

Limitationen der PCR und Sanger-Sequenzierung

Die Sanger-Sequenzierung erlaubt die Detektion nahezu aller Nukleotidsubstitutionen innerhalb eines PCR-Amplicons sowie die Identifikation von heterozygoten und homozygoten Deletionen und Insertionen - jedoch mit methodenbedingten Einschränkungen:

Technische Limitationen

- **Homozygote Deletionen**, die die Primer-Bindungsstellen betreffen, führen zu einem vollständigen Ausfall der Amplifikation (PCR-Failure) und sind somit indirekt detektierbar.
- **Heterozygote Deletionen**, die Primer-Bindungsstellen überlappen, bleiben in der Regel unerkannt, da das intakte Allel amplifiziert wird und das mutierte Allel nicht zur Sequenzierung beiträgt. Heterozygote Deletionen, die zu einer Amplifikation beider Allele führen, können Doppelsequenzen verursachen, die auswertungstechnisch schwer zu entschlüsseln sind.
- **Heterozygote Insertionen** bis ca. 300 bis 500 bp innerhalb eines Amplicons sind in der Regel detektierbar. Größere Insertionen können zu Amplifikationsproblemen führen und somit übersehen werden. Generell können heterozygote Insertionen zu Doppelsequenzen führen, die auswertungstechnisch schwer zu entschlüsseln sind.
- **Homozygote Insertionen** bis zu einer Größe von etwa 300 bis 500 bp sind detektierbar. Größere Insertionen können ebenfalls zu einem PCR-Amplifikationsausfall führen und fälschlich als homozygote Deletion interpretiert werden.

Analytische Limitationen

- In Fällen ohne nachweisbare Alleldifferenzierung (keine Variantendifferenzen zwischen den beiden Allelen) kann nicht ausgeschlossen werden, dass nur ein Allel amplifiziert wurde. Eine Deletion oder große Insertion im zweiten Allel kann zur Nicht-Amplifikation führen, wodurch dieses Allel in der Analyse nicht berücksichtigt wird.
- Die Methode ist nicht geeignet zur Detektion von **Duplikationen, Triplikationen oder komplexen strukturellen Varianten**.
- Es werden ausschließlich die definierten **Exons und jeweils ca. 10 bp der flankierenden intronischen Sequenzen** analysiert. Regulatorische Regionen, tiefer liegende Introns oder andere genomische Abschnitte bleiben unberücksichtigt.
- Bei **rezessiven Erkrankungen** kann nicht zweifelsfrei bestimmt werden, ob zwei detektierte pathogene Varianten auf unterschiedlichen Allelen liegen (compound Heterozygotie), sofern keine Familienuntersuchung erfolgt.
- Die Detektionsgrenze für **somatische Mosaik** liegt bei etwa 15 % Allelfrequenz. Varianten unterhalb dieser Schwelle können durch Hintergrundrauschen maskiert werden und bleiben möglicherweise unerkannt.
- **Mononukleotid-Wiederholungen** (z. B. (A)_n oder (T)_n mit $n > 8$) sind aufgrund von Polymerase-Slippage während der PCR und Sequenzierung fehleranfällig und können nicht zuverlässig analysiert werden.
- Sofern nicht anders angegeben, basiert die Sequenzierung auf **genomischer DNA aus EDTA-Blut**. Gewebespezifische Varianten, z. B. bei somatischen Mutationen, werden nicht erfasst.