

### **Limitationen der PCR und Sanger-Sequenzierung**

Mithilfe der Sanger-Sequenzierung kann man fast alle Nukleotid Substitutionen innerhalb eines PCR-Amplicons entdecken: man kann alle hetero- und homozygoten Deletionen innerhalb eines Amplicon sehen.

Homozygote Deletionen, die eine oder mehrere Primer-Bindungsstellen überlappen, werden als sog. PCR-Ausfall (PCR-failure) sichtbar.

Im Vergleich dazu können heterozygote Deletionen, die eine oder mehrere Primer-Bindungsstellen überlappen, nicht erkannt werden (siehe analytische Limitationen).

Alle heterozygoten Insertionen bis zu 100 bp Länge innerhalb eines Amplicons werden erkannt.

Größere heterozygote Insertionen können möglicherweise nicht erkannt werden.

Alle homozygoten Insertionen bis zu etwa 300 bp Länge innerhalb eines Amplicons werden erkannt, größere homozygote Insertionen können allerdings als homozygote Deletionen (PCR-failure) imponieren.

### **Analytische Limitationen**

- In Exons, bei denen unsere Sequenzierung keinerlei Variationen zwischen beiden autosomalen Allelen zeigt, können wir nicht sicher sein, ob die PCR beide Allele amplifiziert hat. Zufälligerweise kann ein Patient ein Allel tragen, das durch die PCR nicht amplifiziert wurde (z.B. aufgrund einer Deletion oder großen Insertion). In diesem Fall enthält unser molekulargenetischer Bericht keine Information über das zweite Allel.
- Unsere Sequenzierung kann keine Duplikationen, Triplikationen, etc. in den Gensequenzen entdecken.
- Nur die erwähnten Exons und 50 bp der flankierenden Sequenzen auf jeder Seite werden sequenziert. Daher enthält unser molekulargenetischer Bericht auch keine Informationen über andere Gen-Abschnitte und z.B. die regulierenden Sequenzen.
- Wenn wir zwei mögliche Krankheits-verursachende Mutationen bei einer rezessivern Erkrankung diagnostizieren, können wir nicht sicher sein, dass sich diese Mutationen auf unterschiedlichen Allelen befinden (compound heterozygot).
- Alle heterozygoten Insertionen innerhalb eines Amplicons bis zu 100 bp Länge werden erkannt, größere heterozygote Insertionen können möglicherweise nicht erkannt werden.
- Die Möglichkeit (unterrepräsentierte) Sequenzvarianten z.B. aufgrund von somatischen Mosaiken zu erkennen ist begrenzt. Sequenzvarianten die in weniger als 50% der kernhaltigen Zellen der Patienten vorkommen können möglicherweise nicht erkannt werden. Im Allgemeinen braucht man minimal 15% Anteil der Varianten Sequenzen.
- Mononukleotid-Läufe z.B. (A)<sub>n</sub> oder (T)<sub>n</sub> mit  $n > 8$  in der Referenzsequenz können aufgrund des sog. Strang „Rutschen“ (Slippage) während der PCR und der „Cycle“ Sequenzierung nicht analysiert werden.
- Wenn nicht anders beschrieben, beruhen die Sequenzier-Ergebnisse auf der genomischen DNA, die aus Blutzellen (EDTA-Blut) isoliert wurde. Der molekulargenetische Bericht enthält demnach keine Information über die Gensequenzen aus anderen Geweben.