

Die Erfassung und Charakterisierung zellulärer mRNA durch die RT-PCR

(Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction)

Praxisklinik Dr. Kübler, 2006

Dr. Jörn Schnepel

Überblick

- Einleitung : Was ist PCR / RT-PCR ?
Geschichte der PCR
- Grundlagen der Genetik
- Zielsetzung der Sicherheits-PCR
- Reverse Transkription
- Polymerase Kettenreaktion : Materialien
Ablauf
- Bedeutung der Ergebnisse

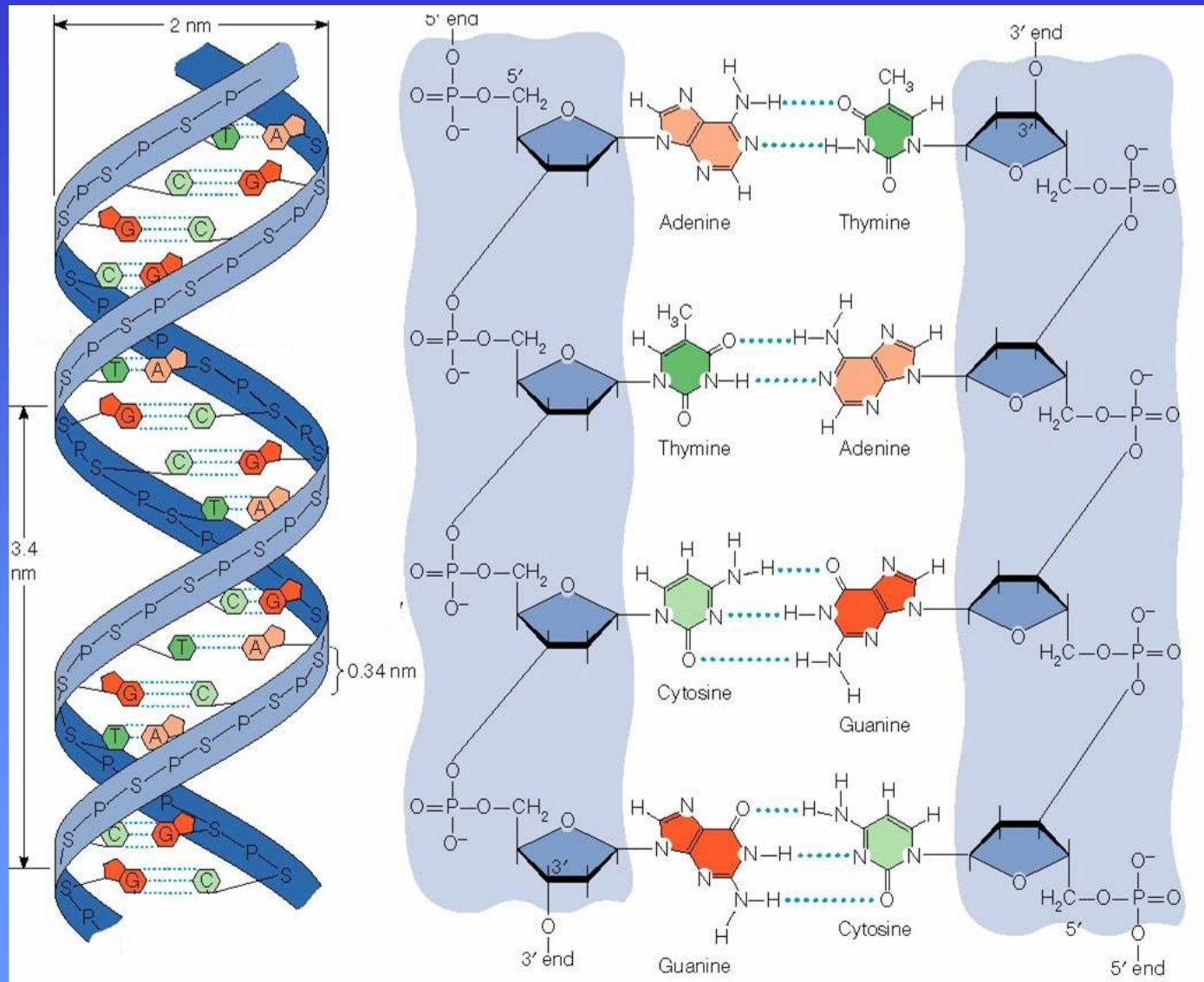
Einleitung

- PCR = Polymerase Chain Reaction
- RT = Reverse Transcription
- Vervielfältigung von DNA-Fragmenten
- sehr empfindliche und schnelle Methode
- 1 Tumorzelle in 1 Million Leukozyten
- Starke Anreicherung für Detektion und Folgetechniken
- Nachweis definierter Genabschnitte mittels Primer-Design
- Einstieg in die biopsiefreie Tumorzell-Diagnostik

Geschichte der PCR

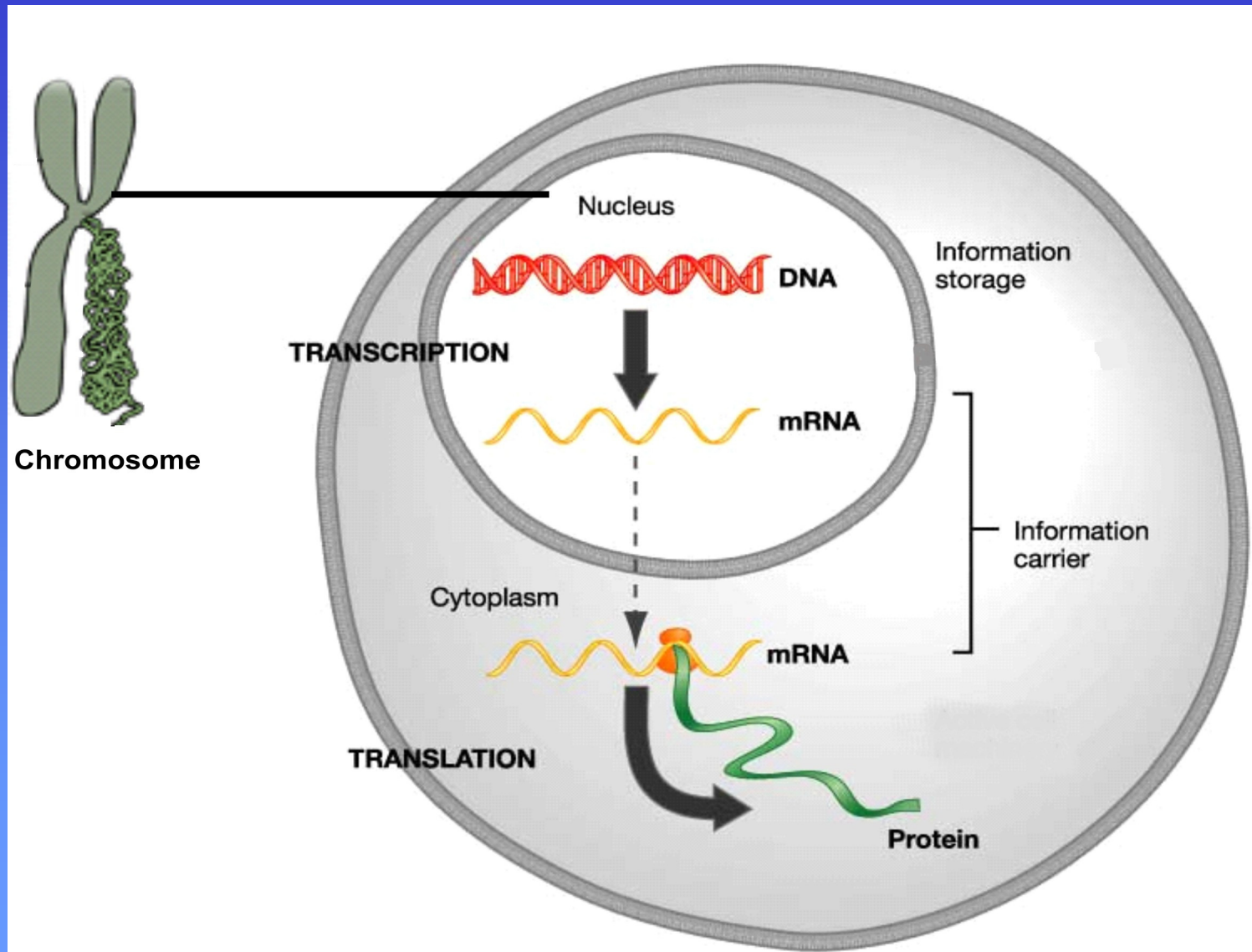
- Har Gobind Khorana (Kleppe et al. 1971)
- Chemiker Kary Mullis
- relativ junge Methode (1983)
- 1985 erste Diagnose einer Krankheit durch PCR (Sichelzellanämie)
- 1993 Nobelpreis für Kary Mullis
- 1990-2003 Humanes Genom Projekt
- SNP-Analytik (single nucleotide polymorphism)
- seit Verwendung der Taq-Polymerase (*Thermus aquaticus*) aus keinem biologischen Labor mehr wegzudenken

Grundlagen : DNA



DNA = Desoxyribonucleic acid

Grundlagen : Transkription und Translation



Zielsetzung : Sicherheits-PCR

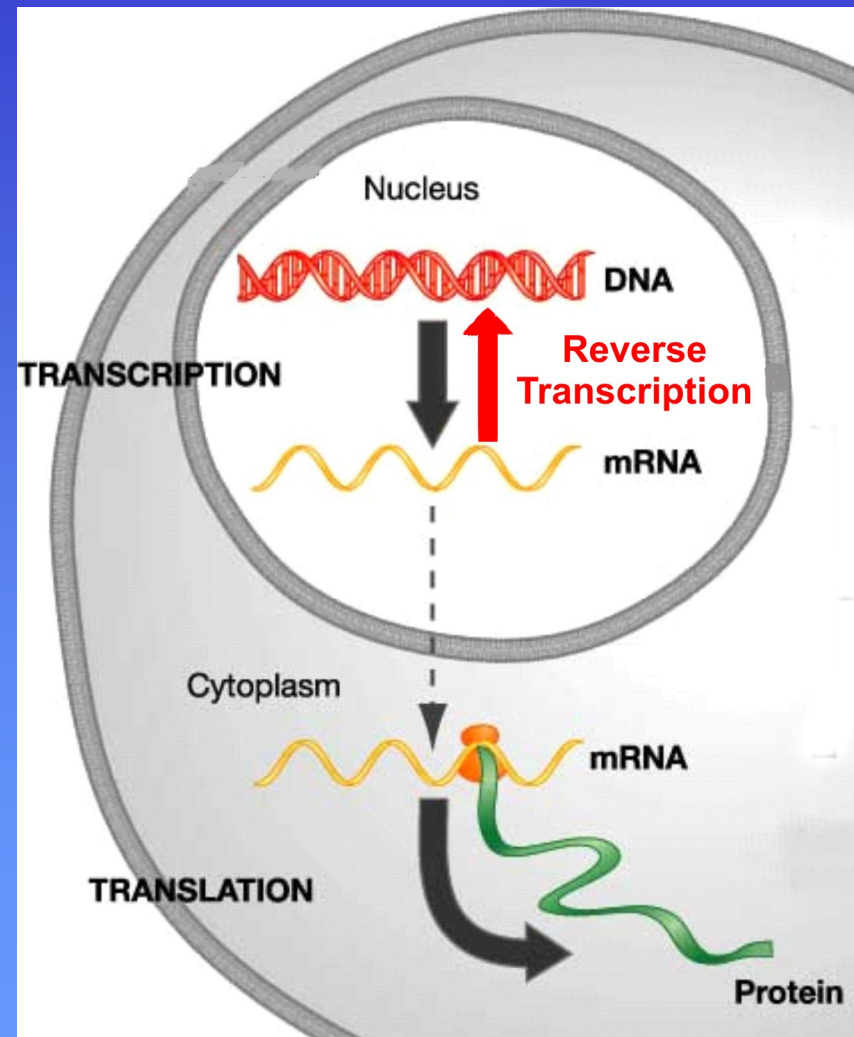
- biopsiefreier Nachweis von disseminierenden Tumorzellen aus Vollblut
- Vorverlegung des diagnostischen Zeitpunktes
- mittels Nachweis eines exprimierten Genes, welches für ein definiertes Onkogen codiert
- Nachweis von Zellen, nicht von Surrogatmarkern im Serum
- Ausschluß oder Nachweis folgender Onkogene :
 - Cytokeratin 19
 - Cytokeratin 20
 - Mucin-1
 - PSA
 - Tyrosinase

RT – Reverse Transkription

mRNA $\xrightarrow{55\text{ }^{\circ}\text{C}}$ DNA

Enzym :
Reverse Transkriptase

Ergebnis : Template-DNA für die PCR



PCR – Polymerase Chain Reaction

DNA  x-fach DNA

- Enzym : DNA-Polymerase
- Primer : Oligonukleotide
- dNTPs
- Template-DNA
- Thermocycler

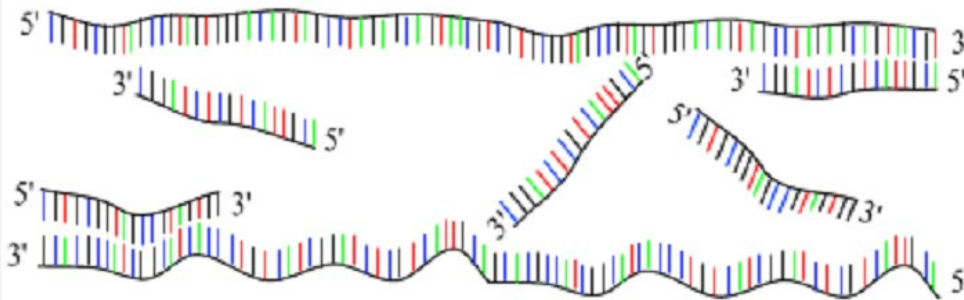
PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

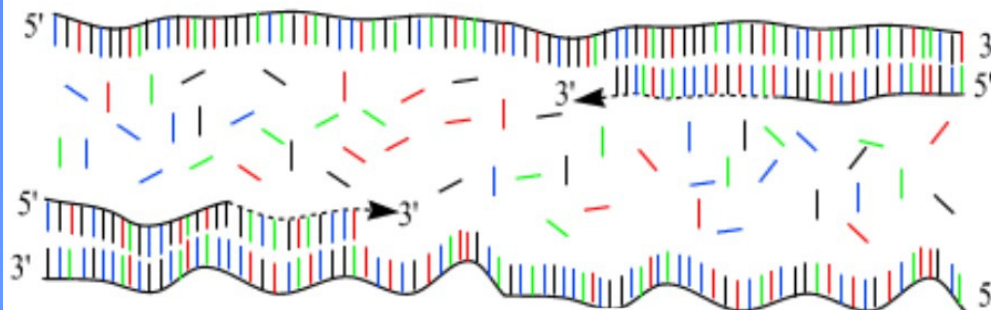
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!



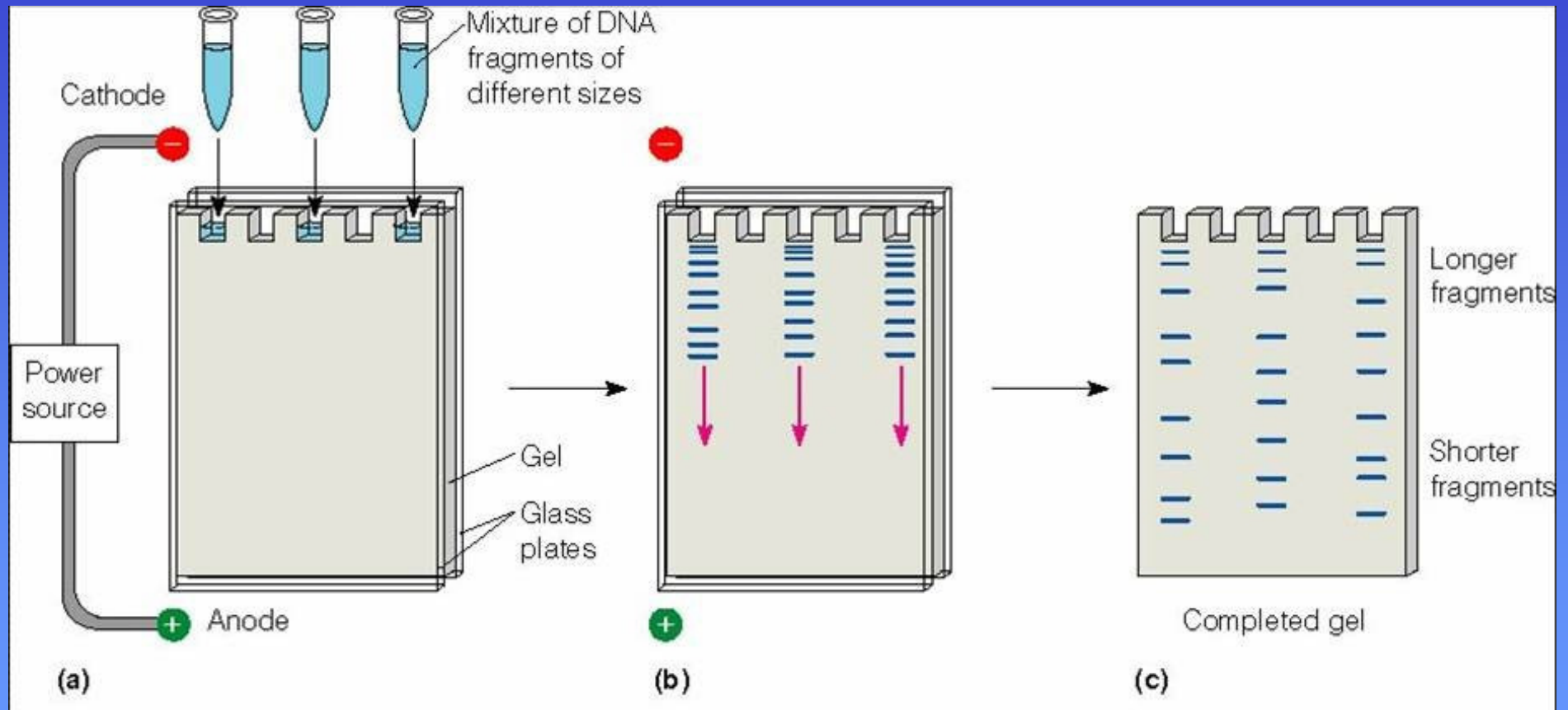
Step 3 : extension

2 minutes 72 °C

only dNTP's

Detektion der PCR-Produkte

durch Agarosegel-Elektrophorese



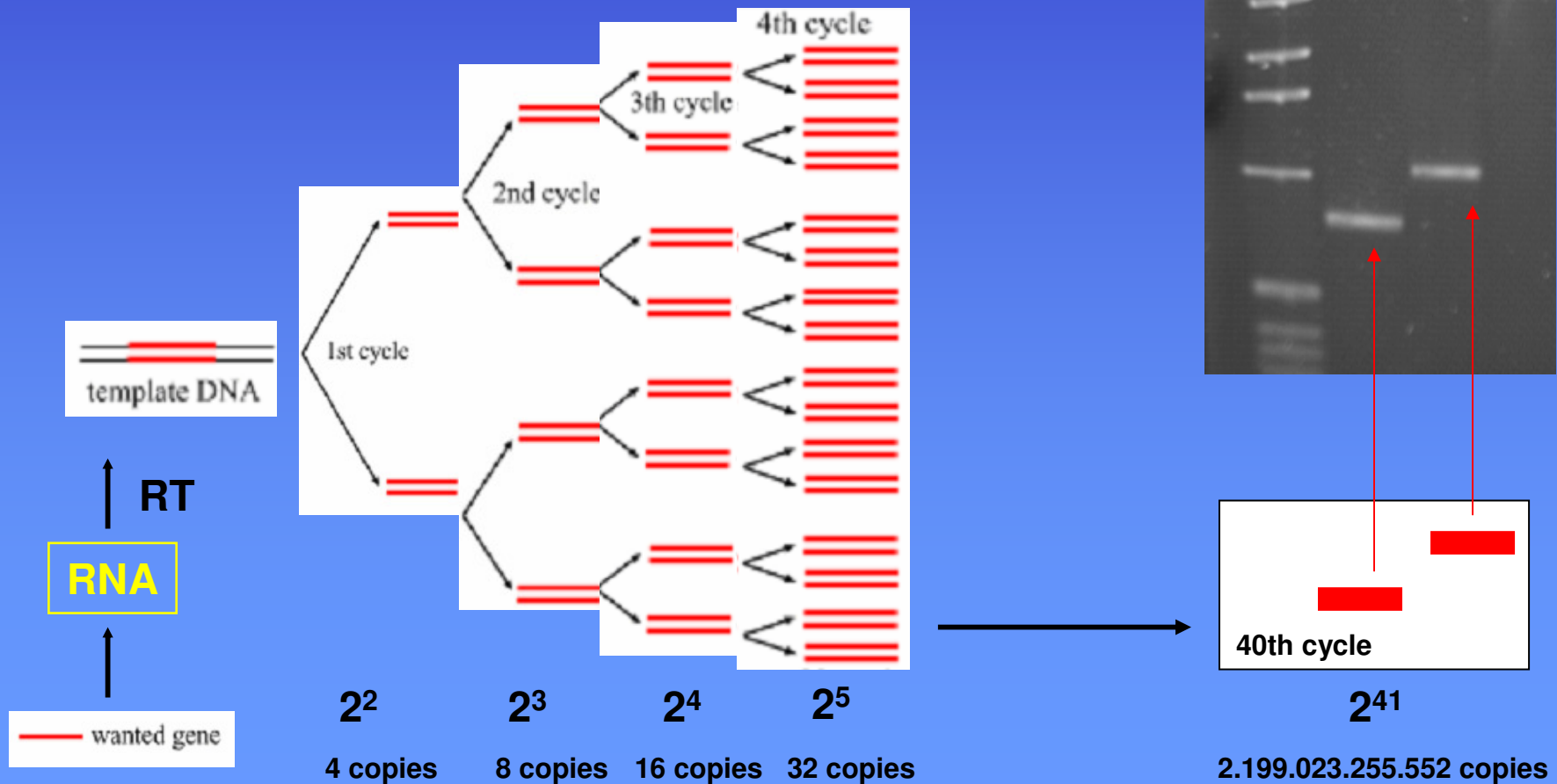
Sicherheits-PCR

DNA

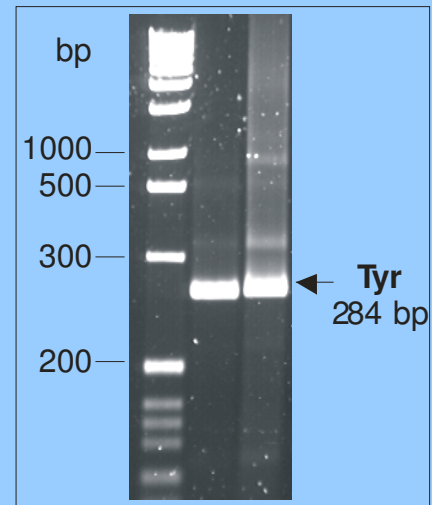
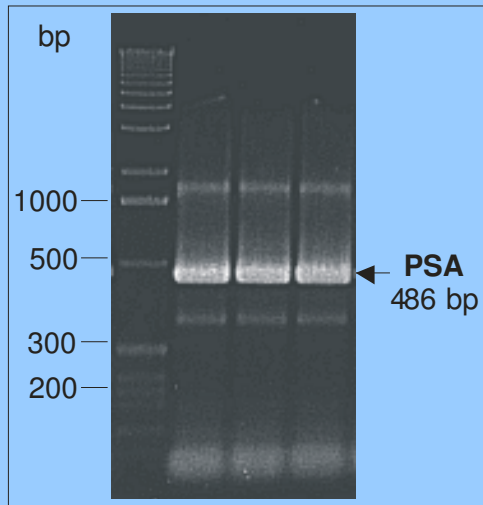
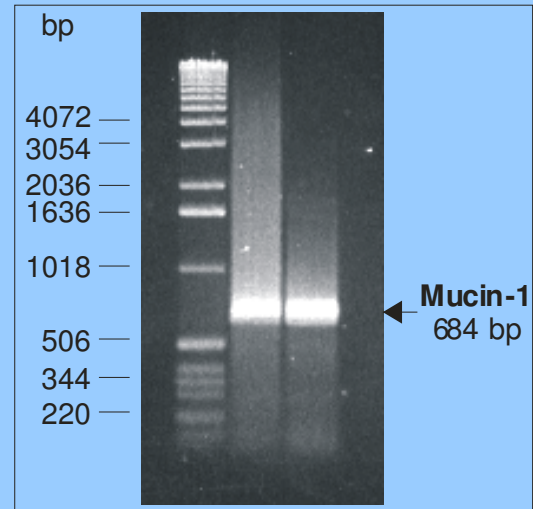
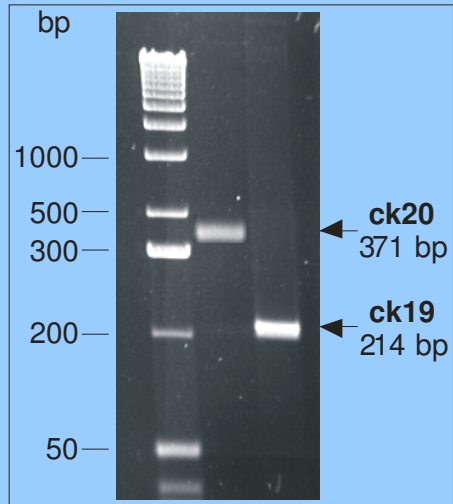


x-fach DNA

Enzym :
Polymerase



Ergebnisse der RT-PCR



Ausblick

Anwendungen :

Sequenzierung, Klonierung, genetischer Fingerabdruck,
Nachweis von Krankheitserregern, Vaterschaftstest, SNP-
Analytik etc.

Frühdiagnostik durch biopsiefreien Tumorzellnachweis

PCR ist der Einstieg in die biopsiefreie Onkologie.

Die diagnostische Apherese ist die Fortsetzung.

**PCR ---> Visualisierung von Molekülen
diagnostische Apherese ---> Visualisierung von Tumorzellen**