, M., Walz, M.K., Hoang-Vu, C., Brauckhoff, M., Klein-Franke, A., Klose, P., Schmidt, H., Maier-Woelfle, M., Peçzkowska, M., Szmigielski, C., Eng, C. (2002). Germ-Line Mutations in Nonsyndromic Pheochromocytoma. *The New England Journal of Medicine*; 346:1459-1466; DOI: 10.1056/NEJMoa020152.
- [59] Benn, D.E., Gimenez-Roqueplo, A.P., Reilly, J.R., Bertherat, J., Burgess, J., Byth, K., Crosson, M., Dahia, P.L.M., Elston, M., Gimm, O., Henley, D., Herman, P., Murday, V., Niccoli-Sire, P., Pasiaka, J.L., Rohmer, V., Tucker, K., Jeunemaitre, X., Marsh, D.J., Plouin, P.F., Robinson, B.G. (2006). Clinical Presentation and Penetrance of Pheochromocytoma/Paraganglioma Syndromes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 91, Issue 3, DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2005-1862>.
- [60] Gimm, O., Armanios, M., Dziema, H., Neumann, H.P.H., Eng, C. (2000). Somatic and Occult Germ-line Mutations in *SDHD*, a Mitochondrial Complex II Gene, in Nonfamilial Pheochromocytoma. *CANCER RESEARCH* 60, 6822– 6825.
- [61] Perren, A., Barghorn, A., Schmid, S., Saremaslani, P., Roth, J., Heitz, P.U., Komminoth, P. (2002). Absence of somatic *SDHD* mutations in sporadic neuroendocrine tumors and detection of two germline variants in paraganglioma patients. *Oncogene*, Volume 21, Number 49, Pages 7605-7608, Doi:10.1038/sj.onc.1205812.

- [62] Borrego, S., Sáez, M.E, Ruiz, A., Gimm, O., López-Alonso, M., Antiñolo, G., Eng, C. (1999). Specific polymorphisms in the *RET* proto-oncogene are over-represented in patients with Hirschsprung disease and may represent loci modifying phenotypic expression. *Journal of Medical Genetics*, 36:771-774, Doi:10.1136/jmg.36.10.771.
- [63] Boedeker, C.C., Erlic, Z., Richard, S., Kontny, U., Gimenez-Roqueplo, A.P., Cascon, A., Robledo, M., de Campos, J.M., van Nederveen, F.H., de Krijger, R.R., Burnichon, N., Gaal, J., Walter, M.A., Reschke, K., Wiech, T., Weber, J., Rückauer, K., Plouin, P.F., Darrouzet, V., Giraud, S., Eng, C., Neumann, H.P.H. (2009). Head and Neck Paragangliomas in Von Hippel-Lindau Disease and Multiple Endocrine Neoplasia Type 2. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94(6): 1938–1944, Doi: 10.1210/jc.2009-0354.
- [64] Rønning, P., Andresen, P.A., Hald, J.K., Heimdal, K., Scheie, D., Schreiner, T., Helseth, E. (2010). Low frequency of *VHL* germline mutations in Norwegian patients presenting with isolated central nervous system hemangioblastomas – a population-based study. *Acta Neurologica Scandinavica*, 122, 124-131, DOI 10.1111/j.1600-0404.2009.01274.x.
- [65] Park, T.Y., Lee, S.K., Park, J.S., Oh, D., Song, T.J., Park, D.H., Lee, S.S., Seo, D.W., Kim, M.H. (2015). Clinical features of pancreatic involvement in von Hippel–Lindau disease: a retrospective study of 55 cases in a single center. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 50:3, 360-367, DOI:10.3109/00365521.2014.992364.
- [66] Feng, W., Zhao, S., Xue, D., Song, F., Li, Z., Chen, D., He, B., Hao, Y., Wang, Y., Liu, Y. (2016). Improving alignment accuracy on homopolymer regions for semiconductor-based sequencing technologies. *BMC Genomics*, 17(Suppl 7): 521, Doi: 10.1186/s12864-016-2894-9.
- [67] Italiano, A., Chen, C.L., Sung, Y.S., Singer, S., DeMatteo, R.P., LaQuaglia, M.P., Besmer, P., Socci, N., Antonescu, C.R. (2012). *SDHA* loss of function mutations in a subset of young adult wild-type gastrointestinal stromal tumors. *BMC Cancer*, 12:408, DOI: 10.1186/1471-2407-12-408.
- [68] Crona, J., Nordling, M., Maharjan, R., Granberg, D., Stålberg, P., Hellman, P., Björklund, P. (2014). Integrative Genetic Characterization and Phenotype Correlations in Pheochromocytoma and Paraganglioma Tumours. *PLoS One*, 9(1): e86756, Doi: 10.1371/journal.pone.0086756
- [69] Baysal, B.E., Lawrence, E.C., Ferrell, R.E. (2007). Sequence variation in human succinate dehydrogenase genes: evidence for long-term balancing selection on *SDHA*. *BMC Biology*, 5:12, DOI: 10.1186/1741-7007-5-12.

- [70] Schlisio, S., Kenchappa, R.S., Vredeveld, L.C.W., George, R.E., Stewart, R., Greulich, H., Shahriari, K., Nguyen, N.V., Pigny, P., Dahia, P.L., Pomeroy, S.L., Maris, J.M., Look, A.T., Meyerson, M., Peepker, D.S., Carter, B.D., Kaelin Jr., W.G. (2008). The kinesin *KIF1B $\beta$*  acts downstream from *Egln3* to induce apoptosis and is a potential 1p36 tumor suppressor. *Genes & Dev.*, 22: 884-893, Doi: 10.1101.
- [71] von Dobschuetz, E., Leijon, H., Schalin-Jäntti, C., Schiavi, F., Brauckhoff, M., Peczkowska, M., Spiazzi, G., Demattè, S., Cecchini, M.E., Sartorato, P., Krajewska, J., Hasse-Lazar, K., Roszkowska-Purska, K., Taschin, E., Malinoc, A., Akslen, L.A., Arola, J., Lange, D., Fassina, A., Pennelli, G., Barbareschi, M., Luettgies, J., Prejbisz, A., Januszewicz, A., Strate, T., Bausch, B., Castinetti, F., Jarzab, B., Opocher, G., Eng, C., Neumann, H.P.H. (2015). A registry-based study of thyroid paraganglioma: histological and genetic characteristics. *Endocr Relat Cancer* April 1, 22 191-204, Doi: 10.1530.
- [72] Marquard, J., Eng, C. (1999). Multiple Endocrine Neoplasia Type 2. GeneReviews, University of Washington, Bookshelf ID: NBK1257PMID: 20301434.
- [73] McInerney-Leo, A.M., Marshall, M.S., Gardiner, B., Benn, D.E., McFarlane, J., Robinson, B.G., Brown, M.A., Leo, P.J., Clifton-Bligh, R.J. Duncan, E.L. (2014). Whole exome sequencing is an efficient and sensitive method for detection of germline mutations in patients with pheochromocytomas and paragangliomas. *Clinical Endocrinology*, 80, 25–33, DOI: 10.1111/cen.12331
- [74] Rattenberry, E., Vialard, L., Yeung, A., Bair, H., McKay, K., Jafri, M., Canham, N., Cole, T.R., Denes, J., Hodgson, S.V., Irving, R., Izatt, L., Korbonits, M., Kumar, A.V., Lalloo, F., Morrison, P.J., Woodward, E.R., Macdonald, F., Wallis, Y., Maher, E.R. (2013). A comprehensive next generation sequencing-based genetic testing strategy to improve diagnosis of inherited pheochromocytoma and paraganglioma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Jul, Volume 98, Issue 7:E1248-56, Doi: 10.1210/jc.2013-1319.
- [75] Toledo, R.A., Dahia, P.L.M. (2014). Next-generation sequencing for the genetic screening of pheochromocytomas and paragangliomas: riding the new wave, but with caution. *Clinical Endocrinology*, 80, 23–24, Doi: 10.1111/cen.12357
- [76] Crona, J., Ljungström, V., Welin, S., Walz, M.K., Hellman, P., Björklund, P. (2015). Bioinformatic Challenges in Clinical Diagnostic Application of Targeted Next Generation Sequencing: Experience from Pheochromocytoma. *PLoS One*, PMID: PMC4521794, 10(7), e0133210.
- [77] McPherson, J.R., Ong, C.K., Ng, C.C.Y., Rajasegaran, V., Heng, H.L., Yu, W.S.S., Tan, B.K.T., Madhukumar, P., Teo, M.C.C., Ngeow, J., Thike, A.A., Rozen, S.G., Tan, P.H., Lee, A.S.G., Teh, B.T., Yap, Y.S. (2015). Whole-exome sequencing of breast cancer, malignant peripheral nerve sheath tumor and neurofibroma from a patient with neurofibromatosis type 1. *Cancer Medicine*, Dec, 4(12):1871-8. Doi: 10.1002/cam4.551.

- [78] Toledo, R.A., Dahia, P.L.M. (2015). Next-generation sequencing for the diagnosis of hereditary pheochromocytoma and paraganglioma syndromes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.*, Jun, 22(3):169-79, Doi: 10.1097/MED.000000000000150.
- [79] Weißmann, R., Gilissen, C. (2014). NGS Datenanalyse und Qualitätskontrolle. Springer Medizin, Medizinische Genetik 2014; Band 26, Heft 2, Juni 2014, S. 239ff
- [80] Kieleczawa, J. (2006). Fundamentals of Sequencing of Difficult Templates—An Overview. *J Biomol Tech*, Jul, 17(3): 207–217, PMID: PMC2291785.
- [81] Bennedbæk, M., Rossing, M., Rasmussen, Å.K., Gerdes, A.M., Skytte, A.B., Jensen, U.B., Nielsen, F.C., Hansen, T.v.O. (2016). Identification of eight novel *SDHB*, *SDHC*, *SDHD* germline variants in Danish pheochromocytoma/paraganglioma patients. *Hered Cancer Clin Pract.*, 14: 13., PMID: PMC4898401, Doi: 10.1186/s13053-016-0053-6
- [82] Fishbein, L., Khare, S., Wubbenhorst, B., DeSloover, D., D'Andrea, K., Merrill, S., Cho, N.W., Greenberg, R.A., Else, T., Montone, K., LiVolsi, V., Fraker, D., Daber, R., Cohen, D.L., Nathanson, K.L. (2015). Whole exome sequencing identifies somatic *ATRX* mutations in pheochromocytomas and paragangliomas. *Nature Communications*, 6: 6140, PMID: PMC4302757, Doi: 10.1038/ncomms7140
- [83] Russell, N., Delatycki, M., Grossmann, M. (2015). Metastatic pheochromocytoma in a 23-year-old woman with an unclassified variant in the von Hippel Lindau disease gene: how can the pathogenicity of this variant be determined? *Clinical Endocrinology*, 83, 15–19, Doi: 10.1111/cen.12710
- [84] Burnichon, N., Buffet, A., Gimenez-Roqueplo, A.P. (2016). Pheochromocytoma and paraganglioma: molecular testing and personalized medicine. *Curr Opin Oncol*, 28:5–10, DOI:10.1097/CCO.0000000000000249
- [85] Maher, E.R. (2014). Pheochromocytoma and paraganglioma: next-generation sequencing and evolving Mendelian syndromes. *Clinical Medicine*, Vol 14, No 4: 440–4, Doi: 10.7861/clinmedicine.14-4-440
- [86] Casey, R., Garrahy, A., Tuthill, A., O'Halloran, D., Joyce, C., Casey, M.B., O'Shea, P., Bell, M. (2014). Universal Genetic Screening Uncovers a Novel Presentation of an *SDHAF2* Mutation. *Clin Endocrinol Metab*, July, 99(7):E1392–E1396, Doi: 10.1210/jc.2013-4536
- [87] Crona, J., Verdugo, A.D., Granberg, D., Welin, S., Stålberg, P., Hellman, P., Björklund, P. (2013). Next-generation sequencing in the clinical genetic screening of patients with pheochromocytoma and paraganglioma. *Endocr Connect.*, Jun 1, 2(2): 104–111., PMID: PMC3682230, Doi: 10.1530/EC-13-0009

- [88] Dénes, J., Swords, F., Rattenberry, E., Stals, K., Owens, M., Cranston, T., Xekouki, P., Moran, L., Kumar, A., Wassif, C., Fersht, N., Baldeweg, S.E., Morris, D., Lightman, S., Agha, A., Rees, A., Grieve, J., Powell, M., Boguszewski, C.L., Dutta, P., Thakker, R.V., Srirangalingam, U., Thompson, C.J., Druce, M., Higham, C., Davis, J., Eeles, R., Stevenson, M., O'Sullivan, B., Tanriere, P., Skordilis, K., Gabrovska, P., Barlier, A., Webb, S.M., Aulinas, A., Drake, W.M., Bevan, J.S., Preda, C., Dalantaeva, N., Ribeiro-Oliveira, A. Jr., Garcia, I.T., Yordanova, G., Iotova, V., Evanson, J., Grossman, A.B., Trouillas, J., Ellard, S., Stratakis, C.A., Maher, E.R., Roncaroli, F., Korbonits, M. (2015). Heterogeneous genetic background of the association of pheochromocytoma/paraganglioma and pituitary adenoma: results from a large patient cohort. *J Clin Endocrinol Metab.*, Mar, 100(3):E531-41., Doi: 10.1210/jc.2014-3399
- [89] Kuß, A.W. (2014). Next Generation Sequencing in der Humangenetik. Springer Medizin, Medizinische Genetik, Next Generation Sequencing in der Humangenetik, Band 26, Heft 2, Juni 2014, S. 229f.
- [90] Pillai, S., Gopalan, V., King, A., Lam, Y. (2015). Genetic profiling of mutations in pheochromocytoma and paraganglioma by targeted next generation sequencing - A pilot study. Conference: Gold Coast Health and Medical Research Conference, Conference Paper.
- [91] <http://www.kbv.de/html/online-ebm.php> (Kassenärztliche Bundesvereinigung → EBM)
- [92] Henn, W. (2014). Multiparameter-Genomanalyse und informationelle Selbstbestimmung. Springer Medizin, Medizinische Genetik, Next Generation Sequencing in der Humangenetik, Band 26, Heft 2, Juni 2014, S. 273f.
- [93] Holzapfel, B., Wickert, L. (2007). Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie in unserer Zeit*, Volume 37, Issue 2, April, Pages: 120-126, DOI: 10.1002/biuz.200610332

## 7. Anhang

### 7.1. Verwendete Primer für die Sanger-Sequenzierung

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer sind in den nachfolgenden Tabellen A1-A11 aufgeführt.

Alle Primer sind jeweils mit dem Gen-Namen und dem zu amplifizierenden Exon benannt. Der Index „\_F“ bzw. „\_R“ kennzeichnet die Orientierung des jeweiligen Primers relativ zum exprimierten Gen. Die Verwendung der Primer für die „PCR“ und/ oder die Sequenzierung („SQ“) ist entsprechend gekennzeichnet. Für jedes Primerpaar ist die Produktgröße und die PCR-Annealing-Temperatur angegeben. Die Annealing-Temperatur für die Sequenzierung war einheitlich 55°C.

**Tabelle A1: Übersicht über die verwendeten *KIF1B*-Primer**

<i>KIF1B</i> -Gen				
Primer	Verwendung	Nukleotidsequenz 5'→3'	PCR-Annealing-Temperatur	Produktgröße
<i>KIF1B</i> _Ex1_F	PCR + SQ	CGAAGCGGGGCAGTGTGA	63°C	435 bp
<i>KIF1B</i> _Ex1_R	PCR + SQ	CTACCTCCCCTCAGACCC		
<i>KIF1B</i> _Ex2_F	PCR + SQ	GGGAGAAAAGGGATGAATAT	„Touch Down“ Profil	481 bp
<i>KIF1B</i> _Ex2_R	PCR + SQ	ATAGCAAATACCACAGAGGG		
<i>KIF1B</i> _Ex3_F	PCR + SQ	CAGCTCGGACTCTCAAAAT	„Touch Down“ Profil	452 bp
<i>KIF1B</i> _Ex3_R	PCR + SQ	CTTTCATCAACCCAAATAC		
<i>KIF1B</i> _Ex4_F	PCR + SQ	ACAGTGCATGTGTTTGTGAG	63°C	535 bp
<i>KIF1B</i> _Ex4_R	PCR + SQ	CTCTGAGGGAAAATAATGGG		
<i>KIF1B</i> _Ex5_F	PCR + SQ	AGCGCATGACTGACTTTATT	63°C	380 bp
<i>KIF1B</i> _Ex5_R	PCR + SQ	CCAAAACCCAGAAATAGCC		
<i>KIF1B</i> _Ex6_F	PCR + SQ	TGTATTTTTGGTAGAGACGG	63°C	534 bp
<i>KIF1B</i> _Ex6_R	PCR + SQ	TTAACACTCTGAAGCCCTC		
<i>KIF1B</i> _Ex7_F	PCR + SQ	ATTGGAGAGTAACTTGATGG	63°C	474 bp
<i>KIF1B</i> _Ex7_R	PCR + SQ	CTGGTGTAGGGTGAAGAAA		
<i>KIF1B</i> _Ex8_F	PCR + SQ	CTGCCGTGTGTA CTGTTTA	63°C	487 bp
<i>KIF1B</i> _Ex8_R	PCR + SQ	ACAGATCAGGAGTCAGCAAA		
<i>KIF1B</i> _Ex9_F	PCR + SQ	TATCAAGTGGAAAAGAGGAC	63°C	471 bp
<i>KIF1B</i> _Ex9_R	PCR + SQ	ACCTTCAGTGTGTTGCTCTAG		
<i>KIF1B</i> _Ex10_F	PCR + SQ	GTGTCGGGGTTGTA CTGTA	63°C	459 bp
<i>KIF1B</i> _Ex10_R	PCR + SQ	TAATCTGAAGCAAGTATGGG		
<i>KIF1B</i> _Ex11.3_F	PCR + SQ	CAGATTTGACACATTCCA	53°C	299 bp
<i>KIF1B</i> _Ex11.2_R	PCR + SQ	TTTTCCCTAAGTTTTCCCTG		
<i>KIF1B</i> _Ex12_F	PCR + SQ	TCATCTGAGCCTTTTTCTTC	63°C	544 bp
<i>KIF1B</i> _Ex12_R	PCR + SQ	GAGTTCAAAATGGATAGTCTG		
<i>KIF1B</i> _Ex13_F	PCR + SQ	CTTACAACGATATTCCTCC	63°C	518 bp
<i>KIF1B</i> _Ex13_R	PCR + SQ	CATGCACTTCTCCCAACTC		
<i>KIF1B</i> _ex14.2_F	PCR + SQ	TCAAAGGGCATGATTGCT	63°C	393 bp
<i>KIF1B</i> _Ex14_R	PCR + SQ	ACTAATAAACCTGTGACTCC		
<i>KIF1B</i> _Ex15_F	PCR + SQ	CTATCCCAAAGTCAGTTGAG	63°C	517 bp
<i>KIF1B</i> _Ex15_R	PCR + SQ	GGCTGCCTTTGTA CTATAAG		

<i>KIF1B</i> _Ex16_F	PCR + SQ	TCTCTTTATTATGGAACCGC	„Touch Down“ Profil	419 bp
<i>KIF1B</i> _Ex16_R	PCR + SQ	CTACATAGTAACTGGCTCC		
<i>KIF1B</i> _Ex17_F	PCR + SQ	GAGAGGTTGATCATATGTGA	63°C	412 bp
<i>KIF1B</i> _Ex17_R	PCR + SQ	CCCAGGTCTCTCCATTTTTC		
<i>KIF1B</i> _Ex18_F	PCR + SQ	TCTATTGGGGCTAGTTCTGG	„Touch Down“ Profil	321 bp
<i>KIF1B</i> _Ex18_R	PCR + SQ	TTAGAGTTGTCACAGAAGCC		
<i>KIF1B</i> _Ex19-20_F	PCR + SQ	AGCTGTCTTTTCACATTAGG	63°C	540 bp
<i>KIF1B</i> _Ex19-20_R	PCR + SQ	GAAGCAATTGGGTGAGTAC		
<i>KIF1B</i> _Ex22_F	PCR + SQ	TATTGTTTCTGCCTTTGTC	63°C	371 bp
<i>KIF1B</i> _Ex22_R	PCR + SQ	TCATCTGTAAACTGGCTCAG		
<i>KIF1B</i> _Ex23_F	PCR + SQ	TGGCCACATGTTATACCTTT	„Touch Down“ Profil	604 bp
<i>KIF1B</i> _Ex23_R	PCR + SQ	CCTACTATGTTCCAGCCAC		
<i>KIF1B</i> _Ex24_F	PCR + SQ	GGGTTATTCCCTATGACTGC	63°C	546 bp
<i>KIF1B</i> _Ex24_R	PCR + SQ	GTGTGTGAGGAGTGCATTIA		
<i>KIF1B</i> _Ex25.2_F	PCR + SQ	TCTTGAACGGAAGATGCT	53°C	291 bp
<i>KIF1B</i> _Ex25.3_R	PCR + SQ	CTGCTCAGGTTTTAAACAC		
<i>KIF1B</i> _Ex26_F	PCR + SQ	CTTGCCCTTGTTCCTTTC	63°C	594 bp
<i>KIF1B</i> _Ex26_R	PCR + SQ	AGACCAGCACTGACTAAGA		
<i>KIF1B</i> _ex27.3_F	PCR + SQ	TCTTCGTCACAGTTCTGC	53°C	423 bp
<i>KIF1B</i> _ex27.3_R	PCR + SQ	TGTGTAATATAAGCGTGACC		
<i>KIF1B</i> _Ex28_F	PCR + SQ	CATTTGAGCTGAGGAAGTTG	63°C	437 bp
<i>KIF1B</i> _Ex28_R	PCR + SQ	GTCTATACACCTTTACCTTC		
<i>KIF1B</i> _Ex29-30_F	PCR + SQ	GCCCTCAGTCCATATAATTT	63°C	680 bp
<i>KIF1B</i> _Ex29-30_R	PCR + SQ	GTTAATCCCTCACACATGTA		
<i>KIF1B</i> _Ex31_F	PCR + SQ	ATATAGCTAAGTGATCAGGG	63°C	451 bp
<i>KIF1B</i> _Ex31_R	PCR + SQ	CCACGCCCTCTATTGTCTA		
<i>KIF1B</i> _ex32.2_F	PCR + SQ	AACCCAAAATACGTAATAA	„Touch Down“ Profil	373 bp
<i>KIF1B</i> _Ex32_R	PCR + SQ	CAGTGATTAGGTGGCTATAA		
<i>KIF1B</i> _Ex33_F	PCR + SQ	ATGTTGTGCTTCTGTACT	61°C	364 bp
<i>KIF1B</i> _Ex33.2_R	PCR + SQ	AGATACATACAAGAGGAGC		
<i>KIF1B</i> _Ex34_F	PCR + SQ	TATATTGGTGTCTCTCTGGG	63°C	442 bp
<i>KIF1B</i> _Ex34_R	PCR + SQ	CCAACCTGGTCAACATAACA		
<i>KIF1B</i> _Ex35_F	PCR + SQ	TAGATGTGTGGAAAGGATGA	63°C	342 bp
<i>KIF1B</i> _ex35.2_R	PCR + SQ	GCCCACCCTCTGAAATAGA		
<i>KIF1B</i> _Ex36_F	PCR + SQ	CCTGACACATCTCCCTTTG	„Touch Down“ Profil	475 bp
<i>KIF1B</i> _Ex36_R	PCR + SQ	GAATAACATCTCTAACAGGG		
<i>KIF1B</i> _Ex37_F	PCR + SQ	CTCAATGTGGGAAGTAATGG	63°C	435 bp
<i>KIF1B</i> _Ex37_R	PCR + SQ	GCAGGCAGGTGAAGAAATAA		
<i>KIF1B</i> _Ex38_F	PCR + SQ	AGGGTTCCTCTCTGTTATTA	63°C	457 bp
<i>KIF1B</i> _Ex38_R	PCR + SQ	GAGTAAACAGAACCCAGGAA		
<i>KIF1B</i> _Ex39_F	PCR + SQ	ACTCTCTTTCCTCAGTTTC	63°C	578 bp
<i>KIF1B</i> _Ex39_R	PCR + SQ	CCCTCATAACTCGTCCATC		
<i>KIF1B</i> _Ex40_F	PCR + SQ	AAATTGAGATGAAAGCGGAC	63°C	457 bp
<i>KIF1B</i> _Ex40_R	PCR + SQ	GTATTTTGGTAGAAAGGGG		
<i>KIF1B</i> _Ex41-42_F	PCR	CGTTTTGACCTAAACTTGGA	63°C	675 bp
<i>KIF1B</i> _Ex41-42_R	PCR + SQ	GAGAGGCTAGTTTGTGGAG		
<i>KIF1B</i> _ex41-42.2_F	SQ	CTTGTTTCTCTTGTCTTAG	60°C	629 bp
<i>KIF1B</i> _ex41_R	SQ	CTATAGCAAACACAAAGCTC	60°C	308 bp



<i>KIF1B_ex43.2_F</i>	PCR + SQ	GCATAGGGAGAGGAGATGT	63°C	373 bp
<i>KIF1B_Ex43_R</i>	PCR + SQ	TAGAATGAATACCAGAGCAG		
<i>KIF1B_Ex44_F</i>	PCR + SQ	TATCAAAGTGAGGTTCTGGT	63°C	413 bp
<i>KIF1B_Ex44_R</i>	PCR + SQ	AGCTATGATGTGAAGAGATG		
<i>KIF1B_Ex45_F</i>	PCR + SQ	GCTCTCTGCAACTCAAGTT	63°C	467 bp
<i>KIF1B_Ex45_R</i>	PCR + SQ	ATTATGAGACCCAACCTGGAG		
<i>KIF1B_Ex46-47_F</i>	PCR + SQ	GTCATTTGCTGTTCATCG	63°C	706 bp
<i>KIF1B_Ex46-47_R</i>	PCR + SQ	GCACTTCAGGGAGAAAAAG		
<i>KIF1B_Ex48_F</i>	PCR + SQ	GCCAAATAGGAAGATGCTC	63°C	668 bp
<i>KIF1B_Ex48_R</i>	PCR + SQ	CCAGATGTCTCCTCCCTTA		

Tabelle A2: Übersicht über die verwendeten MAX-Primer

<i>MAX-Gen</i>				
Primer	Verwendung	Nukleotidsequenz 5'→3'	PCR-Annealing-Temperatur	Produktgröße
<i>MAX_ex01_F</i>	PCR + SQ	TTAGAGGGACAAGAACTACA	63°C	435 bp
<i>MAX_ex01_R</i>	PCR + SQ	GTCGCCCGCTAAGAGC		
<i>MAX_ex02_F</i>	PCR + SQ	CTGCTACCGGATCCCGC	63°C	481 bp
<i>MAX_ex02_R</i>	PCR + SQ	GCTCCTTACTCACCTAGA		
<i>MAX_ex03_F</i>	PCR + SQ	CCCACCTCGAGAAATCCT	63°C	452 bp
<i>MAX_ex03_R</i>	PCR + SQ	TAAACTGGAGTACGTAAGGT		
<i>MAX_ex05a_F</i>	PCR + SQ	GTATTTCTCAGCCTTTCC	63°C	535 bp
<i>MAX_ex05a_R</i>	PCR + SQ	TTACACAGCACATTCCACTC		
<i>MAX_ex07A_F</i>	PCR + SQ	AAGCAAGCCCTTAGGAAGAA	63°C	380 bp
<i>MAX_ex07A_R</i>	PCR + SQ	TGGGCAGGACACTATGTG		

Tabelle A3: Übersicht über die verwendeten *NFI*-Primer und die teilweise verwendeten universellen Sequenzen

Alle mit einem Stern „\*1“ oder „\*2“ markierten Primer wurden mit universellen Tag-Sequenzen verlängert. Bei den „\_F“-Primern kam die Sequenz des T7-RNA-Polymerase-Promoters (T7) und bei den „\_R“-Primern die Sequenz des SP6-RNA-Polymerase-Promoters (SP6) sowie jeweils eine zusätzliche Spacer-Sequenz von 8 Basen zum Einsatz (die Tag-Sequenzen mit der jeweiligen Spacer-Sequenz sind am Ende der Tabelle A3 aufgeführt). Die PCR-Produktgrößen der einzelnen *NFI*-Primerpaare sind jeweils als PCR-Produkt (Tag-Sequenzen an den Primern wurden miteinberechnet) und als genomisches Target (Tag-Sequenzen wurden nicht berücksichtigt) angegeben. \*Die Produktgröße wurde für die Länge des PCR-Produkts und des genomischen Targets angegeben: PCR-Produkt (genomisches Target).

<i>NFI-Gen</i>				
Primer	Verwendung	Nukleotidsequenz 5'→3'	PCR-Annealing-Temperatur	Produktgröße*
<i>NFI_Ex1_F</i> *1	PCR	TCTCCTTGCCCTTCCCTCA	63°C	299 bp (238 bp)
<i>NFI_Ex1_R</i> *2	PCR	CTCCTACCTCCCCTCACCTA		
<i>NFI_Ex2_Fngs_T7</i> *1	PCR	GGCAAGTAAGTTATTTATGGTCG	63°C	387 bp (326 bp)
<i>NFI_Ex2_R</i> *2	PCR	CCAAAGTCCACAGAAAATCA		
<i>NFI_Ex3_F</i> *1	PCR	AGATGTGTGTTGATTGGTAGC	63°C	258 bp (197 bp)
<i>NFI_Ex3_R</i> *2	PCR	CAAGATCAAATTCACAAAGCC		
<i>NFI_Ex4_F</i> *1	PCR	GTGGTGTGTATGTAAGGTGTTT	63°C	470 bp (409 bp)
<i>NFI_Ex4_R</i> *2	PCR	ACCTCATTTCCATTAACCTTTTTA		
<i>NFI_Ex5_F</i> *1	PCR	ACCACACCTGTCCCCTAATA	63°C	275 bp (214 bp)
<i>NFI_Ex5_R</i> *2	PCR	GTTTTTGACCCAGTGATTTTTTTC		
<i>NFI_Ex6_F</i> *1	PCR	TTTGCTCTGAGTTGTATTTGTG	63°C	255 bp (194 bp)
<i>NFI_Ex6_R</i> *2	PCR	AACAACAGCAAATTTTACATCA		
<i>NFI_Ex7_F</i> *1	PCR	ATGAAGGAAGTTAGAAGTTTG	63°C	366 bp (305 bp)
<i>NFI_Ex7_Rngs_SP6</i> *2	PCR	AGTATTTCTATTTGACACCAG		

<i>NFI_Ex8_F</i> * <sup>1</sup>	PCR	TTTAAAAATGTTGCCCTTGG	63°C	403 bp
<i>NFI_Ex8_R</i> * <sup>2</sup>	PCR	AAGCCTAAAGTAATACACACC		(342 bp)
<i>NFI_Ex9_F</i> * <sup>1</sup>	PCR	GTATGAGTTTTAGAGGCTGTT	63°C	475 bp
<i>NFI_Ex9_R</i> * <sup>2</sup>	PCR	AACAACAAAAGCAAGTCCTAT		(414 bp)
<i>NFI_Ex10_F</i> * <sup>1</sup>	PCR	GTGGGTAATGTGTTGATGTTA	63°C	371 bp
<i>NFI_Ex10_R</i> * <sup>2</sup>	PCR	ATACCGATAAAAAGTGAACCTA		(310 bp)
<i>NFI_Ex11_Fngs_T7</i> * <sup>1</sup>	PCR	ACTATAGAGATTAATAGGTTACAC	63°C	395 bp
<i>NFI_Ex11_R</i> * <sup>2</sup>	PCR	TAAAAAGAAATACGCAAAGAAAAGAA		(334 bp)
<i>NFI_Ex12_F</i> * <sup>1</sup>	PCR	AGTTCCCGACAAAAGGATAAAA	63°C	378 bp
<i>NFI_Ex12_R</i> * <sup>2</sup>	PCR	AAAGCAGCAGGAATAGGATAAAGA		(317 bp)
<i>NFI_Ex13_F3</i>	PCR	TGCATCTTACAATTGATAATGTT	56°C	662 bp
<i>NFI_Ex13_R2</i>	PCR und SQ	TCAAGGTCTTGGCGTTTCAGCT		
<i>NFI_Ex13_F2</i>	SQ	CTTACTATTGAGTGTCTTACTA	60°C	364 bp
<i>NFI_Ex14_F</i> * <sup>1</sup>	PCR	TTCTTCCTCTTCTAATCTCTC	63°C	327 bp
<i>NFI_Ex14_R</i> * <sup>2</sup>	PCR	AGAAACCACACACCAAAGGAA		(266 bp)
<i>NFI_Ex15_F</i> * <sup>1</sup>	PCR	ACTCCAGTGTTATGTTTACCA	63°C	330 bp
<i>NFI_Ex15_R</i> * <sup>2</sup>	PCR	AAAACCTTTGGAAGTGAAGT		(269 bp)
<i>NFI_Ex16_F</i> * <sup>1</sup>	PCR	CTGGTTATATCTGCATTAGGTT	63°C	307 bp
<i>NFI_Ex16_R</i> * <sup>2</sup>	PCR	ATCTCTCACCATTACCATTCC		(246 bp)
<i>NFI_Ex17_F</i> * <sup>1</sup>	PCR	AAACAGGAAGACAACCTCAAATAA	63°C	358 bp
<i>NFI_Ex17_R</i> * <sup>2</sup>	PCR	ATTCAGAAAACAAACAGAGCAC		(297 bp)
<i>NFI_Ex18_F</i> * <sup>1</sup>	PCR	ACACACAGTTTATTGCATTG	63°C	460 bp
<i>NFI_Ex18_R</i> * <sup>2</sup>	PCR	ATTCTCAAAATCAGATGCCA		(399 bp)
<i>NFI_Ex19_F</i> * <sup>1</sup>	PCR	TCTGCTCTTCTACTCCTTTTG	63°C	324 bp
<i>NFI_Ex19_R</i> * <sup>2</sup>	PCR	AAAGCTATTCCTGATCACACA		(263 bp)
<i>NFI_Ex20_F</i> * <sup>1</sup>	PCR	GGCTGTAGCTGATTGATGTTT	63°C	311 bp
<i>NFI_Ex20_R</i> * <sup>2</sup>	PCR	TATGTTTACTTTACTGAGCGAC		(250 bp)
<i>NFI_Ex21_F-A</i> * <sup>1</sup>	PCR	GGAAGAAATGTTGGATAAAGC	63°C	515 bp
<i>NFI_Ex21_R-A</i> * <sup>2</sup>	PCR	CTCAATTCTAGACCCACCAG		(454 bp)
<i>NFI_Ex21_F-B</i> * <sup>1</sup>	PCR	ACGTAAGGTTCTATGATTT	63°C	430 bp
<i>NFI_Ex21_R-B</i> * <sup>2</sup>	PCR	CTCTTCTTCTGCAATTTTTTG		(369 bp)
<i>NFI_Ex22_F</i> * <sup>1</sup>	PCR	TCTCTAGGGGGTCTGTCTTC	63°C	377 bp
<i>NFI_Ex22_R</i> * <sup>2</sup>	PCR	TGTGTGCAGTAAAGAATGGC		(316 bp)
<i>NFI_Ex23_F</i> * <sup>1</sup>	PCR	GCCTTCTCTTTTGTCTATATCTG	63°C	319 bp
<i>NFI_Ex23_R</i> * <sup>2</sup>	PCR	CCGCATATCTACTCTTTTCT		(258 bp)
<i>NFI_Ex24_F</i> * <sup>1</sup>	PCR	CATTGTTTGCTGTTTCTCTTTC	63°C	232 bp
<i>NFI_Ex24_R</i> * <sup>2</sup>	PCR	AACTCTCACAGTAAAACCCAC		(171 bp)
<i>NFI_Ex25_Fngs_T7</i> * <sup>1</sup>	PCR	GGAAGTGAAGAAGTGAAGA	63°C	292 bp
<i>NFI_Ex25_R</i> * <sup>2</sup>	PCR	GGCTTTATTTGCTTTTTGCTT		(231 bp)
<i>NFI_Ex26_F</i> * <sup>1</sup>	PCR	ATTGTTTTGGAATGTCTGGTT	63°C	383 bp
<i>NFI_Ex26_R</i> * <sup>2</sup>	PCR	CTTCTTACATGCCAGTTCT		(322 bp)
<i>NFI_Ex27_F</i> * <sup>1</sup>	PCR	AGGTGAGATCAAATGAAAGT	63°C	529 bp
<i>NFI_Ex27_R</i> * <sup>2</sup>	PCR	CACCTAACTAAACATCTTTCT		(468 bp)
<i>NFI_Ex28_F</i> * <sup>1</sup>	PCR	ACTTTGGGTTTACATTTTTGC	63°C	408 bp
<i>NFI_Ex28_R</i> * <sup>2</sup>	PCR	TTAAAAGAAGACAATCAGCCC		(347 bp)
<i>NFI_Ex29_F</i> * <sup>1</sup>	PCR	AAGGTAAAATATATGGAGCAGG	54°C	236 bp
<i>NFI_Ex29_R</i> * <sup>2</sup>	PCR	GTGAAAAGATGACAAACCTG		(175 bp)
<i>NFI_Ex30_F</i> * <sup>1</sup>	PCR	AGGAGTGATTTTTGTTATTTGTTTTA	63°C	359 bp
<i>NFI_Ex30_R</i> * <sup>2</sup>	PCR	TTAACACACACCATCAGCA		(298 bp)

## Anhang

<i>NF1</i> _Ex31_F * <sup>1</sup>	PCR	GTTGCTGTATGTAGTCGGTG	63°C	278 bp
<i>NF1</i> _Ex31_R * <sup>2</sup>	PCR	GAAGGTCAAATAGGCTGAAG		(217 bp)
<i>NF1</i> _Ex32_F <sup>2</sup>	PCR und SQ	GACCTTTGAACTCTTTGTTTTTC	58°C	348 bp
<i>NF1</i> _Ex32_R <sup>2</sup>	PCR und SQ	ACTGAAAACCATAGGGTATTTC		
<i>NF1</i> _Ex33_F * <sup>1</sup>	PCR	AATTTATAGAATGAGGAATGTTTG	63°C	346 bp (285 bp)
<i>NF1</i> _Ex33_R * <sup>2</sup>	PCR	TTGATTCAAACAGAGCAACT		
<i>NF1</i> _Ex34_F * <sup>1</sup>	PCR	GGTGTATCTGGTGTGAAAAT	63°C	358 bp (297 bp)
<i>NF1</i> _Ex34_R * <sup>2</sup>	PCR	.AGTCCAAGAAGATGCAAAAGTA		
<i>NF1</i> _Ex35_F * <sup>1</sup>	PCR	AGTAAAAGGAAAAGCAACCAG	63°C	360 bp (299 bp)
<i>NF1</i> _Ex35_R * <sup>2</sup>	PCR	CAAACCTCTCCTTCTCAACCAA		
<i>NF1</i> _Ex36_F * <sup>1</sup>	PCR	AATTACCCTTTAGAATGCCTG	63°C	381 bp (320 bp)
<i>NF1</i> _Ex36_R * <sup>2</sup>	PCR	ACTTGCCATCTCTCTATATTG		
<i>NF1</i> _Ex37_F-A * <sup>1</sup>	PCR	AAATGAATCCAGACTTTGAAGAA	63°C	531 bp (470 bp)
<i>NF1</i> _Ex37_R-A * <sup>2</sup>	PCR	TTCATGCTCTATGTGCTCAG		
<i>NF1</i> _Ex37_F-B * <sup>1</sup>	PCR	TGTTTTCTGGCTTTGCTT	63°C	457 bp (396 bp)
<i>NF1</i> _Ex37_R-B * <sup>2</sup>	PCR	CAGCCTTACGTGACATTTTA		
<i>NF1</i> _Ex38_F * <sup>1</sup>	PCR	CTGGAGCCTTTTGAATTTTA	63°C	526 bp (465 bp)
<i>NF1</i> _Ex38_R * <sup>2</sup>	PCR	TTAAAAGCAACAAACCCCAAATC		
<i>NF1</i> _Ex39_F * <sup>1</sup>	PCR	TTGGAACTATAAGGAAAAATACG	63°C	392 bp (331 bp)
<i>NF1</i> _Ex39_R * <sup>2</sup>	PCR	CTGAAATGAAAGGGTTTTCT		
<i>NF1</i> _Ex40_F * <sup>1</sup>	PCR	CTTTACCTTTTACCATTTTTTCCC	63°C	417 bp (356 bp)
<i>NF1</i> _Ex40_R * <sup>2</sup>	PCR	GTGGCACCAGATAAATATGT		
<i>NF1</i> _Ex41_F * <sup>1</sup>	PCR	AGGCCTCAGGTAAAATAGAA	63°C	379 bp (318 bp)
<i>NF1</i> _Ex41_R * <sup>2</sup>	PCR	AAAACCTCCTGATGATAAAAC		
<i>NF1</i> _Ex42_Fngs_T7* <sup>1</sup>	PCR	GGTTTCAAGCAAGGTAATCAC	63°C	572 bp (511 bp)
<i>NF1</i> _Ex42_R * <sup>2</sup>	PCR	GGTGAAGTAAAATGGAGAAAGG		
<i>NF1</i> _Ex43_F * <sup>1</sup>	PCR	AGAGGTTTGATTTAGGGAACA	63°C	544 bp (483 bp)
<i>NF1</i> _Ex43_R * <sup>2</sup>	PCR	GTCCATGCAAGTGTTTTTATT		
<i>NF1</i> _Ex44_F * <sup>1</sup>	PCR	AAATAAAAAACACTGTCATGGAC	63°C	392 bp (331 bp)
<i>NF1</i> _Ex44_R * <sup>2</sup>	PCR	GCAATTAAAAGATCCACAGAAC		
<i>NF1</i> _Ex45_F * <sup>1</sup>	PCR	AGTGGACAGAACTAGCTCAA	57°C	403 bp (342 bp)
<i>NF1</i> _Ex45_R * <sup>2</sup>	PCR	AGATATGCTTTACAACCTTGAG		
<i>NF1</i> _Ex46_F * <sup>1</sup>	PCR	CGAGATTCAGTTTAGGAGTT	63°C	288 bp (227 bp)
<i>NF1</i> _Ex46_R * <sup>2</sup>	PCR	AACATTCAACTGATACCC		
<i>NF1</i> _Ex47_F * <sup>1</sup>	PCR	AACATGGGTAATTAGGAAGA	63°C	381 bp (320 bp)
<i>NF1</i> _Ex47_R * <sup>2</sup>	PCR	AGCAACAAGAAAAGATGGAAGA		
<i>NF1</i> _Ex48_F * <sup>1</sup>	PCR	AAATGTTCTGTGGTTTTCTG	63°C	478 bp (417 bp)
<i>NF1</i> _Ex48_R * <sup>2</sup>	PCR	CCTGGCCTAGTTGCATTTA		
<i>NF1</i> _Ex49_F * <sup>1</sup>	PCR	AGAGTTGTTAGTCAGGGAAG	63°C	359 bp (298 bp)
<i>NF1</i> _Ex49_R * <sup>2</sup>	PCR	GGTATTTGTACTTTTTGGGTGA		
<i>NF1</i> _Ex50_F * <sup>1</sup>	PCR	ATTTAACAGGTACTATGCTCT	54°C	409 bp (348 bp)
<i>NF1</i> _Ex50_R * <sup>2</sup>	PCR	ATTTCTCCCATGTTACCTTCT		
<i>NF1</i> _Ex51_F * <sup>1</sup>	PCR	AATGATTGCTGTTGTTAGGA	63°C	448 bp (387 bp)
<i>NF1</i> _Ex51_R * <sup>2</sup>	PCR	AAACTTTGCTACACTGACAT		
<i>NF1</i> _Ex52_F * <sup>1</sup>	PCR	TCCAGGGATGTATTAGAGCTT	63°C	380 bp (319 bp)
<i>NF1</i> _Ex52_R * <sup>2</sup>	PCR	TTTCATGACTCTCCACCTT		
<i>NF1</i> _Ex53_F * <sup>1</sup>	PCR	AAACTTTTTGTGTAGGCGAATA	63°C	482 bp (421 bp)
<i>NF1</i> _Ex53_R * <sup>2</sup>	PCR	TGAATTGTTATCTGTTGGGTG		

<i>NFI_Ex54_F</i> * <sup>1</sup>	PCR	CTTCTACTTCTCACCCAAACA	63°C	344 bp
<i>NFI_Ex54_R</i> * <sup>2</sup>	PCR	ATATCTCATTTTGCCTCTTTG		(283 bp)
<i>NFI_Ex55_Fngs_T7</i> * <sup>1</sup>	PCR	TAATTTTGGCACATTATTCTGG	63°C	381 bp
<i>NFI_Ex55_R</i> * <sup>2</sup>	PCR	TCAGTGCATTCTACAACAGC		(320 bp)
<i>NFI_Ex56_F</i> * <sup>1</sup>	PCR	GTTGCTTTGACACTCATTCT	63°C	314 bp
<i>NFI_Ex56_R</i> * <sup>2</sup>	PCR	AGGCATACTAATTGAACAGA		(253 bp)
<i>NFI_Ex57_F</i> * <sup>1</sup>	PCR	ATATTACTCCACTCCCCTTTT	63°C	478 bp
<i>NFI_Ex57_R</i> * <sup>2</sup>	PCR	GTTGGTGTCTTATATTGTTGCT		(417 bp)
<i>NFI_Ex58_F</i> * <sup>1</sup>	PCR	CTGGAAGGAAAAGAAGAAGTAAC	63°C	298 bp
<i>NFI_Ex58_R</i> * <sup>2</sup>	PCR	AGTGAAGAGCCCATGTTAAG		(237 bp)
<b>Universelle Primer + Primer-Sequenzen</b>				
<b>Primer</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Nukleotidsequenz 5'→3'</b>	<b>PCR-Annealing-Temperatur</b>	<b>Produktgröße</b>
* <sup>1</sup> Tag-Sequenz <i>NFI</i> forward Primer + <u>Spacer-Sequenz</u>	PCR	CAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAA GGCT	-	-
* <sup>2</sup> Tag-Sequenz <i>NFI</i> reverse Primer + <u>Spacer-Sequenz</u>	PCR	CGATTTAGGTGACACTATAGAAGAGAG GCT	-	-
T7	SQ	TAATACGACTCACTATAGGG	60°C	-
SP6	SQ	GATTTAGGTGACACTATAG	60°C	-

Tabelle A4: Übersicht über die verwendeten *RET*-Primer

<i>RET</i> -Gen				
Primer	Verwendung	Nukleotidsequenz 5'→3'	PCR-Annealing-Temperatur	Produktgröße
<i>RET_Ex8_F</i>	PCR + SQ	TGGTGCTGTTCCCTGTCCCTTG	63°C	336 bp
<i>RET_Ex8_R</i>	PCR + SQ	GGGGATGAGGTGCCAGAAGC		
<i>RET_Ex10_F</i>	PCR + SQ	CCTATGCTTGGCACCAGTTG	63°C	314 bp
<i>RET_Ex10_R</i>	PCR + SQ	CTTGTGGGACCTCAGATGTGC		
<i>RET_Ex11_F</i>	PCR + SQ	ATGAGGCAGACATACGCAGC	63°C	440 bp
<i>RET_Ex11_R</i>	PCR + SQ	GCAGCCCCTCACAGGATGG		
<i>RET_Ex13_F</i>	PCR + SQ	CTTGGGCAAGGCGATGCAGG	63°C	276 bp
<i>RET_Ex13_R</i>	PCR + SQ	GAGAACAGGGCTGTATGGAGC		
<i>RET_EX14_F</i>	PCR + SQ	GCTGTGTCCACCCCTTACTCA	63°C	460 bp
<i>RET_EX14_R</i>	PCR + SQ	TGGTGGGCTAGAGTGTGGCA		
<i>RET_Ex15_F</i>	PCR + SQ	CCTCTGCTGGTCACACCAGG	63°C	317 bp
<i>RET_Ex15_R</i>	PCR + SQ	CTTAGAGCTCCACTAATCTTCG		
<i>RET_Ex16_F</i>	PCR + SQ	GTGTCTACAGCACTCCTCTGG	63°C	344 bp
<i>RET_EX16_R</i>	PCR + SQ	TGAGGGGGTCATTGCAGAGG		

Tabelle A5: Übersicht über die verwendeten *SDHA*-Primer

Alle mit „<sup>344</sup>“ markierten *SDHA*-Primer wurden der Arbeit von Baysal et al (2007) [42] entnommen. Das Basisdesign der mit „<sup>444</sup>“ markierten Primer beruht ebenfalls auf dieser Arbeit, wurde aber im Zuge der Assay Entwicklung verändert. Alle anderen Primer wurden entsprechend dem im Abschnitt 3.2.2.1. beschriebenen Designprozess erstellt.

<i>SDHA</i> -Gen				
Primer <sup>1</sup>	Verwendung	Nukleotidsequenz 5'→3'	PCR-Annealing-Temperatur	Produktgröße
<i>SDHA_ex01_F1</i>	PCR + SQ	GGTCTGGGCGATCCCGGA	63°C	536 bp
<i>SDHA_ex01_R1</i> * <sup>3</sup>	PCR + SQ	TCCCAGTCCCGGGACAGA		

<i>SDHA_ex02_Fneu</i> * <sup>3</sup> * <sup>4</sup>	PCR + SQ	TGCAAGGGGAAATTACTATC	53°C	414 bp
<i>SDHA_ex02_Rneu</i> * <sup>3</sup> * <sup>4</sup>	PCR + SQ	ACTTGATCTAAATTTAAATCTAG		
<i>SDHA_ex03_F3</i> * <sup>3</sup>	PCR + SQ	AGGTGCGAATGTGCCACC	„Touch Down“ Profil	466 bp
<i>SDHA_ex03_R3</i> * <sup>3</sup> * <sup>4</sup>	PCR + SQ	TAAGGCACAGCAAGAGGCCA		
<i>SDHA_ex04_F4</i> * <sup>3</sup>	PCR + SQ	GCCTGGAAGACAAAGTTGGC	63°C	308 bp
<i>SDHA_ex04_R4</i> * <sup>3</sup>	PCR + SQ	TTCTTTTGGCTGCCACATCC		
<i>SDHA_ex05_F5</i> * <sup>3</sup>	PCR + SQ	TCTTTTTCCGTTATGAACTATGC	63°C	496 bp
<i>SDHA_ex05_R5</i> * <sup>3</sup> * <sup>4</sup>	PCR + SQ	CTGCATGCGCCCCACGCT		
<i>SDHA_ex06_F6</i> * <sup>3</sup>	PCR + SQ	CTGCCTGTCTGTACTGCTC	63°C	440 bp
<i>SDHA_ex06_R6</i> * <sup>3</sup>	PCR + SQ	CAAGGCCTGTGTCTAAACCGT		
<i>SDHA_Ex6nest_F</i>	SQ	TTCCTTTCTTTTAGTCTCTG	60°C	280 bp
<i>SDHA_ex07_F7</i> * <sup>3</sup>	PCR + SQ	TGTCCATTCTGTGATCTACC	63°C	344 bp
<i>SDHA_ex07_R7</i> * <sup>3</sup>	PCR + SQ	AGTTAGGACCTGAGAGCTGA		
<i>SDHA_ex08_F8</i> * <sup>3</sup>	PCR + SQ	TCTAGCAATTGTTAGTAATAAAT	53°C	351 bp
<i>SDHA_ex08_R8</i> * <sup>3</sup>	PCR + SQ	AGACGCCTGCCAGCAGCTA		
<i>SDHA_ex09_F9</i> * <sup>3</sup> * <sup>4</sup>	PCR + SQ	GGTCTCCTGCCGTTGCCG	66°C	314 bp
<i>SDHA_ex09_R9</i> * <sup>3</sup> * <sup>4</sup>	PCR + SQ	TGCGAGGTGGCCCCGT		
<i>SDHA_Ex10.2_F</i>	PCR + SQ	TGGCCTACTTCCCTCTCT	53°C	350 bp
<i>SDHA_ex10_R10</i> * <sup>3</sup>	PCR + SQ	AAAAAGAAAAAAGACTTTCTAACG		
<i>SDHA_ex11_F11</i> * <sup>3</sup>	PCR + SQ	GTTAGCTCAGGAGACTTACAG	63°C	540 bp
<i>SDHA_ex11_R11</i> * <sup>3</sup> * <sup>4</sup>	PCR + SQ	CACTTGGAAAGTGAAGCTGAA		
<i>SDHA_ex12-13_F12-13</i> * <sup>3</sup>	PCR + SQ	TCCTAATTTTCTGTTAATTTATG	53°C	665 bp
<i>SDHA_ex12-13_R12-13</i> * <sup>3</sup> * <sup>4</sup>	PCR + SQ	TGAGTCCCACCAGGTGGC		
<i>SDHA_Ex14F_2.2</i>	PCR + SQ	ACTCACTGTGGCTGCACACCCC	63°C	673 bp
<i>SDHA_Ex14R_2.2</i>	PCR + SQ	TAATGGCTGTGTGCCCCACCC		
<i>SDHA_ex15_F15</i> * <sup>3</sup>	PCR + SQ	GAATCTTAAAGTTCACATGCCA	63°C	655 bp
<i>SDHA_ex15_R15</i>	PCR	GATTGTACTACTGCACCGAT		
<i>SDHA_ex15_Rneu</i>	SQ	GTAACACAATACAAAGATTACA	60°C	568 bp

Tabelle A6: Übersicht über die verwendeten *SDHB*-Primer

<i>SDHB</i> -Gen				
Primer	Verwendung	Nukleotidsequenz 5' → 3'	PCR-Annealing-Temperatur	Produktgröße
<i>sdhB1F</i>	PCR + SQ	CCCACTTGGTTGCTCGTACG	63°C	259 bp
<i>sdhB1R</i>	PCR + SQ	GCTCCAGGCAGTCTCTGTGG		
<i>sdhB2F</i>	PCR + SQ	CCAGCGTTACATCTGTTGTGC	63°C	292 bp
<i>sdhB2R</i>	PCR + SQ	CAAGGATGTGAAAAGCATGTCC		
<i>sdhB3F</i>	PCR + SQ	GGATAAGCTAATACATCCAGGTG	63°C	274 bp
<i>sdhB3R</i>	PCR + SQ	GTTTCCAGATGTCTCTATCAGC		
<i>sdhB4F</i>	PCR + SQ	GAGGAATGTTGCATGTCAGTGC	63°C	325 bp
<i>sdhB4R</i>	PCR + SQ	GCGTAACACACATAGCACTGC		
<i>sdhB5F</i>	PCR + SQ	TGCCTGGCATAGAGTGGACG	63°C	327 bp
<i>sdhB5R</i>	PCR + SQ	GCATCAGCTTATGTTCCCTGC		
<i>sdhB6F</i>	PCR + SQ	CAAGTAGGCACTTTGTTTCATGC	63°C	289 bp
<i>sdhB6R</i>	PCR + SQ	CAGCAATCTATTGCTCTTTGG		
<i>sdhB7F</i>	PCR + SQ	AGAGCTTTGAGTTGAGCCAGG	63°C	273 bp
<i>sdhB7R</i>	PCR + SQ	CACCTTTTGTGAGCACATGC		
<i>sdhB8F</i>	PCR + SQ	CACTGAACCAGCTGAGGAAGG	63°C	395 bp
<i>sdhB8R</i>	PCR + SQ	CCAAGGACAAGGACTCTGG		

**Tabelle A7: Übersicht über die verwendeten *SDHC*-Primer**

<i>SDHC</i> -Gen				
Primer	Verwendung	Nukleotidsequenz 5' → 3'	PCR-Annealing-Temperatur	Produktgröße
<i>sdhC1F</i>	PCR + SQ	CAACCAGCAAACCAGCTAGGC	63°C	211 bp
<i>sdhC1R</i>	PCR + SQ	GCACCAACTCCCAGTCCCAC		
<i>SDHC2A</i>	PCR + SQ	TTCAAGTTACTTGGAGTTGTAGC	63°C	298bp
<i>sdhC2R</i>	PCR + SQ	TGACAGAGCGAGACTCCGTC		
<i>sdhC3F</i>	PCR + SQ	CTGAGCAACCATGCCTGGCT	63°C	241 bp
<i>sdhC3R</i>	PCR + SQ	CTCTGGCTCCAGAATCCTTCC		
<i>sdhC4F</i>	PCR + SQ	AGATAGACTCTCTACTATGGTGTC	63°C	218 bp
<i>sdhC4R</i>	PCR + SQ	GAGTTTCAAAGGAGGCGGAGAC		
<i>sdhC5F</i>	PCR + SQ	GTAACCTATGAGCAGCTGTGAC	63°C	257 bp
<i>sdhC5R</i>	PCR + SQ	TCCCCACTCCCTTACAGAG		
<i>sdhC6F</i>	PCR + SQ	TGAGACAGGAAGTGAATGTCC	63°C	254 bp
<i>sdhC6R</i>	PCR + SQ	CCAGGCTGGAGATAAGAATGAC		

**Tabelle A8: Übersicht über die verwendeten *SDHD*-Primer**

<i>SDHD</i> -Gen				
Primer	Verwendung	Nukleotidsequenz 5' → 3'	PCR-Annealing-Temperatur	Produktgröße
<i>SDHD1F-1</i>	PCR + SQ	GACAGCTGTGTTTGCCGATG	63°C	232 bp
<i>SDHD1R</i>	PCR + SQ	TCAGGGTGGGAAGACCCCT		
<i>SDHD_Ex2_F</i>	PCR + SQ	AAAGTAGGGAACATGCAGATG	63°C	380 bp
<i>SDHD_Ex2_R</i>	PCR + SQ	AAGGCATGACCATTAGTGAA		
<i>SDHD3FNEU</i>	PCR + SQ	GTACACTGCCTGTCAAGTTTGG	63°C	297 bp
<i>SDHD3RNEU</i>	PCR + SQ	GCTCACAGCAAACAACTGAGC		
<i>SDHD4F-2</i>	PCR + SQ	CAAACAGTGACAGTGGAGTGG	63°C	338 bp
<i>SDHD4R-1</i>	PCR + SQ	CATCAATTCTTCAAAGTATGAAGTC		

**Tabelle A9: Übersicht über die verwendeten *SDH5*-Primer**

<i>SDH5</i> -Gen				
Primer	Verwendung	Nukleotidsequenz 5' → 3'	PCR-Annealing-Temperatur	Produktgröße
<i>SDH5_Ex1_F</i>	PCR + SQ	CCTTCCGGCTCAGCTCCTC	63°C	222 bp
<i>SDH5_Ex1_R</i>	PCR + SQ	CCCCAAGATAGAGACCACAGA		
<i>SDH5_Ex2_F</i>	PCR + SQ	TGGCCAGCAGTGAATTTTC	63°C	443 bp
<i>SDH5_Ex2_R</i>	PCR + SQ	ACACCAAGACTCCTACTCCT		
<i>SDH5_Ex3_F</i>	PCR + SQ	CTTGGTGTCACTTCTTTTAT	63°C	248 bp
<i>SDH5_Ex3_R</i>	PCR + SQ	AATTCTAGACTCAAATCAGCC		
<i>SDH5_Ex4_F</i>	PCR + SQ	TGGCCAGTGTTCGAGTTTTA	63°C	306 bp
<i>SDH5_Ex4_R</i>	PCR + SQ	CATCTAAGAAGCCGAAGCA		

**Tabelle A10: Übersicht über die verwendeten *TMEM127*-Primer**

<i>TMEM127</i> -Gen				
Primer	Verwendung	Nukleotidsequenz 5' → 3'	PCR-Annealing-Temperatur	Produktgröße
<i>TMEM127_Ex1_F</i>	PCR + SQ	TTGCTATCCTCCACCGGAC	60°C	423 bp
<i>TMEM127_Ex1_R</i>	PCR + SQ	TCTGGTCCCTGGCTATCTC		

<i>TMEM127_Ex2_F</i>	PCR + SQ	CTGTGGTGGAGGGGAATCAA	60°C	395 bp
<i>TMEM127_Ex2_R</i>	PCR + SQ	GGGAAAGACTGGAGCTTGG		
<i>TMEM127_Ex3_F</i>	PCR + SQ	GGGTAGAGAGGCTGTGATTG	60°C	523 bp
<i>TMEM127_Ex3_R</i>	PCR + SQ	GGAAGGTTTGGAGAAGATGGT		

**Tabelle A11: Übersicht über die verwendeten *VHL*-Primer**

<i>VHL</i> -Gen				
Primer	Verwendung	Nukleotidsequenz 5'→3'	PCR-Annealing-Temperatur	Produktgröße
<i>VHL_E1_F2</i>	PCR + SQ	TAGCCTCGCCTCCGTTACAA	63°C	698bp
<i>VHL_E1_R2</i>	PCR + SQ	GCTTACGAGCAGCGTCACC		
<i>VHL_E2_F2</i>	PCR + SQ	CGTTAGCCAGGACGGTCTTG	63°C	383 bp
<i>VHL_E2_R2</i>	PCR + SQ	CAAAAAGATTGGATAACGTGCCT		
<i>VHL3F1</i>	PCR + SQ	TTCAAGGTGAAATTACTACAGAGGCA	63°C	724 bp
<i>VHL3R1</i>	PCR + SQ	TTAAACGATATGCTGCAATCCC		

## 7.2. Verwendete Primer für das Next Generation Sequencing

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer für das NGS sind in den nachfolgenden Tabellen A12-A22 aufgeführt. Das NGS-Primer-Panel „Phäochromozytom“ enthält Primer, mit denen die gesamten kodierenden Regionen der Gene *KIF1B*, *MAX*, *NF1*, *RET*, *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDH5*, *TMEM127* und *VHL* untersucht werden. Aus technischen Gründen (Herstellervorgaben in der Assaydesign-Software „Ion AmpliSeq Designer“) wurden beim Vorliegen mehrerer Transkriptvarianten (z.B. *MAX*-Gen und *KIF1B*-Gen) jeweils alle Varianten/ Exons beim Design berücksichtigt. Ebenfalls wurden bei Genen (z.B. *RET*-Gen), bei denen zur Beantwortung der vorliegenden klinischen Fragestellung eine partielle Analyse ausreichend ist, alle kodierenden Exons in das Assaydesign mit eingeschlossen.

Alle Primer sind jeweils mit der jeweiligen Amplikonbezeichnung des Herstellers angegeben sowie der genauen Nukleotidsequenz und der Produktgröße des Amplikons. Zur schnelleren Zuordnung des Primerpaares zu dem Exon eines Gens, wurden die Primer durchnummeriert und mit dem Index „F“ und „R“ als Kennzeichnung der Orientierung des Primers in Bezug auf die Transkriptionsrichtung versehen z.B. bei *KIF1B* 4.1 F, 4.1 R und 4.2 F, 4.2 R. Ebenfalls angegeben wurde die Einteilung der einzelnen Primerpaare der Gene von Life Technologies in Primerpool 1 oder Primerpool 2. Als zusätzliche Information wurde das „Exonpadding“ in den Tabellen dargestellt. Das Exonpadding entspricht der Anzahl der Basen zwischen dem jeweiligen Primer und dem Exonanfang oder Exonende. In dem Primer-Panel „Phäochromozytom“ wurde die Einstellung „10 bp“ für das Exonpadding gewählt.

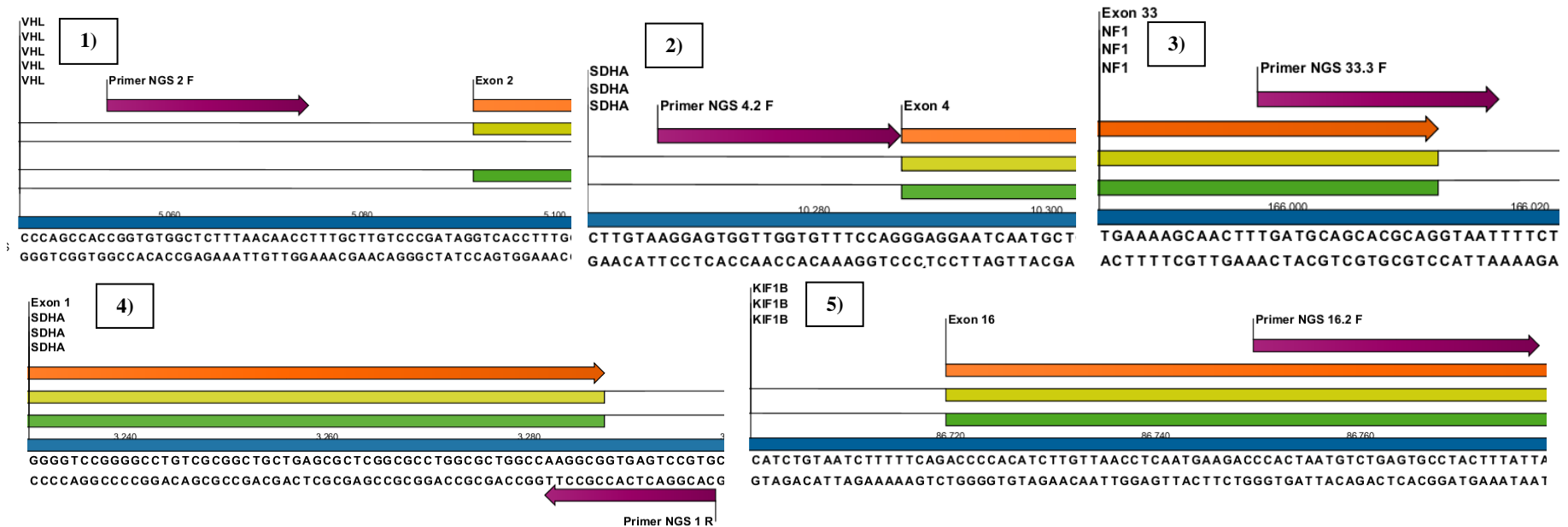


Abbildung A1: Darstellung des Exonpaddings an ausgewählten Beispielen: grüner Balken = mRNA; gelber Balken = kodierte Region; oranger Balken = Exon; lila Pfeil = NGS Primer.

- 1) „+X bp“ Anzahl der Basen, die zwischen dem forward oder reverse Primer und dem Exonbeginn oder Exonende liegen
- 2) „0 bp“ der forward oder der reverse Primer bindet direkt vor dem Exonanfang oder Exonende
- 3) Sonderfall: *NF1* 32.1 R und *NF1* 33.3 F. Die Exon 32 und 33 werden von jeweils drei Primerpaaren abgedeckt. Der Primer 32.1 R bindet auf dem Exonanfang von Exon 32 und der Primer 33.3 F bindet auf dem Exonende von Exon 33. In beiden Fällen wurde die Sequenz-Überlappung der Primer mit dem Exonanfang bzw. -ende ebenfalls mit „-X bp“ angegeben
- 4) „-X bp“ der Primer binden bereits teilweise auf der Nukleotidsequenz des Exonanfangs bzw. Exonendes
- 5) „innerhalb“ - der jeweilige Primer bindet innerhalb des Exons, dies ist der Fall wenn ein Exon von zwei Primerpaaren abgedeckt wird



**Tabelle A12: Primer für das *KIF1B*-Gen des Primer-Panels „Phäochromozytom“**

<i>KIF1B</i> -Gen	Primerpool	forward Primer Nukleotidsequenz 5' → 3'	reverse Primer Nukleotidsequenz 5' → 3'	Forward + Exonpadding		Reverse + Exonpadding		Produktgröße
AMPL5322056267	1	AATCAATTTGCAGTCCAGCACAAA	AGAGGAGCAGGAATACATGTGGATAT	33 F	+63 bp	33 R	+105 bp	275 bp
AMPL529654924	1	AGCTTTATACAAATGTATTATTATCAAGGCTCA	GTCCTCATTGATAACAGCATTGCATTTA	12.1 F	+106 bp	12.1 R	innerhalb	191 bp
AMPL5322078306	1	GCTTATAATGTGGAGCCTGCTGT	GGCAACAAAAGGGACTTCTCAA	7 F	+59 bp	7 R	+46 bp	263 bp
AMPL5322082560	1	CAAGAAAAGGACGTCTGGCTAATTC	TGAAGTGATGTGTACCACAGTCATAATT	5 F	+73 bp	5 R	+72 bp	263 bp
AMPL529789726	1	GCATAGATACTTGCTAGCCTCTGAGAAT	ACCTTTAAACGTTCAATAGCTTCCTCTC	13 F	+25 bp	13 R	-26 bp	189 bp
AMPL5322095474	1	CCTATTGTTACTGTAGAGGCAGCTT	GGAAGGTTGACATTTACCTTGGTCT	44 F	+42 bp	44 R	+36 bp	251 bp
AMPL5322215071	1	CCAAAAGGACGGGATTCTGA	CTGAGATTGTGACCACCTGGGA	21.1 F	-14 bp	21.1 R	innerhalb	229 bp
AMPL5324286643	1	GGTGACTGTTCTGATTCCAGACA	CCTGGCTTTCTTCTTGTACCCA	4.1 F	+81 bp	4.1 R	innerhalb	267 bp
AMPL5324321644	1	TGTTGAGCACATTCGACCTTT	GGGAAGTAATTCAGGAGGCAAAGG	24.1 F	+84 bp	24.1 R	innerhalb	172 bp
AMPL5324440766	1	GGAGACAATGGAGAACTTGCAAAAAGA	CAGGACTCCAAGAGTTTCTGTGTTT	21.5 F	innerhalb	21.5 R	innerhalb	247 bp
AMPL5469460474	1	TGCAGGAAGATGTTCTCAGTGAAT	CAGAATCAGCCTGCTTGTCTCT	27 F	+62 bp	27 R	+44 bp	272 bp
AMPL5469591147	1	AGTTGTTTTGCTTTGCAGGCTTT	GGGAGAGTAGGTCCTGAAAGACA	15 F	+75 bp	15 R	+72 bp	270 bp
AMPL5494034703	1	GTTCAAAAATAAGAAAAGAGCGGTGACAA	CACAAAGATAACTATCACCTCCTCAATCC	40 F	+126 bp	40 R	+12 bp	257 bp
AMPL5494239301	1	CACTCTCTGTTACGTGGTGTGA	CTTCTACCGTATTGTGCCAGCTA	47 F	+126 bp	47 R	-16 bp	275 bp
AMPL5495555197	1	CATTAAACAGTGGGAGCAACTCCT	TTTGAACCAGTGGAAACCGATCA	25.1 F	+103 bp	25.1 R	innerhalb	254 bp
AMPL1486548619	1	ACAGATGGAGGACTAAAGGTTGTTTTT	CTGAACAGACACAACCTCCCTT	9 F	+114 bp	9 R	+21 bp	250 bp
AMPL5521345951	1	CAAAGGAAAATGGCTGTAACCTCA	TCTATTCTGAACACAGCAAGACGA	2 F	+59 bp	2 R	+58 bp	272 bp
AMPL1487034172	1	GACCATCTTGTTGCTTTGTGG	CTTCTGCAAGCGCTGCAAT	22.1 F	+170 bp	22.1 R	innerhalb	225 bp
AMPL5521387825	1	GCAGGGATTATTCTACTACTGCAAAA	CAGCCTTAAACAGCAAAAATTAGAGT	18 F	+79 bp	18 R	+55 bp	273 bp
AMPL1487490736	1	CCTGGCCATTGTCAAGATGAAG	CTCCTCGTCTTTCATGTTATTTGCTTTT	21.3 F	innerhalb	21.3 R	innerhalb	247 bp
AMPL5521475144	1	TGTAGGATCCACATTGGGCTCT	GCCAGTGACTTGTACCTCTTCTATCA	31 F	+65 bp	31 R	+70 bp	275 bp
AMPL1488016315	1	GGACAGATAAACAGAAGTAAGGCAACT	AATGTCCCAAGCACAGTAAACT	29 F	+58 bp	29 R	+12 bp	250 bp
AMPL5521500895	1	ACCCTATTTTTCTGTTTGTGCTAGGA	ACAGTCATATGGGCTGCGTAAC	19.2 F	-2 bp	19.2 R	+10 bp	238 bp
AMPL1488076820	1	GAGAGACTTGGTGACAGCATCC	TGTGGGAAGAGCTTCAGCAAA	42.2 F	innerhalb	42.2 R	+17 bp	245 bp
AMPL1488804947	1	ACAAAAGCAGCTGAATGGAGAGA	GGCCAACTCAAATTCATGCTGT	23.1 F	+105 bp	23.1 R	innerhalb	160 bp
AMPL1489026784	1	GTTGATTCCCCAGTGGATTCTGT	CGAATGCCTCATCATCAAAATCCTC	26.1 F	+83 bp	26.1 R	innerhalb	249 bp
AMPL1490517384	1	CATGGCACGGTTTCGCTTTT	GCTCCTTGAATGAAGGTATCCTTTCTT	46.1 F	+159 bp	46.1 R	innerhalb	220 bp
AMPL3823614963	1	ACGTGACTTTAGCTTCTTTGGATGA	ACTGTTCAAGGCTGACTGTTG	38 F	+25 bp	38 R	+29 bp	216 bp
AMPL3826227202	1	CCATGCCATACAGGCCAGAAA	TCTCTGTAAGTCTGGTTCTATCCTTG	36 F	+63 bp	36 R	+19 bp	215 bp
AMPL3826839369	1	GTCTTAGGTATGCAGAGAAGGAGAAGA	CGAGAGTCTTGCATCTGAACAAC	41.2 F	-20 bp	41.2 R	+15 bp	192 bp
AMPL3935598202	1	TTAGGATCTGAGATTACAATATCAGATTTGACA	GGCTCAGAGCAGCAACCATT	11.1 F	+62 bp	11.1 R	innerhalb	134 bp
AMPL3936234144	1	CTCAAGGAATGAGAAGTCAAGATCACA	TGATGAATATGGCGCTTTGCCT	21.7 F	innerhalb	21.7 R	innerhalb	220 bp
AMPL3976682505	1	TTTTAAAAGTTCAGCCACCAAGT	TCATGAACCCAAATACAAGAAGATTCAA	34.2 F	-15 bp	34.2 R	+61 bp	207 bp
AMPL4151495850	1	CCACTAATGTCTGAGTGCCTACTTTATT	ACACATTATTTGAAAAGAGAGCATAGTT	16.2 F	innerhalb	16.2 R	+127 bp	205 bp
AMPL5322021807	2	CGTGTATAGACTAGTCACAGTACTC	AAGGACTAATGATTCTGTTGTACTGAAC	39 F	+39 bp	39 R	+36 bp	264 bp
AMPL5322068568	2	TGCCTTGATTGTAAGTACTGTTCTTGT	AGTCACTCTTCCTGTGGATTTGTTTT	45 F	+33 bp	45 R	+35 bp	272 bp
AMPL5322099090	2	ACTTGAGTTTATAATCCAGCAAGAGCTT	CAGCACCTGTATTTTTCAGTTTACA	28 F	+61 bp	28 R	+73 bp	275 bp
AMPL529655575	2	CTAGATATGCAGATCGTGCAAAAACAAAT	CTGAATAAGAACCCTGAAGAAGAAAGGA	12.2 F	-24 bp	12.2 R	+32 bp	207 bp
AMPL5322118582	2	GAGATGGAGAAAAGGTAATGCACAGT	AGCAATTTGGGTGAGTACTGCT	20 F	+84 bp	20 R	+70 bp	275 bp
AMPL529686147	2	ACTGGCAGCGATCCCTTCTA	GCAGTGGTTGTGAGTGGATAAGATTAT	25.2 F	innerhalb	25.2 R	+120 bp	200 bp
AMPL5322164051	2	CTGATTGGGATGTTTTGAACACACA	CTTGGATCTGCTCAGCTAAGAGAAA	3 F	+68 bp	3 R	+67 bp	262 bp

AMPL529696217	2	AGAGGTCATTGTTGTAGTGCTTCT	GAAAATGTTGTGCTGAAGCTCCA	17 F	+41 bp	17 R	+15 bp	214 bp
AMPL5322178766	2	AATACGTACTAAAGTCTGATTGAAGCA	TCTTCCTTCCAGCAATTGAGAACTA	32 F	+48 bp	32 R	+47 bp	269 bp
AMPL529843225	2	AGGTGGCAATTCGGACTG	ATGGCAATGTGGTCTATGTTGTTACT	11.2 F	-18 bp	11.2 R	+18 bp	125 bp
AMPL5322213971	2	AACCTCCCTCTTTGCATTATTTGAA	GAGATGTCACCTCGGTTAGCAG	30 F	+30 bp	30 R	+33 bp	275 bp
AMPL529957793	2	AGACTGATTTGCCTTTCTTGGGAAT	AGACACAGGACAATTAACCACAAAAGATA	10 F	+48 bp	10 R	+45 bp	223 bp
AMPL5322257826	2	TGCGGTGCCAAATAGGAAGAT	GAGAAGTAGTTAAGCCACAGGATTACA	48 F	+92 bp	48 R	+92 bp	275 bp
AMPL5322389317	2	CAAAGAAGGCGCTTGAGTAAAGAT	GCCATACATGGCACAAAGCTC	21.2 F	innerhalb	21.2 R	innerhalb	171 bp
AMPL5324240692	2	GGGCATGATTTGCTTCTTGCT	TAGAAGGGCAGACTCTTTGATTTTAATT	14 F	+65 bp	14 R	+81 bp	275 bp
AMPL5324387243	2	GCTGACTGACACACTGTACTCC	AGCAACAGTGTCTCAGAGAGA	24.2 F	innerhalb	24.2 R	+81 bp	262 bp
AMPL5324419615	2	CTTCCCTTTAAGAGCAACCCT	TGTGCTGCTTGCTAACTTGGA	21.6 F	innerhalb	21.6 R	innerhalb	236 bp
AMPL5493959450	2	GTGTTTTCTCTTTATTATGGAACCGCAA	CACGAAGTGACCAAAACAGGAAATAAAT	16.1 F	+133 bp	16.1 R	+4 bp	273 bp
AMPL5494216734	2	AGTTTATATTGGTGTCTCTGGGCTCT	GCTGGTTTTGCTCATCGTGTTTA	34.1 F	+134	34.1 R	innerhalb	199 bp
AMPL5521548538	2	CCACTGCTGATGTACAGACTTTCC	CTTCCACCATGATTTCAAGTTTGTCC	21.8 F	innerhalb	21.8 R	+10 bp	260 bp
AMPL1486356729	2	ATTTGTTTCATAGGTGAGCTACATGGAAA	TGCCAAAGACCTCAGTCATTACTCTAT	6 F	-16 bp	6 R	+12 bp	230 bp
AMPL1486462219	2	ACATGGCTTCTGTGACAACTCT	TGGTTTTTACCCATGATGATACGGTT	19.1 F	+171 bp	19.1 R	innerhalb	221 bp
AMPL1487226464	2	AGCTGGAAGATATTTGCAAGAAGTCA	ATCAGCTGGGAAACACGTCTCT	21.4 F	innerhalb	21.4 R	innerhalb	250 bp
AMPL1487467653	2	GCAGGGTTGTTGATGCAAGA	CGAGTCGCTCAGGGATTGG	42.1 F	+131 bp	42.1 R	innerhalb	228 bp
AMPL1487736296	2	GGGCTAAGCCTTGACAGATGAA	CACCCTCTGAAATAGAGATGAAAACAGA	35 F	+39 bp	35 R	+80 bp	235 bp
AMPL1488977753	2	CATCATTCTTTCTTTCAGTTCTTTGGAC	GGTTAATTC AAGGTGAGAACCAGAT	23.2 F	-10 bp	23.2 R	+57 bp	250 bp
AMPL1490687259	2	GTCGTTTTTACCTCAGTGGTCTCT	CACGTGGCAATAAGAAAACCAAGG	46.2 F	-13 bp	46.2 R	+15 bp	242 bp
AMPL3823430651	2	ACTGGTGCTGGAATACTTATAACAATGA	AGCAATTTAAGACTAACACTAATAATGAAGAGA	4.2 F	innerhalb	4.2 R	+27 bp	129 bp
AMPL3823451431	2	GGCTGTTGACATTTTATGTTGAGCTT	GCTGCTGTTGAGAAATCAGTTATCA	43 F	+23 bp	43 R	+35 bp	181 bp
AMPL3823561957	2	GCATTCTGCCTCTAAATATTTCTGCTT	CCTTTAATCGAGTCCCTTTGGCA	8 F	+48 bp	8 R	-22 bp	155 bp
AMPL3826827193	2	TTATTAATTCGTTTTGACCTAAACTTGGAAATG	CGCACATATGCCACTGACGTAT	41.1 F	+42 bp	41.1 R	innerhalb	127 bp
AMPL3826847121	2	TCAAATGTGTCCTGCTCTGT	CCTGCAAGTGTGGACTTCTTCA	37 F	+21 bp	37 R	+20 bp	190 bp
AMPL4075783649	2	GACTATGAGAGTAAATGTCAGGCCTT	ACTAAGAGGAATCCAGCTTTGATTATG	22.2 F	innerhalb	22.2 R	+71 bp	192 bp
AMPL4710539026	2	TGACGAGCAGCAAGATGAGATG	TCCCTTTTCGCCTTTCTCACAAATA	26.2 F	innerhalb	26.2 R	+10 bp	188 bp

Tabelle A13: Primer für das MAX-Gen des Primer-Panels „Phäochromozytom“

MAX-Gen	Amplikonbezeichnung	Primerpool	reverse Primer Nukleotidsequenz 5'→3'	forward Primer Nukleotidsequenz 5'→3'	Reverse + Exonpadding	Forward + Exonpadding	Produktgröße
AMPL5213941537		1	TCTCTAGGTACTTCTGCTTACTGGAAC	GGTTAATGCAGAGATTTGGTTTAGCA	8 R +86 bp	8 F +55 bp	275 bp
AMPL5213967343		1	AGGTTTTCTAACCAGGTGGTTAC	AAGTACCAGAGACTCCAGGTGTT	6 R +72 bp	6 F +109 bp	245 bp
AMPL529657368		1	GAAGAGCATCTGCCGCTTG	ACTGCCTGGATTGGGTTTTATTTTG	5a/b.1 R innerhalb	5a/b.1 F +30 bp	168 bp
AMPL1512232770		1	TCTGTGCACTTGGTAGCTTGAA	GGTAGTGTTTGAGAGTACCAGTTTCAT	4.1 R innerhalb	4.1 F +119 bp	247 bp
AMPL1513130109		1	CCACCTCACCTTAGTGGTTAACA	CCGCCGCATTTCTTTCTTA	2 R +112 bp	2 F +66 bp	249 bp
AMPL5213878385		2	TGAGACGATGGAGACAGACAGTT	CCAGAAGCAGTAACACACTCC	7 R +26 bp	7 F +16 bp	275 bp
AMPL754100265		2	CTTCTCAGGACGGCTCTAA	CACCAGCAAGATATTGACGACCT	5a/b.2 R 5a: +150 bp 5b: +40 bp	5a/b.2 F innerhalb	225 bp
AMPL3930331570		2	CGTCGCCCCGCTAAGAG	TCGGCTTGTGTTGTCGGT	1 R +59 bp	1 F +71 bp	202 bp
AMPL5129707956		2	CCACAGGACATTTTGTGATTAC	TGCAGAAATGCCACACCTTCAT	4.2 R +87 bp	4.2 F innerhalb	176 bp
AMPL5130127762		2	GGTGAGTGCTCTGTAAGCTC	GCGTGAATTCAGGCTGTA	3 R +56 bp	3 F +67 bp	272 bp

**Tabelle A14: Primer für das *NFI*-Gen des Primer-Panels „Phäochromozytom“**

<i>NFI</i> -Gen								
Amplikonbezeichnung	Primerpool	forward Primer Nukleotidsequenz 5'→ 3'	reverse Primer Nukleotidsequenz 5'→ 3'	Forward + Exonpadding		Reverse + Exonpadding	Produktgröße	
AMPL391512192	1	ACTTCATTGTGTTTTCTCCTAGGTCAG	ATTGGCTGCCAGTGTCTACTAAT	39.2 F	-5 bp	39.2 R	innerhalb	168 bp
AMPL391612830	1	CTGTTTGGTTCAGAAGACAATGTTGATGT	AGTTTGGTGTCTAGTTCAGCACAATTA	5.2 F	innerhalb	5.2 R	+75 bp	196 bp
AMPL391696095	1	CTGAAGAAGGAGATGGTGTGGAA	TCCTGTGCATGGGTATTATTTCTTTGCT	25.2 F	innerhalb	25.2 R	+64 bp	146 bp
AMPL5150352945	1	AGGACTGATTGATTCAGAGTTTTTATGC	AAACGCTGGCTAACCACCTAAA	32.1 F	+83 bp	32.1 R	-17 bp	128 bp
AMPL392274617	1	TTCATTGACCATCACATGCTAATAGTGT	GCTTCCCCATATTTTTGCTTGAATAGAT	40.1 F	+12 bp	40.1 R	innerhalb	225 bp
AMPL394765804	1	GAGGCCCTCAGGATAAATAGAAATTTTCAT	CACCTGTTGCACCTGGTTTTGA	41.1 F	+89 bp	41.1 R	innerhalb	175 bp
AMPL394799350	1	TGAACCTTTTGAATGACTGCAGTGA	CCTTTACATGCCAGTTCCTAGGTTT	26.2 F	innerhalb	26.2 R	+34 bp	225 bp
AMPL394921790	1	GGTTTCAAGCAAGGTAATCACTTTTCT	AGTTTGAGATAAGCATGCTTGTGCAAT	42.1 F	+147 bp	42.1 R	innerhalb	225 bp
AMPL394948498	1	TGCTGCCAGAAATCTGCCATT	TCATATTACTTCAGTAGTCCCATGTGGA	4.2 F	innerhalb	4.2 R	+13 bp	183 bp
AMPL395003539	1	CTGCCATTTGTGTGGGTAATGTG	CCTTAAAGTGTGTTGTTGTGAGG	10.1 F	+77 bp	10.1 R	-24 bp	224 bp
AMPL395013521	1	ACTTCAGAGTATTGCCAATCATGTCTC	AGCAACTGAGTAAGTGGCAAGAAA	33.2 F	innerhalb	33.2 R	+5 bp	125 bp
AMPL5241620926	1	CTTCTGGGCATTGATGGCAAT	AAGAGGTTTTCTTATCTCTTAAAATGTTTCTG	22 F	+26 bp	22 R	+23 bp	244 bp
AMPL5242705969	1	TGCAGGGCTGATTGTCTTCTT	GGAGAAGGTGCCTTGCTTCAT	29 F	+56 bp	29 R	+73 bp	275 bp
AMPL395368061	1	TGCTTGTCTACTTACCAGAATGCATTT	CTTTCAGCAAAAACCTCCACCAAG	8.1 F	+138 bp	8.1 R	innerhalb	211 bp
AMPL5242755428	1	TGGGTCAGGGAGTACACCAA	AGTCTAGTTAGTCAAGAAAAGCAATGAA	37.3 F	innerhalb	37.3 R	+29 bp	273 bp
AMPL395666264	1	TGAAGTGTCAAGTGCATAACCTCTTG	GTGCTTTGAGGCAGACTGAGTAA	18.2 F	innerhalb	18.2 R	+23 bp	126 bp
AMPL5294107312	1	ATGTTCTGAATTCATCCGAGATTC	AACACTGATACCCAAAATGAATGCAC	46 F	+62 bp	46 R	+22 bp	238 bp
AMPL535311255	1	AAATACCAGTCAAATGTCCATGGATCA	AAACAGAGCATAAAAATGATACAGAAAAAG	17.2 F	innerhalb	17.2 R	+16 bp	135 bp
AMPL535571659	1	GGAACAAGGAAAAAGTTTTGATCACTTGA	ACTTTCATGTACTCTCCACCTTATTTT	52.2 F	-27 bp	52.2 R	+31 bp	183 bp
AMPL948929446	1	GGAATAAGATGGTAGAATACCTGACAGACT	CACAGTAAAACCCACTAATACTTGAAGGT	24.2 F	-29 bp	24.2 R	+14 bp	128 bp
AMPL1072524866	1	AAGACGACCTTTTGATAAGATGGCA	TGGTGGCAAACCTCTCTTCTCA	35.2 F	innerhalb	35.2 R	+42 bp	193 bp
AMPL1073593789	1	AGTGTGAAGCCATTGTCCAGTC	ATGGTCTCATTTTAAAAGCAACAAACC	38.2 F	innerhalb	38.2 R	+35 bp	225 bp
AMPL1483573584	1	CTAGTCATCAAATGCTTAGTAGCACAGA	CCAGTCATTGTCTCTGCATACATATT	16.2 F	innerhalb	16.2 R	+130 bp	246 bp
AMPL1483588352	1	GAAAGTGCATGTTCTCAGATTTATC	AAGCACATAACTGAAAACCATAGGGTATT	32.3 F	innerhalb	32.3 R	+93 bp	238 bp
AMPL1483593086	1	AACTCCCTGTTGTAAGTCTATGGTA	GTCAATCAAGGCATCAAGAAACTTAACAA	57.1 F	+156 bp	57.1 R	innerhalb	242 bp
AMPL1483617892	1	GCTATTTTAGCACGCTACATGCTG	AATGGAGAAAGGAACTGGTAAACACAA	42.3 F	innerhalb	42.3 R	+20 bp	240 bp
AMPL1483693798	1	CTCTTAGCCTTATTTCTCAGTGTCCAAA	ACATGGTATATCAGCAAATCACCATTGA	37.1 F	+155 bp	37.1 R	innerhalb	228 bp
AMPL1483742492	1	GTGGACAGAAGTCTCAAAGGT	CTGCCATGAGACACTCGT	45.1 F	+142 bp	45.1 R	innerhalb	250 bp
AMPL1484180252	1	CTGGCTCCTATGAGAGAGAGACTTT	GACCTGTTACCAATAACACAGTCCAT	43.4 F	innerhalb	43.4 R	+125 bp	228 bp
AMPL1484343622	1	AGTCTTTCACTTTTCAGATGTGTGTTGA	CCACATCTGTACTTTGGGACATAAGAT	3 F	+53 bp	3 R	+53 bp	245 bp
AMPL1484616882	1	CTCTCCAAAGGTTCTGAAGGA	CTTTGCTACACTGACATGGAAAATTTTGA	51.2 F	innerhalb	51.2 R	+90 bp	250 bp
AMPL1484808647	1	GGAGTTATATTTCTTCTTCCTTGCAGAGT	CACGCTCTGTGTATTCACCTCAAATT	49.1 F	+88 bp	49.1 R	innerhalb	235 bp
AMPL1844628503	1	TGTTCCTTTATTCTCTTACAGAAGAGACCA	GGCAATGACAGCAGCTGACT	43.2 F	-9 bp	43.2 R	innerhalb	125 bp
AMPL1846809268	1	ACTATAGAGATTAATAGGTTCACTTTTATCGGT	GGAGTGAATTTACCAGCACATAGTGAAA	11.1 F	+155 bp	11.1 R	innerhalb	246 bp
AMPL2022462556	1	GGTTTGAAGAGATGGTGGAACTG	CTAAACATCTTCTTCTGGCTCTGAAAT	27.2 F	innerhalb	27.2 R	+99 bp	225 bp
AMPL3053074986	1	TGTGCCAAGATCCAAATTTGTTAAATCC	TGTTAGCAAGTTCATCAACCATCCTT	55.2 F	innerhalb	55.2 R	+20 bp	148 bp
AMPL3677578236	1	TGGTCCATGCAATTCAAATAAAAACGAA	ACTCTTTTTCTGTACTTCATTGGACAT	23.2 F	innerhalb	23.2 R	+43 bp	170 bp
AMPL4132566173	1	TGACTTGAGTGATAGTTTCACATTCATT	CCATATCAGTCTGTGGGATCTGGTA	7.1 F	+111 bp	7.1 R	innerhalb	212 bp
AMPL4301030553	1	ACCATCAGAGAGCCTTGAGGA	TCAGCAGCTAGATCTTCTTTGATAAA	30.2 F	innerhalb	30.2 R	+57 bp	214 bp
AMPL4343599518	1	TTTTCCCTTGCAGAATCCAAGAAAACAG	ATTTCCCTTACCTCCATTGCTT	14.1 F	-15 bp	14.1 R	-11 bp	139 bp
AMPL4667792503	1	CTATTGAACACAAAATTAAGTGAGCCTTT	CCAACCAATGCAAAGTTAAAGTTAGAGT	48.1 F	+53 bp	48.1 R	innerhalb	195 bp

AMPL4843284089	1	GCTACATCTGGAATAGAAGAACTTCA	GGACTGAACAAGTAGGAAAATGACAGA	9.1 F	+34 bp	9.1 R	innerhalb	217 bp
AMPL5111714819	1	GTTTGAAAACCTGGCTGTAGCTGATT	GCTATATGTTTACTTTACTGACGACTCT	20 F	+53 bp	20 R	+74 bp	265 bp
AMPL5111743252	1	TGGGTGTATCTGGTGTGAAAATTCTAA	ATTTAAACGGAGAGTGTTCCTACTATCCC	34 F	+19 bp	34 R	+19 bp	240 bp
AMPL5111775408	1	TGAGTGTCTTCTCTTTGCTTTCTCT	CAAAACCATAAAACCTTTGGAAGTGT	15 F	+16 bp	15 R	+99 bp	249 bp
AMPL5111779029	1	GAGCCTGCACTCCACAGA	CGCTCCTACCTCCCCTCAC	1 F	+107 bp	1 R	+57 bp	261 bp
AMPL5111784437	1	CAATGAAATTCAGTCTGGAAGGAAA	CACTAGTGAAGAGCCCATGTTAAG	58 F	+34 bp	58 R	+29 bp	256 bp
AMPL5117073429	1	ACAGTCTTCTACTTCTCACCCAA	TTTGCAACCAGTGCACATTACTG	54 F	+62 bp	54 R	+61 bp	270 bp
AMPL5117086929	1	CCCATGTGAGTGGAGGAGGA	ATTAAGGACAACAGCCGATCCAT	21.2 F	innerhalb	21.2 R	innerhalb	253 bp
AMPL5117087252	1	ACAGAGCATACAACCTACGTAATTTTGT	GCAGCAGGAATAGGATAAAGACT	12 F	+35 bp	12 R	+53 bp	273 bp
AMPL5117116996	1	AGTTCATCCTGTTTTAAGTCACACTTGT	GCCTCCATTAGTTGAAAAATTGAACTT	50 F	+41 bp	50 R	+40 bp	273 bp
AMPL391687387	2	GGGAAGTGAAAGAACTTGAAAGATTCA	GAAATAACTGTGATTTGGCTTCCATCAA	25.1 F	+40 bp	25.1 R	innerhalb	180 bp
AMPL391721688	2	TTGGTTGTTTTAAAGATTCCAATGAAGTC	GAAGGAGGTTCCGCTGGTTT	30.1 F	+108 bp	30.1 R	innerhalb	183 bp
AMPL392016521	2	TGCTGTTTACAAATCAGCTGACAGTA	GACCCAGGTATGCAAGAAGTGT	35.1 F	+90 bp	35.1 R	innerhalb	181 bp
AMPL392022549	2	GGAGAATGCCATTCTTATGTCTGGTTA	CAATATTTCCCGCAACCCTTGAG	16.1 F	+55 bp	16.1 R	innerhalb	173 bp
AMPL392109795	2	CTGGTTAACAACACAGAAAATTGTGACA	ACCACTAAAAGGACTAGACTGTGAACT	49.2 F	innerhalb	49.2 R	+108 bp	201 bp
AMPL5242709617	2	CATTTTCCTTAGGTTCAAACTGGTCAA	TCAGCAGCCGCTCATGATAC	37.2 F	-16 bp	37.2 R	innerhalb	269 bp
AMPL394883314	2	GTCATGGAAGAAATGTTGGATAAAGCAT	GAGTCTGTGTCAGACAAATCTATGGA	21.1 F	+63 bp	21.1 R	innerhalb	180 bp
AMPL5284204863	2	ACCCAAGTTGCAAATATATGTCTTCCA	AGAGGCCAACTCCATGAATGTGTTAT	18.1 F	+14 bp	18.1 R	innerhalb	269 bp
AMPL395024305	2	TGATGCAGCAGCGGTAAT	GTCTTGACCTAGAGCAGGAAAAGAAA	33.3 F	-15 bp	33.3 R	+102 bp	144 bp
AMPL5284279769	2	ACTTGATGAGCTGTGTTATTGGTAA	CATTGATCATAAGTAATAGCTGTATTTCAAC	44 F	+91 bp	44 R	+42 bp	254 bp
AMPL396232968	2	GGAAAGAACTGCTCCAGGGAT	CCTTTTAGGAGCCTTTGTGCTGATA	52.1 F	+130 bp	52.1 R	innerhalb	205 bp
AMPL5284281159	2	GGCAAGTAAGTTATTTATGGTCGTTTTT	AAGCAAATTTCCCAAAAACACAGTAAC	2 F	+43 bp	2 R	+12 bp	253 bp
AMPL398066738	2	CCAACAACACCCTCTTATTGTCTCT	AAAGTCTTCACTGAAAAATTCTGAAATG	39.3 F	innerhalb	39.3 R	+64 bp	200 bp
AMPL5284282322	2	AGTTGCTTTGACACTCATTCTAAAAAC	TGTGTGTTCTTAAAGCAGGCATACT	56 F	+115 bp	56 R	+56 bp	270 bp
AMPL5293675669	2	TGTCATGATTCATCTTACTAGCCTCAAAC	AGCAACAAGAAAAGATGGAAGACTACTA	47 F	+16 bp	47 R	+41 bp	255 bp
AMPL429325176	2	TGAGGAATGTTGATTTTTAAAGTACTAGCA	GCCGCAATGTCTTCTTTTGTGAA	33.1 F	+104 bp	33.1 R	innerhalb	189 bp
AMPL431126202	2	CTGCCTTGTTTCTTGCTTTCGTA	AGGTCTTGAAACGAACATCAATACA	10.2 F	innerhalb	10.2 R	+110 bp	187 bp
AMPL535529962	2	GCCTGGCTCAGAATTCACCTT	TTTGAAAACCAAGAGTGCATTTCTT	11.2 F	innerhalb	11.2 R	+70 bp	167 bp
AMPL535611399	2	ATGGAAAGTTATTTTGTCTGAGTTGTA	TGATTACAGGATGTAACAACAGCA	6 F	+51 bp	6 R	+49 bp	220 bp
AMPL563881657	2	GCAGAATGTGCAGAAAAGCTATTTGA	CCTTGAGTAAAATAAACTGCTTCACATCT	8.2 F	-22 bp	8.2 R	+32 bp	223 bp
AMPL564210049	2	TCAAACCTTATACTCAATTCTCAACTCCTTG	CGGTGAGACAATGGCAGGATT	32.2 F	+7 bp	32.2 R	innerhalb	128 bp
AMPL1483286469	2	GCATAGAGATTGAGAGGAGAGGTTTTT	GCTCCAGGAGTACGTAGTAATTCTTCA	17.1 F	+95 bp	17.1 R	innerhalb	244 bp
AMPL1483583169	2	GCCAGAAGTTGTGTACGTTCTTTTCTA	CTCTCCTTGCCATCATTACTTCAACTAA	23.1 F	+123 bp	23.1 R	innerhalb	239 bp
AMPL1483735410	2	CCAACATAGCACACTTCATAATAAGCC	GTTTGCGCACTTTCATCTTCAACT	26.1 F	+146 bp	26.1 R	innerhalb	239 bp
AMPL1483879641	2	CATACTAGCAGACACAATAAAGCCTCA	CCAAACTTGCCATCTCTATATTTGCT	36 F	+26 bp	36 R	+48 bp	241 bp
AMPL1484241578	2	TCTTGTGCTTTGGGTGATTAGCAA	ACAACCTGAGAACCAATAAATTTGGGAGAA	45.2 F	innerhalb	45.2 R	+19 bp	126 bp
AMPL1484267286	2	AAGCAAGTACTTACATCAATTGGGAAGA	CTCAGTCCATTTAGCTGATGAACA	9.2 F	innerhalb	9.2 R	+145 bp	247 bp
AMPL1484590759	2	TCCTAGGGATACACCAAGAGTTTGT	TGGATAGTGGCTGCAAGGTA	51.1 F	+141 bp	51.1 R	innerhalb	236 bp
AMPL1484782913	2	ATCCTGAGTCTTATGTCTGATACCATGT	GGCGTTTCAGCTAAACCCAATT	13 F	+17 bp	13 R	+45 bp	247 bp
AMPL1485188481	2	TCAGTGCCAGTTGACCATGTT	GTCAGACTGAGTCTCAAACTTGCT	43.1 F	+195 bp	43.1 R	innerhalb	250 bp
AMPL1485224810	2	TGCTGTTTGGCATTAGCAAAGTC	ACTGTTTCCAAGGATGTCAAAGCA	43.3 F	innerhalb	43.3 R	innerhalb	127 bp
AMPL1497996214	2	AAAATAGTTGATCATACTTTGTAACAGAATCAC	GGTACAAGTTAAGGCACACAGAAGATTA	39.1 F	+79 bp	39.1 R	innerhalb	152 bp
AMPL3665231314	2	TAATGTGATTATTTCTATTTAGCAACCAAAGG	CTGCATGCTGGTTTCTTCA	4.1 F	-10 bp	4.1 R	innerhalb	129 bp
AMPL3667468900	2	TGCTTGATGTTGACTAGACAGTTTCA	AACCTCCTGATGATAAAACAGATATGCT	41.2 F	innerhalb	41.2 R	+31 bp	190 bp
AMPL3760621574	2	AATTTTGGTTTTACTTTTTAGGTTACAGGAA	TCAGGAGTCGTTTTAATTTGCACAATC	5.1 F	-10 bp	5.1 R	innerhalb	126 bp
AMPL3761608809	2	GGAAGTGGGTAGAAAATTATCCAGATGA	AGTATTTCTATTTGACACCAGTTGACA	7.2 F	innerhalb	7.2 R	+118 bp	215 bp

AMPL3764022069	2	ACAGGTTATTGGAAGGATGTGCAAAATA	AGGGAATTGTTGAAGGACAGCAT	42.2 F	-24 bp	42.2 R	innerhalb	138 bp
AMPL3915080493	2	GCACTGCAAGCAAATGGATCAT	AGTAATCACTTATTCAAATTACTTCTGGTTTCT	48.2 F	innerhalb	48.2 R	+42 bp	158 bp
AMPL4024534090	2	CCCTTAATTTTGGCACATTATCTGG	ACACTCTGCACAATCCATGGATT	55.1 F	+84 bp	55.1 R	innerhalb	204 bp
AMPL4295532624	2	CGTCATGTCACCTAGGTTATCTGG	TCATCTGCTGCTTGGTTTATGATGT	24.1 F	+98 bp	24.1 R	innerhalb	185 bp
AMPL4318408832	2	ACACATGCCAGAGATTGCTCAG	CCTGTTACTCACAGAAACCACACA	14.2 F	innerhalb	14.2 R	+71 bp	129 bp
AMPL4666946759	2	TCTTGACAAGCTGATAACAATGACCAT	CACAAAGGAGATACTAGATAAAATTTGAGCA	40.2 F	innerhalb	40.2 R	+10 bp	127 bp
AMPL5111720062	2	CACAAATCCAGACTATGCTGAGCTTA	TGGTGTCTTATATTGTTGCTCAAAGTCA	57.2 F	innerhalb	57.2 R	+22 bp	263 bp
AMPL5111777444	2	AAAATGGGATTGTTTGCCTAACCTG	CTTGACATACCTCAGCACACACATA	28 F	+18 bp	28 R	+23 bp	254 bp
AMPL5111784033	2	TCTCCACTTCACCCCGTCA	GCGGGTCCGGATATGAATGATA	38.1 F	+14 bp	38.1 R	innerhalb	255 bp
AMPL5111790394	2	GGTGAATTTTATGTACAAGCCAACATTGT	GAAGGTCAAATAGGCTGAAGTGAAGATA	31 F	+58 bp	31 R	+72 bp	251 bp
AMPL5111818276	2	GCAGATACACCTGTCAGCAAATT	AAGGCTTATTTCAAACAAGTCACTCTAT	21.3 F	innerhalb	21.3 R	+36 bp	256 bp
AMPL5117072863	2	GTTAGGTGAAGTGATTATCCAGGTGT	GGCCTCTAAAAGTAGACTGGAATAAAA	53 F	+31 bp	53 R	+38 bp	254 bp
AMPL5117073161	2	AAACCTAGAGAAGTGGCATGTAAGAG	TCCTCTGATCACCCATCATTGTG	27.1 F	+60 bp	27.1 R	innerhalb	249 bp
AMPL5117095885	2	GCTCTGCTCTTCTACTCTTTTGG	TTTACTTCAAAGCTATTCCTGATCACA	19 F	+76 bp	19 R	+71 bp	274 bp

**Tabelle A15: Primer für das *RET*-Gen des Primer-Panels „Phäochromozytom“**

<i>RET</i> -Gen	Amplikonbezeichnung	Primerpool	forward Primer Nukleotidsequenz 5' → 3'	reverse Primer Nukleotidsequenz 5' → 3'	Forward + Exonpadding		Reverse + Exonpadding		Produktgröße
	AMPL5140904573	1	TCCATCCTGACCTGGTATGGT	GGAGAACAGGGCTGTATGGAG	13 F	+56 bp	13 R	+51 bp	257 bp
	AMPL5141670879	1	CTGTCTGCACCTGAAGTTTGGTT	TCCATTCTCAGCATGTTTCTTCCC	20 F	+37 bp	20 R	+32 bp	275 bp
	AMPL5141671473	1	GGTGTGCCCGCGTATA	GCAGTAGCAGGCACGTGTGG	3.2 F	innerhalb	3.2 R	+26 bp	250 bp
	AMPL5189565383	1	GTGGGCTGTCTTCTGAGAC	GGGAACTCTGAGGGCTAAAACACTACT	18 F	+45 bp	18 R	+68 bp	258 bp
	AMPL5283703056	1	GAATCTCTACCCTCAGGCCAT	GTGGCCACCACCATGTAGT	7.1 F	+50 bp	7.1 R	innerhalb	271 bp
	AMPL5287263144	1	CAGCCTGGAGGTGAGCA	CGGAGACAGACACTGGGTAGA	4.2 F	innerhalb	4.2 R	+23 bp	255 bp
	AMPL407505164	1	CAGCATCTCTACGGCAGTA	TGTCAGCGGGCTGTGATAAGG	2.2 F	innerhalb	2.2 R	+58 bp	208 bp
	AMPL408740024	1	GCCTTCTGCATCCACTGTAC	GACCCTCACCAGGATCTTGAA	11.2 F	innerhalb	11.2 R	-12 bp	186 bp
	AMPL1512031964	1	ACGCTGCGTGTCTTCGAT	TGAAGAGCGAGCACCTCATTTC	5.2 F	innerhalb	5.2 R	+39 bp	242 bp
	AMPL1512430769	1	CTCAGATGACAGCCGGTTCTC	GACCACTTTTCAAATTCGCCCTTC	12.1 F	+112 bp	12.1 R	innerhalb	214 bp
	AMPL5120252648	1	GCTGAGTGCCCCGGAAC	GCCGGCAGAACTCACCTT	1 F	+141 bp	1 R	-3 bp	246 bp
	AMPL5129866139	1	TCTGGTACTGAAAAGCTCAGGGATA	CAATTCCTGGCCAAGCTG	16 F	+78 bp	16 R	+82 bp	275 bp
	AMPL5129907729	1	GCCCGCTCCTCCTCATC	GCTGGGTGCAGAGCCAT	14.2 F	innerhalb	14.2 R	+10 bp	242 bp
	AMPL5133732249	1	TCCCTGTCCTTGGGCACTA	CGTTTCCACCGTGCCAT	8 F	+56 bp	8 R	+39 bp	258 bp
	AMPL5140887789	1	ACACTGCCCTGGAAATATGGG	CCTTGTTGGGACCTCAGATGTG	10 F	+54 bp	10 R	+58 bp	275 bp
	AMPL5231692103	2	ACCCCTCTGCTGGTCACA	CCATGGTGCACCTGGGAT	15 F	+67 bp	15 R	+36 bp	262 bp
	AMPL5283697778	2	CCCGGAGGGCTCTGTGA	AGGGAATGCACACAGATGTCC	17 F	+42 bp	17 R	+45 bp	263 bp
	AMPL408717312	2	CAGAGCATACGCCCTGTGA	GGCTTGTGGGCAAACTTGTG	11.1 F	+55 bp	11.1 R	innerhalb	196 bp
	AMPL408744791	2	CCAAGTGTGCCGAATTC	GCTAAGCCTTGACGTGTACT	7.2 F	innerhalb	7.2 R	+79 bp	197 bp
	AMPL5293900520	2	AGAGCAGCTTGGTGGTCATT	CAATCTTCCCAGACAGGCA	6 F	+19 bp	6 R	+16 bp	275 bp
	AMPL436972713	2	AACACACATCTGGTCCACCTA	CTGATGCAGGTACCACGTCT	5.1 F	+99 bp	5.1 R	innerhalb	175 bp
	AMPL1512660691	2	GAACTTGGTTCTTGAAAAACTTAGGA	CCGCTCTAGAACAGCATTGG	12.2 F	innerhalb	12.2 R	+96 bp	235 bp
	AMPL1516865306	2	AGAACCAGGTCTCCGTGGAT	CTCTCACCTAGATGGGAACGG	11.3 F	innerhalb	11.3 R	+192 bp	248 bp
	AMPL1517049678	2	CCTTGAAGAAGCCTTATTCTCACCAT	CAGATCCAGTTGTTCTCATGCAG	2.1 F	+28 bp	2.1 R	innerhalb	241 bp
	AMPL3434059218	2	GGTTTACACCAGCCCTGGAG	AAAGGAGGTGTTGAAGAAGGAGAAG	3.1 F	+75 bp	3.1 R	innerhalb	220 bp
	AMPL3693017820	2	GGTCCCGCTGGTGATC	GCCACCAGCTCGTACTTCTC	4.1 F	+30 bp	4.1 R	innerhalb	144 bp

AMPL5121609646	2	GCAGAGACAAAGTGGTCAAGA	CCGTATTTGGCGTACTCCAC	14.1 F	+187 bp	14.1 R	innerhalb	246 bp
AMPL5129946180	2	GGATCTGCCTAGGAGGTGGT	CTGGCAACTCTGGCTGAAGT	9 F	+56 bp	9 R	+68 bp	275 bp
AMPL5133737120	2	GTATCTAGTTGTGGCACATGGCT	AGCATCACAGAGAGGAAGGATAGT	19 F	+29 bp	19 R	+50 bp	274 bp

**Tabelle A16: Primer für das *SDHA*-Gen des Primer-Panels „Phäochromozytom“**

<i>SDHA</i> -Gen	Amplikonbezeichnung	Primerpool	forward Primer Nukleotidsequenz 5' → 3'	reverse Primer Nukleotidsequenz 5' → 3'	Forward + Exonpadding		Reverse + Exonpadding		Produktgröße
	AMPL391915665	1	GTGGGAAAATCAGCAAGCTCTATG	CTTTATAGCTGTGGGCCAGGA	12.2 F	innerhalb	12.2 R	+110 bp	188 bp
	AMPL5213890190	1	GCGAATATCTTGACTCCTTTAAGGTGTT	CAGCACTACGTGTCTGTCT	5 F	+ 30 bp	5 R	+23 bp	266 bp
	AMPL394811103	1	TCTTCATGTTTGGCATAGTGGAAACA	GGTAGGAAACAGCTTGGTAACACAT	3.1 F	+31 bp	3.1 R	innerhalb	194 bp
	AMPL394844349	1	CGCATGCCAGGGAAGACTA	AACCCAGGGATCAAAGTTACCAG	13.2 F	innerhalb	13.2 R	+133 bp	179 bp
	AMPL5494576105	1	GCCTTGGATCTCTGATGGAGAA	CATGGTTATATCAAGGCTGTGTCTA	6.2 F	innerhalb	6.2 R	+102 bp	238 bp
	AMPL4179033444	1	CGCGATGTCCCCACTG	CACGGACTCACCGCCTT	1 F	+129 bp	1 R	-6 bp	220 bp
	AMPL4303690276	1	CCTCCCCACCGTGCATTA	GATCTAAAGAGACAACACTGCGAGGT	9.2 F	innerhalb	9.2 R	+56 bp	135 bp
	AMPL4471279966	1	ACTGAGAATCTTAAAGTTCACATGCCA	GCCTCGTTCAAAGTTTGTGCGAT	15.1 F	+98 bp	15.1 R	innerhalb	172 bp
	AMPL4471748092	1	CCATGACTCTGGAGATCCGAGAA	CAGCTAAGAGAGGTGGCTGTG	8.3 F	innerhalb	8.3 R	+106 bp	155 bp
	AMPL4885865500	1	ACTTCTACTGTATCTTAACTGTCTTGCT	TCCACGACATCCTCCGTAATG	8.1 F	+132 bp	8.1 R	innerhalb	205 bp
	AMPL5129493258	1	ACTGTGTGAGTAGTTGGCTTCT	CCCAGAGCAGCATTGATTCCTC	4.1 F	+ 88 bp	4.1 R	innerhalb	134 bp
	AMPL5129594592	1	GAGTGGCTGTGCTACATGTTTG	CAGTGCAGGGCCAGGTA	11 F	+73 bp	11 R	+42 bp	273 bp
	AMPL391864430	2	TGAAATGCAAAAACAACAGGTCTAAAAGT	CGTCTCAGGTGCTTTAGGTCTC	12.1 F	+65 bp	12.1 R	innerhalb	195 bp
	AMPL5216902989	2	CCAAGATGACGTATTCTCAGGTCTC	GGGAATGCCGCCCATGTTA	9.1 F	+48 bp	9.1 R	innerhalb	251 bp
	AMPL394818053	2	GCCTTCTGAGGCAGGTTTA	TGAGAGGGTGAGCTGAGTAAGG	3.2 F	innerhalb	3.2 R	+120 bp	219 bp
	AMPL5494465077	2	GGCTCTGACAGTGC ACTGA	CACAGTGCAGTGC ACCAC	6.1 F	+ 116 bp	6.1 R	innerhalb	228 bp
	AMPL5494465569	2	GGTCTGGCCCCACAGCTATA	GGTGAGAAGGCCACCTTG	13.1 F	+106 bp	13.1 R	-4 bp	272 bp
	AMPL5494738496	2	GTGATGGTGTCTGGCCTCA	CTCGAATCTGTCGGGAGTTGATTTAA	14 F	+1 bp	14 R	+103 bp	265 bp
	AMPL1497217636	2	CTGACTCTTCTTTCAAGTCACTCT	AGCCACTAGGTGCCAATCTC	15.2 F	-8 bp	15.2 R	+125 bp	250 bp
	AMPL1500212402	2	GGAAATTAATATCCCCACAGCAT	CAAACCTGGTATAGATCCTTACCCCTAA	2 F	+51 bp	2 R	+43 bp	233 bp
	AMPL4471733873	2	GGCATATATGGTGTCTGGTTGTCT	GGTAAATCACACGCACCTTCC	8.2 F	-22 bp	8.2 R	-5 bp	186 bp
	AMPL5129545666	2	AGGAGTGGTTGGTGTTCAG	CATCCGCCTCAATTGCTTACATTTTT	4.2 F	0 bp	4.2 R	+ 62 bp	253 bp
	AMPL5129580980	2	GGCATGGCACCTTGACAT	TCCTGCGCCTTCTCAAATAGTC	10 F	+26 bp	10 R	+23 bp	262 bp
	AMPL5200862817	2	CCATTCTGTGATCTCACCAGATAGGA	CAATGAGTAGGCATCACATGCTT	7 F	+50 bp	7 R	+50 bp	274 bp

**Tabelle A17: Primer für das *SDHB*-Gen des Primer-Panels „Phäochromozytom“**

<i>SDHB</i> -Gen	Amplikonbezeichnung	Primerpool	reverse Primer Nukleotidsequenz 5' → 3'	forward Primer Nukleotidsequenz 5' → 3'	Reverse + Exonpadding		Forward + Exonpadding		Produktgröße
	AMPL5213918059	1	GCTGTATTTCATGAAAAACCAAGATCTTT	GAACCAGCTGAGGAAGGAGTTT	8 R	+73 bp	8 F	+72 bp	273 bp
	AMPL5474355780	1	GCCTGAAAAACTAATAGCGTAACAC	GGCAGGACTGATCCGGATA	4 R	+57 bp	4 F	+35 bp	275 bp
	AMPL5474435191	1	AAGGATGTGAAAAGCATGTCCCTAA	TGTGCCAGCAAAATGGAATTATCTTG	2 R	+50 bp	2 F	+46 bp	275 bp
	AMPL5130007603	1	CTGGCTTACAGCAATCTATTGCTCT	ACTGACCCCAAAGTAAACATTTAATCA	6 R	+59 bp	6 F	+62 bp	275 bp
	AMPL5474441239	2	ACCTCTTTGTGAGCACATGCTA	CCAGAGCTTTGAGTTGAGCCA	7 R	+52 bp	7 F	+56 bp	274 bp
	AMPL5521458717	2	CCACTCTGGCAATCATCT	AATAAAGCTGAGGTGATGATGGAATC	5 R	+46 bp	5 F	+45 bp	255 bp

AMPL5129986543	2	GCAGCTGTTTTCCAGATGTCTCTA	GCTAATACATCCAGGTGTCTCCGA	3 R	+72 bp	3 F	+68 bp	274 bp
AMPL5130014426	2	TGCCCTATGCTTCTCAGTCT	CTAGTGGGTCTCAGTGGATGTA	1 R	+75 bp	1 F	+82 bp	273 bp

**Tabelle A18: Primer für das *SDHC*-Gen des Primer-Panels „Phäochromozytom“**

<i>SDHC</i> -Gen	Amplikonbezeichnung	Primerpool	forward Primer Nukleotidsequenz 5'→3'	reverse Primer Nukleotidsequenz 5'→3'	Forward + Exonpadding		Reverse + Exonpadding		Produktgröße
	AMPL395128706	1	TTTGCCAAGATAGACTCTCTACTATGGT	GGCCAATGAAACAGCCAAGTT	4 F	+45 bp	4 R	+44 bp	200 bp
	AMPL398245302	1	GGATAATAGGTTCCATACTGTGGGTTTT	GGGAATCTTCAGGCCTTTTCCTA	6.1 F	+159 bp	6.1 R	innerhalb	220 bp
	AMPL4036845238	1	AACGTTATGCAAAAATATTAACCAAGTTTACTT	AGACAGAGGACGGTTTGAACCTATAT	3.1 F	+34 bp	3.1 R	innerhalb	149 bp
	AMPL5129603974	1	GAGCCTTTTAAAGAGACTCTCGTCA	CTGCCCAGGCACAGGATA	1 F	+94 bp	1 R	+82 bp	239 bp
	AMPL5213868543	2	GCTTTGTCCACAGATGTGGGA	CAGGTACTCTACTGCTCCAAGGA	6.2 F	-8 bp	6.2 R	+128 bp	269 bp
	AMPL669924082	2	CAACTAGAAAATGGTATCAAGGACACT	TTTCTGATACAGAGCTGAGGGCTA	2 F	+122 bp	2 R	-24 bp	206 bp
	AMPL4036848482	2	GATGGAGCGTTCTGGAATAAGA	CTTCAGAAGTTTCACCCACTACCT	3.2 F	innerhalb	3.2 R	+32 bp	125 bp
	AMPL5213866139	2	TTGTAACCTATGAGCAGCTGTGACA	CCCCTCCCTCACAGAGAAAAT	5 F	+22 bp	5 R	+23 bp	257 bp

**Tabelle A19: Primer für das *SDHD*-Gen des Primer-Panels „Phäochromozytom“**

<i>SDHD</i> -Gen	Amplikonbezeichnung	Primerpool	forward Primer Nukleotidsequenz 5'→3'	reverse Primer Nukleotidsequenz 5'→3'	Forward + Exonpadding		Reverse + Exonpadding		Produktgröße
	AMPL5213895135	1	CCAGCATTTCTCTTCCCTGTT	TTTCTTCTCCTCAAGAGATCTCCCA	1 F	+78 bp	1 R	+81 bp	258 bp
	AMPL5474446273	1	GCATATGTTGAACATGAAAGATGTGTGT	CATAAGACAAGCTCACAGCAAACAA	3 F	+39 bp	3 R	+38 bp	275 bp
	AMPL5129529341	1	GCAAAGCTGTTGCCATGCT	GCAACCCCATTAACCTACCAGAATAT	4.2 F	innerhalb	4.2 R	+205 bp	263 bp
	AMPL5213881099	2	ACCTATGGTCATTTAGAAAGTTTGTGACG	CCTGTAAAGGCATGACCATTA	2 F	+50 bp	2 R	+54 bp	271 bp
	AMPL5129503375	2	TTGCAGCCAAGTTATCTGTATAGTCTTC	AGTCAAAAAGGTCAGAGCTTCCAC	4.1 F	+51 bp	4.1 R	-13 bp	256 bp

**Tabelle A20: Primer für das *SDH5*-Gen des Primer-Panels „Phäochromozytom“**

<i>SDH5</i> -Gen	Amplikonbezeichnung	Primerpool	forward Primer Nukleotidsequenz 5'→3'	reverse Primer Nukleotidsequenz 5'→3'	Forward + Exonpadding		Reverse + Exonpadding		Produktgröße
	AMPL5213937776	1	GTAGGAGTCTTGGTGTCACTTCTC	GGATACAATTCTAGACTCAAATCAGCCT	3 F	+56 bp	3 R	+44 bp	262 bp
	AMPL1499808965	1	CGCACCTTCCGGCTCAG	CGTATCGGGCAGACGAA	1 F	+89 bp	1 R	+88 bp	248 bp
	AMPL4886055477	1	TGTCAGTGTGACATTCAGAC	GGCGGCTCTTTGGTTTCTA	2.2 F	innerhalb	2.2 R	innerhalb	135 bp
	AMPL5521345794	2	GATTCTCATACTGAGCATTGACTGA	AGGCTAACGTCATCATAAGTAGTGA	4 F	+38 bp	4 R	+43 bp	264 bp
	AMPL4766598712	2	GTCGTCAATTATTGTAAGATGTTTGTGGTT	GGGCTGTACCTCTGTAGAAG	2.1 F	+12 bp	2.1 R	innerhalb	125 bp
	AMPL4886066627	2	GCAGGAGAGAACTGATGAATCCA	AGAAGTGACACCAAGACTCCTACT	2.3 F	innerhalb	2.3 R	+74 bp	194 bp

**Tabelle A21: Primer für das *TMEM127*-Gen des Primer-Panels „Phäochromozytom“**

<i>TMEM127</i> -Gen	Primerpool	reverse Primer Nukleotidsequenz 5'→ 3'	forward Primer Nukleotidsequenz 5'→ 3'	Reverse + Exonpadding		Forward + Exonpadding		Produktgröße
AMPL5322215269	1	CGAGAGGAGCTGCAGAGTTG	GTCTATGTCACCTTCGCCGTTAG	3.2 R	+38 bp	3.2 F	innerhalb	271 bp
AMPL5322234642	1	ACCCTGTAGCAGTTCCTCTCC	GACTTCCTGCACCAAGTGTTACT	2 R	+25 bp	2 F	+33 bp	267 bp
AMPL5129734697	1	CGAACAGGTGCCTCCGT	TCCTCCACCGACTGTCA	1.1 R	innerhalb	1.1 F	+71 bp	275 bp
AMPL5322376533	2	CTCCTGCCACCAGGTAGAAG	CTAGCTGTGGAGTGCTACTAATT	3.1 R	innerhalb	3.1 F	+30 bp	192 bp
AMPL5494892000	2	CCACCTGGTGGGCATGAA	CCGCCTGGTTGCACATC	1.2 R	+122 bp	1.2 F	innerhalb	233 bp

**Tabelle A22: Primer für das *VHL*-Gen des Primer-Panels „Phäochromozytom“**

<i>VHL</i> -Gen	Primerpool	forward Primer Nukleotidsequenz 5'→ 3'	reverse Primer Nukleotidsequenz 5'→ 3'	Forward + Exonpadding		Reverse + Exonpadding		Produktgröße
AMPL5213875748	1	AGACCCTAGTCTGCCACTGA	ACCATCAAAAAGCTGAGATGAAACAGT	3 F	+23 bp	3 R	+20 bp	268 bp
AMPL1512083324	1	GTGCTGCCCGTATGGCT	GGGCTTCAGACCGTGCTATC	1.3 F	innerhalb	1.3 R	+37 bp	148 bp
AMPL1710843567	1	GCCTCCGGCCGGCTATT	CCCCGCCGTCTTCTTCA	1.1 F	+139 bp	1.1 R	innerhalb	247 bp
AMPL1809669404	2	AGGCAGGCGTCGAAGAGTA	GCTCGCCGTCGAAGTTG	1.2 F	innerhalb	1.2 R	innerhalb	234 bp
AMPL5141954337	2	CGGTGTGGCTCTTTAACAACC	GGGCTTAATTTTCAAGTGGTCTATCCT	2 F	+17 bp	2 R	+48 bp	237 bp



### 7.3. Kopienzahlen- und Volumina-Berechnung mittels qPCR

Tabelle A23: Berechnete Kopienzahlen je Library: Dargestellt ist der jeweilige Sequenzierungslauf, die jeweilige Patienten ID, die berechneten Kopien/  $\mu\text{L}$ . Z.T. wurden auf den Sequenzierungschips auch andere Phäochromozytom-Patientenproben aus der Routinediagnostik mitgemessen, die hier nicht aufgeführt sind  
\* mit einer anderen Methode bearbeitet, die im Zuge der Protokoll-Entwicklung eingestellt wurde

Sequenzierungs- lauf ID	Patienten ID	berechnete Kopien/ $\mu\text{L}$	Library-Volumen [ $\mu\text{L}$ ]	empirischer Korrekturfaktor
20140226	31173	Pool 1: 134306817 Pool 2: 129435417	2,12 2,18	$280 \times 10^6$
20140313	2325	Pool 1: 152796725 Pool 2: 108837610	1,83 2,57	$280 \times 10^6$
20140429	30988	Pool 1: 231894480 Pool 2: 361064939	1,21 0,78	$280 \times 10^6$
20140429	2276	Pool 1: 201561746 Pool 2: 287045312	1,39 0,98	$280 \times 10^6$
20140429	19864	Pool 1: 177934354 Pool 2: 157828791	1,59 1,79	$280 \times 10^6$
20140429	37634	Pool 1: 161582935 Pool 2: 156564162	1,73 1,79	$280 \times 10^6$
20140429	13265	Pool 1: 328381330 Pool 2: 320816807	0,85 0,88	$280 \times 10^6$
20140429	2272*	Pool 1: - Pool 2: -	5 5	
20140429	2241*	Pool 1: - Pool 2: -	5 5	
20140430	19369*	Pool 1: - Pool 2: -	5 5	
20140430	29334*	Pool 1: - Pool 2: -	5 5	
20140430	29371*	Pool 1: - Pool 2: -	5 5	
20140430	30772*	Pool 1: - Pool 2: -	5 5	
20140430	31365*	Pool 1: - Pool 2: -	5 5	
20140430	32116*	Pool 1: - Pool 2: -	5 5	
20140430	33573*	Pool 1: - Pool 2: -	5 5	
20150128	34718*	Pool 1: - Pool 2: -	5 5	
20150128	18087*	Pool 1: - Pool 2: -	5 5	
20150128	31173*	Pool 1: - Pool 2: -	5 5	
20150128	4159*	Pool 1: - Pool 2: -	5 5	
20150128	2325*	Pool 1: - Pool 2: -	5 5	
20150128	2328*	Pool 1: - Pool 2: -	5 5	
20150128	37327*	Pool 1: - Pool 2: -	5 5	

20150128	18477*	Pool 1: - Pool 2: -	5 5	
20150128	29244*	Pool 1: - Pool 2: -	5 5	
20150128	40752*	Pool 1: - Pool 2: -	5 5	
20150129	40752*	Pool 1: - Pool 2: -	5 5	
20150129	37684*	Pool 1: - Pool 2: -	5 5	
20150129	2222*	Pool 1: - Pool 2: -	5 5	
20150129	2607*	Pool 1: - Pool 2: -	5 5	
20150129	2973*	Pool 1: - Pool 2: -	5 5	
20150520	18477	Pool 1: 2209652998 Pool 2: 2036845679	0,13 0,14	$280 \times 10^6$
20150520	2328	Pool 1: 2144936162 Pool 2: 2334497827	0,13 0,12	$280 \times 10^6$
20150520	29244	Pool 1: 1993950859 Pool 2: 2144914696	0,19 0,13	$280 \times 10^6$
20150520	37327	Pool 1: 2448412676 Pool 2: 2671750163	0,12 0,11	$280 \times 10^6$
20150521	18087	Pool 1: 1752859832 Pool 2: 2695478566	0,19 0,50	$280 \times 10^6$
20150521	31173	Pool 1: 2025512609 Pool 2: 1541343557	0,18 0,18	$280 \times 10^6$
20150521	4159	Pool 1: 1771030000 Pool 2: 2100581118	0,26 0,14	$280 \times 10^6$
20150521	34718	Pool 1: 1298728188 Pool 2: 795854299	0,22 0,36	$280 \times 10^6$
20150608	18087	Pool 1: 1518988533 Pool 2: 562920343	0,05 0,14	$80 \times 10^6$
20150608	31173	Pool 1: 1564595496 Pool 2: 1618207408	0,05 0,05	$80 \times 10^6$
20150608	4159	Pool 1: 1146079602 Pool 2: 2053967785	0,07 0,04	$80 \times 10^6$
20150608	40752	Pool 1: 2805339135 Pool 2: 2649314816	0,03 0,03	$80 \times 10^6$
20150608	37684	Pool 1: 2743590925 Pool 2: 2659699032	0,03 0,03	$80 \times 10^6$
20150608	34718	Pool 1: 1671331116 Pool 2: 2547721114	0,05 0,03	$80 \times 10^6$
20150608	2325	Pool 1: 2639686543 Pool 2: 1424019476	0,03 0,06	$80 \times 10^6$
20150608	2222	Pool 1: 2233647416 Pool 2: 2692697175	0,04 0,03	$80 \times 10^6$
20150630	2607	Pool 1: 766878734 Pool 2: 1904083217	0,10 0,04	$80 \times 10^6$
20150630	2973	Pool 1: 1672341776 Pool 2: 1970394226	0,05 0,04	$80 \times 10^6$

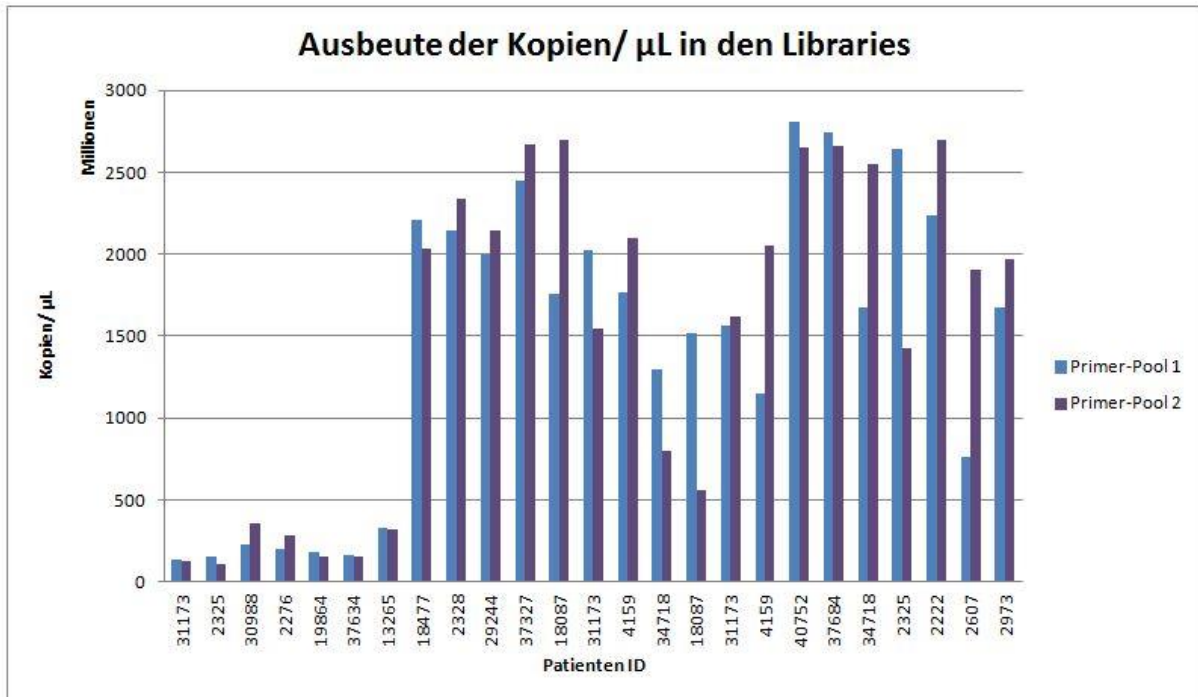


Abbildung A2: Graphische Darstellung der Ausbeute an DNA-Fragmenten (Kopien/  $\mu$ L), die sowohl den P1- und den A-Adapter gebunden haben, in allen Patientenproben

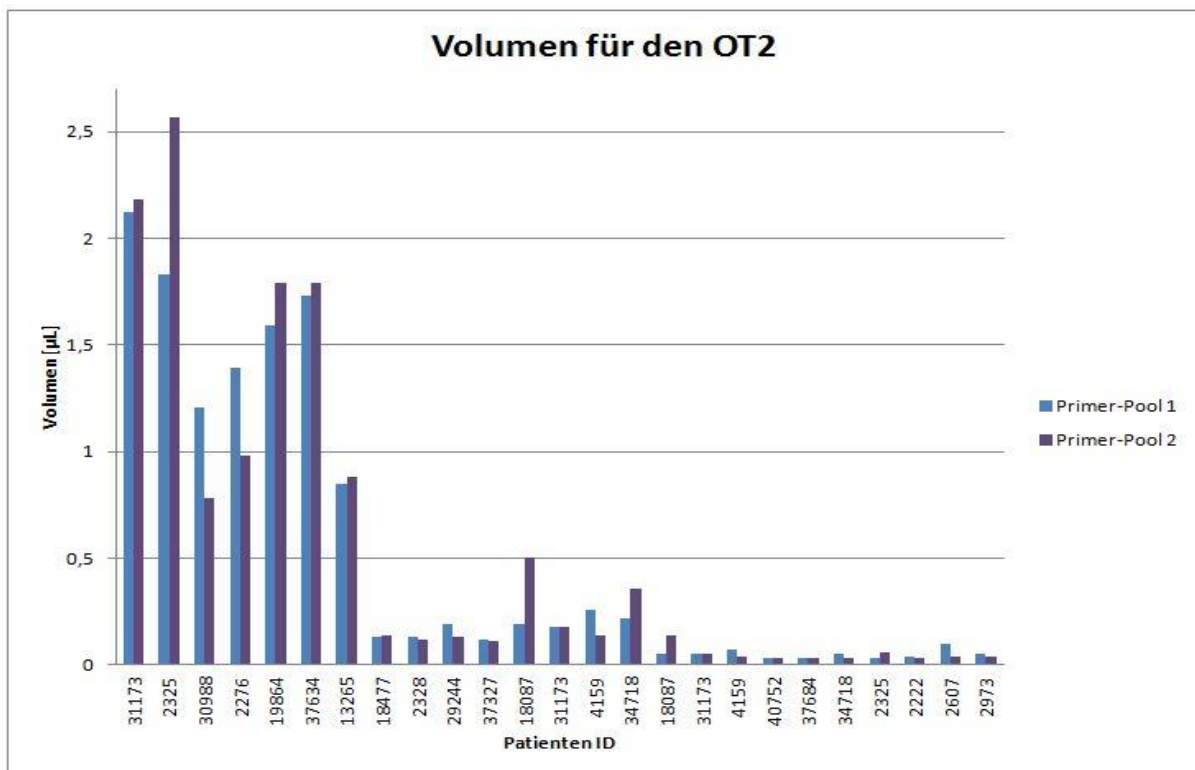


Abbildung A3: Graphische Darstellung der berechneten Library-Volumen-Mengen von allen Patientenproben für die Emulsions-PCR

## 7.4. Messergebnisse der unangereicherten ISPs nach den Emulsions-Polymerase Kettenreaktionen

Tabelle A24: Messergebnisse der unangereicherten ISPs nach den einzelnen Emulsions-PCRs mit dem OneTouch 2: Laufende Nummern der einzelnen Emulsions-PCRs mit den jeweiligen Messergebnissen für die unangereicherten ISPs; Sequenzierungslauf IDs und Bemerkungen zur weiteren Probenbehandlung

\*1 Test mit der Kontroll-Library: *E.coli DH10B Control 200 Library*

\*2 s. Abschnitt 4.1.3.2.2.

Laufende Nummer (Emulsions-PCR)	unangereicherte ISPs [%]	Sequenzierungslauf ID	Bemerkung
1	81,48	-	verworfen
2	67,95	20130830* <sup>1</sup>	sequenziert; allererster Lauf, keine qPCR
3	3,27	20130919_1* <sup>1</sup>	sequenziert, keine qPCR
4	9,39	20130919_2* <sup>1</sup>	sequenziert, keine qPCR
5	53,55	-	verworfen
6	8,32	20131002* <sup>1</sup>	sequenziert, keine qPCR
7	28,11	20131113* <sup>1</sup>	sequenziert; keine qPCR
8	1,41	-	verworfen
9	38,39	-	verworfen
10	22,99	20140226	sequenziert; erste Patientenprobe
11	27,44	20140313	sequenziert
12	14,75	20140429	sequenziert; qPCR nur bei einem Teil der Patientenproben
13	12,74	20140430	sequenziert; keine qPCR
14	6,67	20150128	sequenziert; keine qPCR
15	9,89	20150129	sequenziert; keine qPCR
16	3,86	-	verworfen
17	6,55	-	verworfen
18	3,34	-	verworfen
19	9,01	-	verworfen
20	8,21	-	verworfen
21	9,16	-	verworfen
22	12,86	20150521	sequenziert
23	43,11	-	verworfen
24	28,54	20150520	sequenziert
25	74,07	-	verworfen
26	7,75	-	verworfen
27	8,65	-	verworfen
28	39,18	-	verworfen; Anpassung des empirischen Korrekturfaktors zur Berechnung des Library-Volumens für die Emulsions-PCR* <sup>2</sup>
29	27,44	-	verworfen; Anpassung des empirischen Korrekturfaktors zur Berechnung des Library-Volumens für die Emulsions-PCR* <sup>2</sup>
30	21,47	-	verworfen; Anpassung des empirischen Korrekturfaktors zur Berechnung des Library-Volumens für die Emulsions-PCR* <sup>2</sup>
31	11,06	20150608_1	sequenziert
32	21,51	20150608_2	sequenziert
33	9,56	20150630	sequenziert

## 7.5. Nachgewiesene Varianten in den Intronbereichen

Tabelle A25: Alle mit der Sanger-Sequenzierung und dem NGS nachgewiesenen Varianten im Intronbereich der elf untersuchten Gene

Nr.	Variante	rsNummer	Gen
1	c.288+41G>A	rs2952976	NF1
2	c.1393-32T>C	-	
3	c.1528-29insT	-	
4	c.1641+39T>C	rs2905880	
5	c.1845+45G>T	rs116688303	
6	c.3315-130G>C	rs2072131	
7	c.3496+33C>A	rs2066736	
8	c.3974+46T>G	rs72813695	
9	c.5268+23T>C	rs9894648	
10	c.5609+19T>A	rs2285894	
11	c.6428-154dupA	-	
12	c.7189+37C>G	rs7405740	
13	c.7458-29G>A	rs964288	
14	c.8113+20G>A	rs55747230	
15	c.8114-30G>A	rs374645513	
16	c.-195G>A	rs779805	VHL
17	c.463+43A>G	rs34661876	SDHA
18	c.-115T>C	rs2303741	
19	c.-83insC	-	
20	c.151-78A>G	-	
21	c.151-57T>G	-	
22	c.312+56G>T	rs7705721	
23	c.313-54A>G	-	
24	c.457-57C>T	-	
25	c.621+60T>C	-	
26	c.622-79A>G	rs3764982	
27	c.771-11A>G	rs2288461	
28	c.895+28T>C	rs2288459	
29	c.896-119C>T	rs7702330	
30	c.896-75G>A	rs7725227	
31	c.896-20A>G	rs7710005	
32	c.1064+10A>G	-	
33	c.1064+79C>A	-	
34	c.1065-43G>A	rs193132294	
35	c.1664-34C>T	rs10041187	
36	c.1908+15C>T	rs35549341	
37	c.200+33G>A	rs2647169	SDHB
38	c.200+35G>A	rs61769190	
39	c.201-36G>T	rs1022580	
40	c.642+17T>C	rs200597595	
41	c.20+11_20+12dupTG	-	SDHC
42	c.20+82T>C	rs11265589	
43	c.21-96C>T	rs4255403	
44	c.241+69G>C	-	
45	c.*78G>A	rs182629842	
46	c.*123C>G	rs3813632	
47	c.170-29A>G	rs9919624	
48	c.315-32T>C	rs4151637	
49	c.*14A>C	-	
50	c.*98T>C	-	
51	c.*152delT	-	
52	c.*184C>T	-	SDH5
53	c.261-42G>A	rs879647	
54	c.1648+84G>A	-	RET
55	c.1648+88delC	-	
56	c.2136+182G>A	rs1864400	
57	c.2393-94C>T	rs111264957	
58	c.2608-24G>A	rs2472737	MAX
59	c.63+49C>T	rs2781373	
60	c.63+67G>A	rs117197166	
61	c.295+181G>A	-	
62	c.295+264G>T	-	
63	c.483+92G>A	-	KIF1B
64	c.-21670_c.-21669delCC	-	
65	c.-21631C>T	-	
66	c.429+26G>A	rs4846209	
67	c.430-31A>T	-	
68	c.430-61C>T	-	
69	c.720+17C>T	rs1339458	
70	c.1162+18C>T	rs41274456	
71	c.1163-106C>T	-	
72	c.1296+38G>A	-	
73	c.1639+10C>T	rs3753037	
74	c.1640-78C>A	rs2275424	
75	c.1724-107A>G	rs912961	
76	c.2399+57_c.2399+58insTGAAAT	rs200163420	
77	c.2786+89T>C	-	
78	c.2787-42C>G	rs2276100	
79	c.2992-52A>G	rs71643087	
80	c.3285-15A>T	rs200470260	
81	c.3375+27A>C	rs12143935	
82	c.3494+76A>G	-	
83	c.3550+15C>T	rs374936352	
84	c.3812-53A>T	-	
85	c.3918-50C>T	-	
86	c.3918-69G>A	-	
87	c.4167-22T>C	rs72867421	
88	c.4615-73G>A	-	
89	c.4687-41T>C	rs17411502	
90	c.4687-67C>T	-	
91	c.4808+9C>T	rs72867431	
92	c.5151+66T>C	-	

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Biosynthese der Katecholamine [2] .....	11
Abbildung 2: Aufbau des <i>SDH</i> -Enzymkomplexes bestehend aus den vier Untereinheiten <i>SDHA</i> , <i>SDHB</i> , <i>SDHC</i> und <i>SDHD</i> .....	15
Abbildung 3: Schematische Darstellung der sechs Transkriptionsvarianten (TKV) des <i>MAX</i> - Gens und die gewählte Exon-Nummerierung .....	32
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Isolierung von DNA aus EDTA-Blut [43] .....	35
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem Agencourt AMPure XP. Abweichend wurde als „Elutionspuffer“ Reinstwasser verwendet [45].....	42
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Prinzips der MLPA Methode [55].....	46
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Next Generation Sequencing Prozesses .....	52
Abbildung 8: Beladungsschema der Brücke mit 8 Kavitäten für das ES.....	61
Abbildung 9: Exemplarische Darstellung der Elektrophorese der PCR-Produkte des <i>SDHA</i> - Gens, die mit den initialen Primerpaaren erhalten wurden. ....	65
Abbildung 10: A-C: Sequenz des <i>SDHA</i> -Gens am Übergang von Intron 13 zu Exon 14 im Vergleich zu den Sequenzen seiner Pseudogene.....	66
Abbildung 11: Sequenzdarstellung des <i>VHL</i> -Gens mit der Variante c.193T>A (p.Ser65Thr) 67	
Abbildung 12: Exemplarische Darstellung der MLPA-Ergebnisse für eine unauffällige Probe (A) und eine Probe mit nachgewiesener heterozygoter Deletion im <i>SDHB</i> -Gen (B) .....	69
Abbildung 13: Graphische Darstellung des analysierbaren Bereichs der Gene <i>SDHA</i> , <i>SDHC</i> , <i>NF1</i> und <i>KIF1B</i> basierend auf dem <i>in silico</i> Primer-Panel „Phäochromozytom“ .....	72
Abbildung 14: Graphische Darstellung der Ausbeute an DNA-Fragmenten (Kopien/ $\mu$ L), die sowohl den P1- und den A-Adapter gebunden haben, in den Libraries von vier verschiedenen Patientenproben des Sequenzierungslaufs 20150608_2.....	74
Abbildung 15: Exemplarische Graphische Darstellung der berechneten Library-Volumina mit dem ermittelten empirischen Wert von $80 \times 10^6$ für die Emulsions-PCR. Die vier Patientenproben stammen aus dem Sequenzierungslauf 20150608_2.....	77
Abbildung 16: Runreport für einen Sequenzierungslauf während der Optimierungsmaßnahmen .....	79
Abbildung 17: Runreport für einen Sequenzierungslauf nach Beendigung der Optimierungsmaßnahmen .....	79
Abbildung 18: Darstellung der Variante c.292T>C (p.Tyr98His) im Exon 1 des <i>VHL</i> -Gens. 81	

Abbildung 19: A = Darstellung einer von der Software als Artefakt (gelb hinterlegt; nur in der forward Sequenz) gewerteten Basen-Veränderung im Intron 3 des <i>NFI</i> -Gens des Patienten 2973 und B = Darstellung einer als Variante (rot hinterlegt) gewerteten Basen-Veränderung im Intron 55 des <i>NFI</i> -Gens des Patienten 2973.....	82
Abbildung 20: Graphische Darstellung der Datenqualität in den einzelnen Genen für die Sequenz-Ergebnisse der 28 Patientenproben. ....	94
Abbildung 21: Darstellung der CNV-Analyse mit dem „SeqNext“ Modul von „SeqPilot“ ...	99
Abbildung 22: Auswirkungen des Exonpadding auf die Ergebnisse des <i>in silico</i> Primer Designs .....	103
Abbildung 23: Fehlende Reads für das dritte Amplikon im Exon 43 des <i>NFI</i> -Gens .....	111
Abbildung 24: Übersicht über zwei nur mit dem NGS im <i>SDHA</i> -Gen nachgewiesene Varianten c.1064+10A>G und c.1064+79C>A .....	114
Abbildung 25: Schematische Darstellung der drei verwendeten Methoden und den daraus resultierenden Ergebnissen.....	123
Abbildung 26: Darstellung der Arbeitszeitanalyse für die Sanger-Sequenzierung in nur eine Richtung vs. NGS in der Praxis bei 100% verfügbarer Laborgeräte .....	126
Abbildung 27: Darstellung der Kostenanalyse für die Sanger-Sequenzierung in nur eine Richtung vs. NGS in der Praxis bei 100% verfügbarer Laborgeräte .....	127
Abbildung 28: Darstellung der Arbeitszeitanalyse für die Sanger-Sequenzierung in beide Richtungen vs. NGS in der Praxis bei 100% verfügbarer Laborgeräte.....	128
Abbildung 29: Darstellung der Kostenanalyse für die Sanger-Sequenzierung in beide Richtungen vs. NGS in der Praxis bei 100% verfügbarer Laborgeräte.....	129
Abbildung 30: Darstellung einer beispielhaften Arbeitszeitanalyse in der Praxis bei 100% verfügbarer Laborgeräte .....	130
Abbildung 31: Darstellung einer beispielhaften Kostenanalyse in der Praxis bei 100% verfügbarer Laborgeräte .....	131

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Phäochromozytom und Paragangliom assoziierte Keimbahnmutationen des <i>NFI</i> -Gens [15] .....	14
Tabelle 2: Phäochromozytom und Paragangliom assoziierte Keimbahnmutationen des <i>VHL</i> -Gens [15] .....	14
Tabelle 3: Phäochromozytom und Paragangliom assoziierte Keimbahnmutationen der Gene <i>SDHA</i> , <i>SDHB</i> , <i>SDHC</i> , <i>SDHD</i> und <i>SDHAF2</i> [15] .....	16
Tabelle 4: Phäochromozytom und Paragangliom assoziierte Keimbahnmutationen des <i>RET</i> -Gens [15] .....	17
Tabelle 5: Phäochromozytom und Paragangliom assoziierte Keimbahnmutationen des <i>TMEM127</i> -Gens [15] .....	17
Tabelle 6: Phäochromozytom und Paragangliom assoziierte Keimbahnmutationen des <i>MAX</i> -Gens [15] .....	18
Tabelle 7: Phäochromozytom und Paragangliom assoziierte Keimbahnmutationen des <i>KIF1B</i> -Gens [15] .....	18
Tabelle 8: Charakteristika der hereditären PCCs oder PGLs in Abhängigkeit von den durch Mutationen betroffenen Genen [1, 2, 5] .....	19
Tabelle 9: Methodenvergleich der verschiedenen molekulargenetischen Methoden .....	24
Tabelle 10: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterial .....	26
Tabelle 11: Verwendete Chemikalien .....	29
Tabelle 12: Nähere Charakterisierung der elf untersuchten Gene .....	31
Tabelle 13: Mengen- Spannungs- und Laufzeitlängenangaben in Abhängigkeit von der Größe der Gelkammer für 2%ige Agarose-Gele .....	40
Tabelle 14: Charakteristika des Primer-Panels „Phäochromozytom“ .....	53
Tabelle 15: Vorbereitung und Volumen der Reagenzien für die Amplifikationslösung .....	58
Tabelle 16: Parameter für eine Sequenzierungsreaktion .....	62
Tabelle 17: Homologie der CDS des <i>SDHA</i> -Gens zu den vier Pseudogenen .....	67
Tabelle 18: Analysierbare Bereiche der <i>in silico</i> berechneten Primer-Panels bei verschiedenen Exonpaddings .....	71
Tabelle 19: Übersicht über die durch das Primer-Panel nicht analysierbaren Exonbereiche sowie die genaue Anzahl der nicht analysierbaren Basen .....	73
Tabelle 20: Messreihe zur Bestimmung des empirischen Werts zur Berechnung des jeweiligen Library-Volumen für die Emulsions-PCR und den ermittelten Anteilen der unangereicherten ISPs. Patientenprobe = 2325 mit Primer-Pool 1 und 2 .....	76



Tabelle 21: Werte der unangereicherten ISPs für die Proben nach der Emulsions-PCR, die nach der Sequenzierung ausgewertet wurden (28 Patienten).....	77
Tabelle 22: Analysedaten der einzelnen Sequenzierungsläufe .....	80
Tabelle 23: Nachgewiesene Varianten mit der Sanger-Sequenzierung .....	84
Tabelle 24: Nachgewiesene Varianten mit dem Next Generation Sequencing .....	85
Tabelle 25: Nachgewiesene Varianten mit dem Next Generation Sequencing im kodierten Bereich der Gene, einschließlich der jeweils 10 bp flankierenden Intronsequenz.....	96
Tabelle 26: Nachgewiesene Varianten mit der Sanger-Sequenzierung im kodierten Bereich der Gene, einschließlich der jeweils 10 bp flankierenden Intronsequenz .....	97
Tabelle 27: MLPA-Ergebnisse für alle 28 Patientenproben mit allen fünf verwendeten Sondenmixen.....	99
Tabelle 28: Analysedaten der Sequenzierungen .....	107
Tabelle 29: Übersicht über die nachgewiesenen Varianten in den untersuchten Genen mit den Methoden der Sanger-Sequenzierung und dem NGS .....	113
Tabelle 30: Bewertung der nachgewiesenen Nonsense-Varianten .....	117
Tabelle 31: Bewertung der nachgewiesenen Missense-Varianten.....	117
Tabelle 32: Bewertung der nachgewiesenen Silent-Varianten nach den Kriterien A-C.....	118
Tabelle 33: Übersicht über die krankheitsrelevanten Varianten in den einzelnen Patientenproben.....	121

## **Danksagung**

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei den Menschen bedanken, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Prof. Dr. Wolfgang Höppner gilt mein besonderer Dank für die Bereitstellung dieses spannenden Themas sowie die Betreuung und Unterstützung zu jeder Zeit.

Frau Jun. Prof. Dr. Esther Diekhof danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Bereitschaft, mich jederzeit mit formellen Fragen an sie wenden zu können.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Niels Storm, der für mich immer ein offenes Ohr hatte und mir mit vielen guten fachlichen Tipps und Ratschlägen zur Seite stand. Vielen Dank!!

Außerdem danke ich Prof. Dr. Andreas Gal und Dr. Ramona Salazar für die vielen konstruktiven Anregungen.

Meinen Arbeitskolleginnen Kerstin Bartels, Marieluse Klein-Gunnewig, Cordula Steglich und Julia Lahnert danke ich für das tolle Arbeitsklima und die aufmunternden Worte in schwierigeren Phasen bei der Erstellung meiner Dissertation.

Auch meinen weiteren Kolleginnen bei der Bioglobe GmbH, Heike Godo, Britta Höppner, Katrin Rittner und Kirsten Schiemann danke ich für die schöne Zeit.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meinen ehemaligen Kommilitoninnen Denise Palm, Christine Blum, Susann Burow und Xiaomeng Hu für unsere gegenseitigen Hilfestellungen und den moralischen Beistand.

Meinem weiteren Freundeskreis und besonders meiner Volleyballmannschaft danke ich für ihr Verständnis für meinen Mangel an Zeit und ihrer Geduld so lange auf mich verzichten zu müssen.

Zu guter Letzt sage ich meinen Eltern Angelika und Matthias Stubbe sowie meiner Schwester Jasmin an dieser Stelle einfach nur „Danke“!!!! Ihr wisst was das bedeutet!

**Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit bestätige ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig verfasst wurde und ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel – insbesondere keine im Quellenverzeichnis nicht benannten Internet-Quellen – benutzt habe und die Arbeit von mir vorher nicht einem anderen Prüfungsverfahren eingereicht wurde. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

Ich bin damit einverstanden, dass die Dissertation veröffentlicht wird.

Hamburg, Dezember 2016

.....

Annika Stubbe