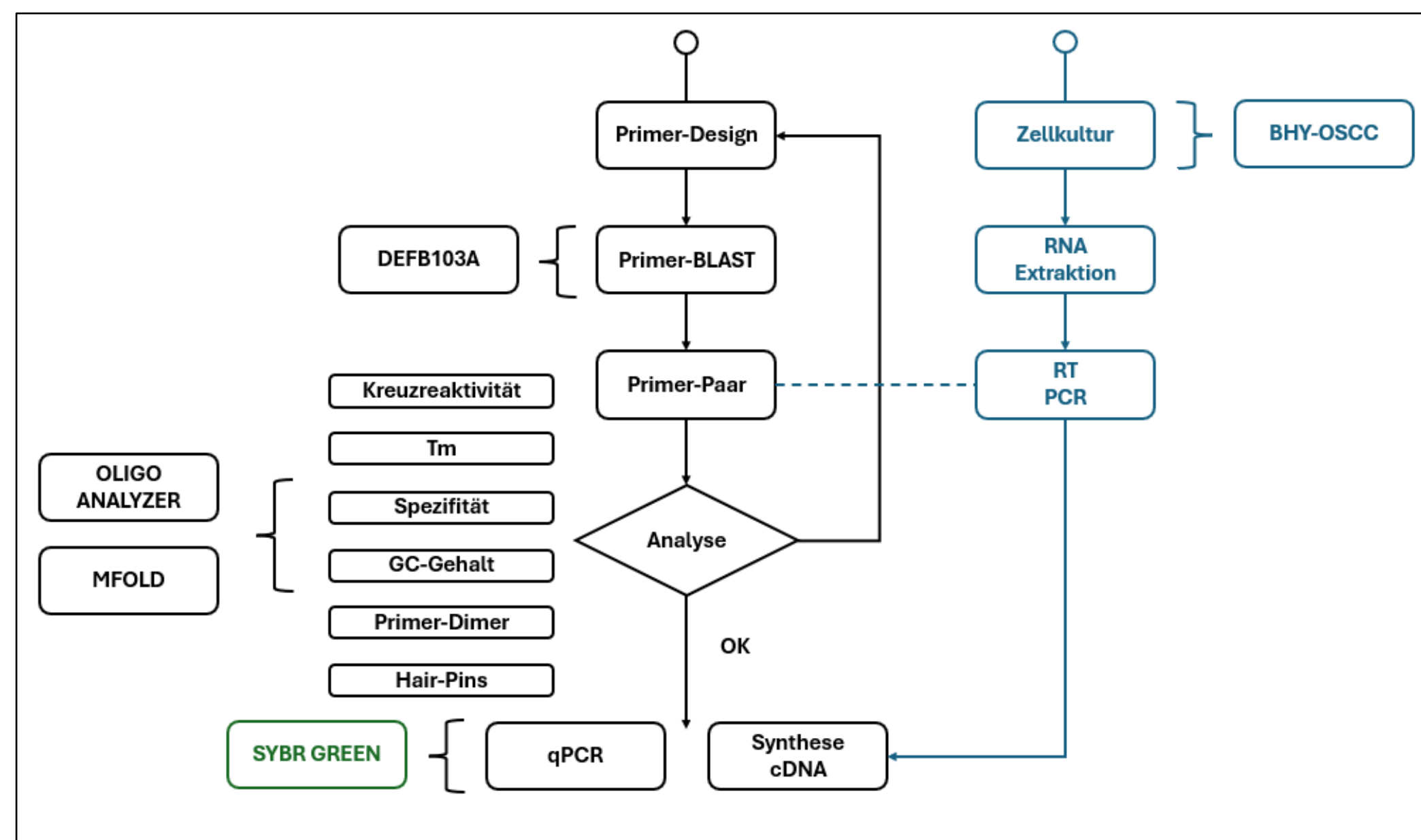
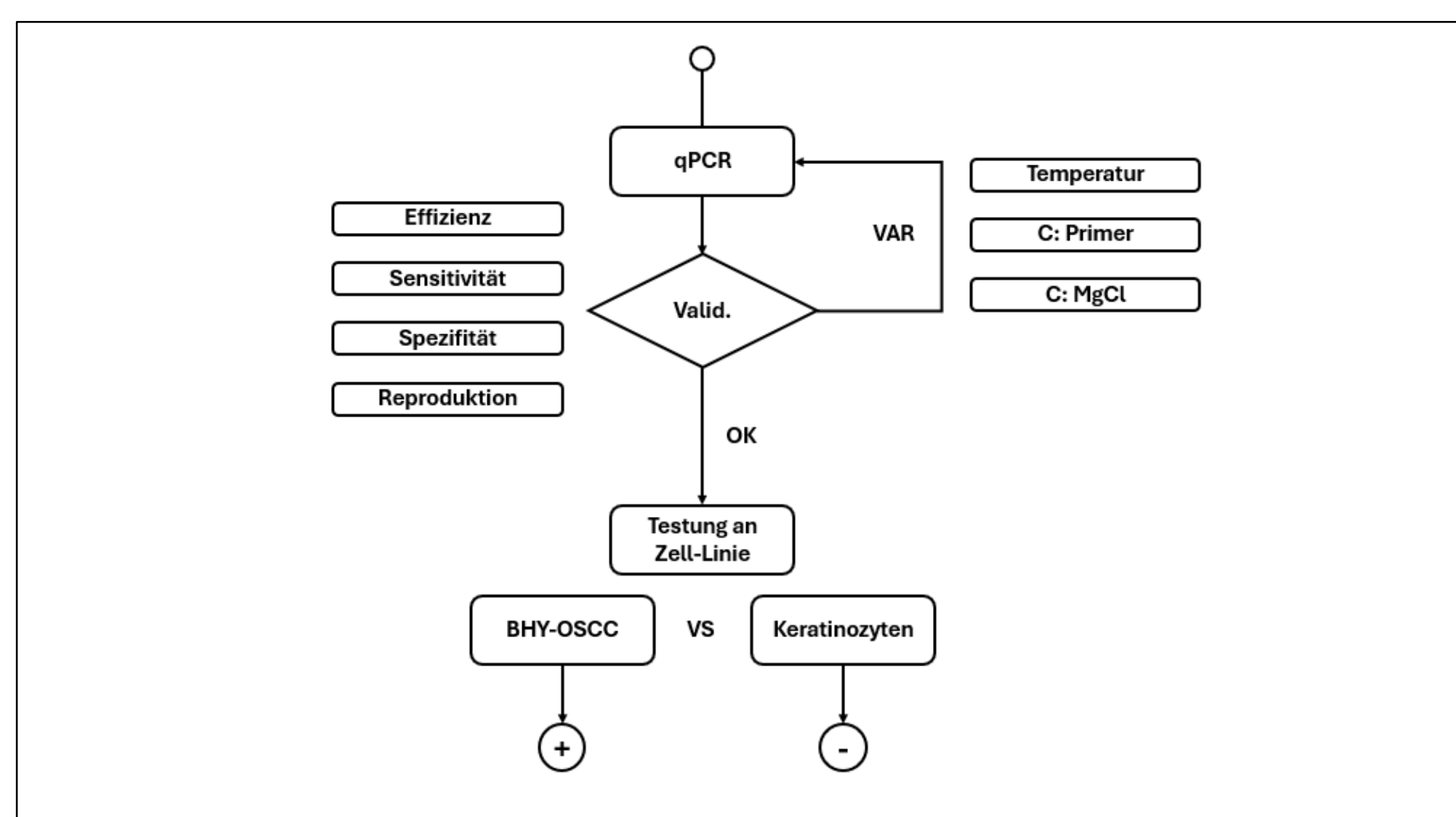


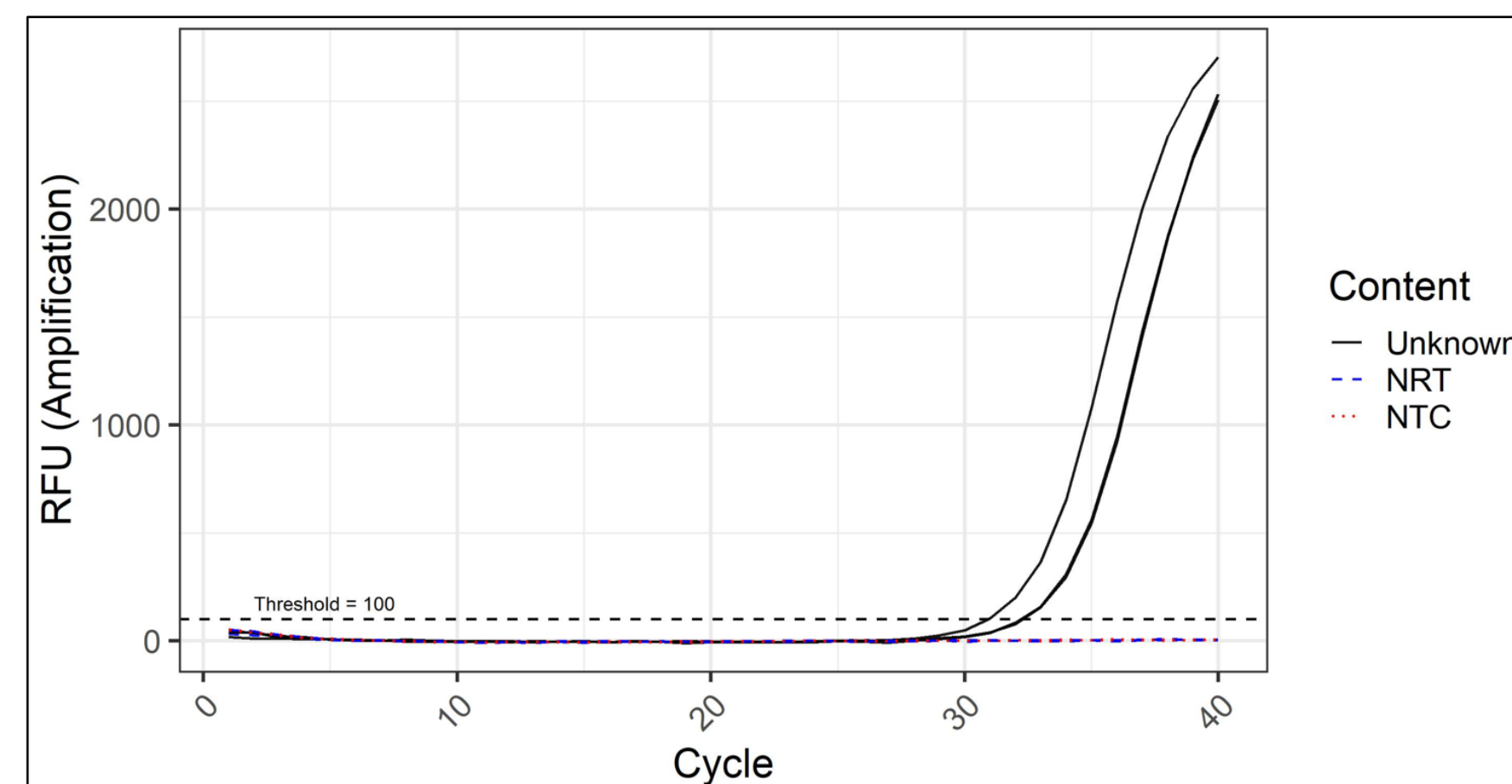
Entwicklung und Validation eines Real-Time qPCR-Primers



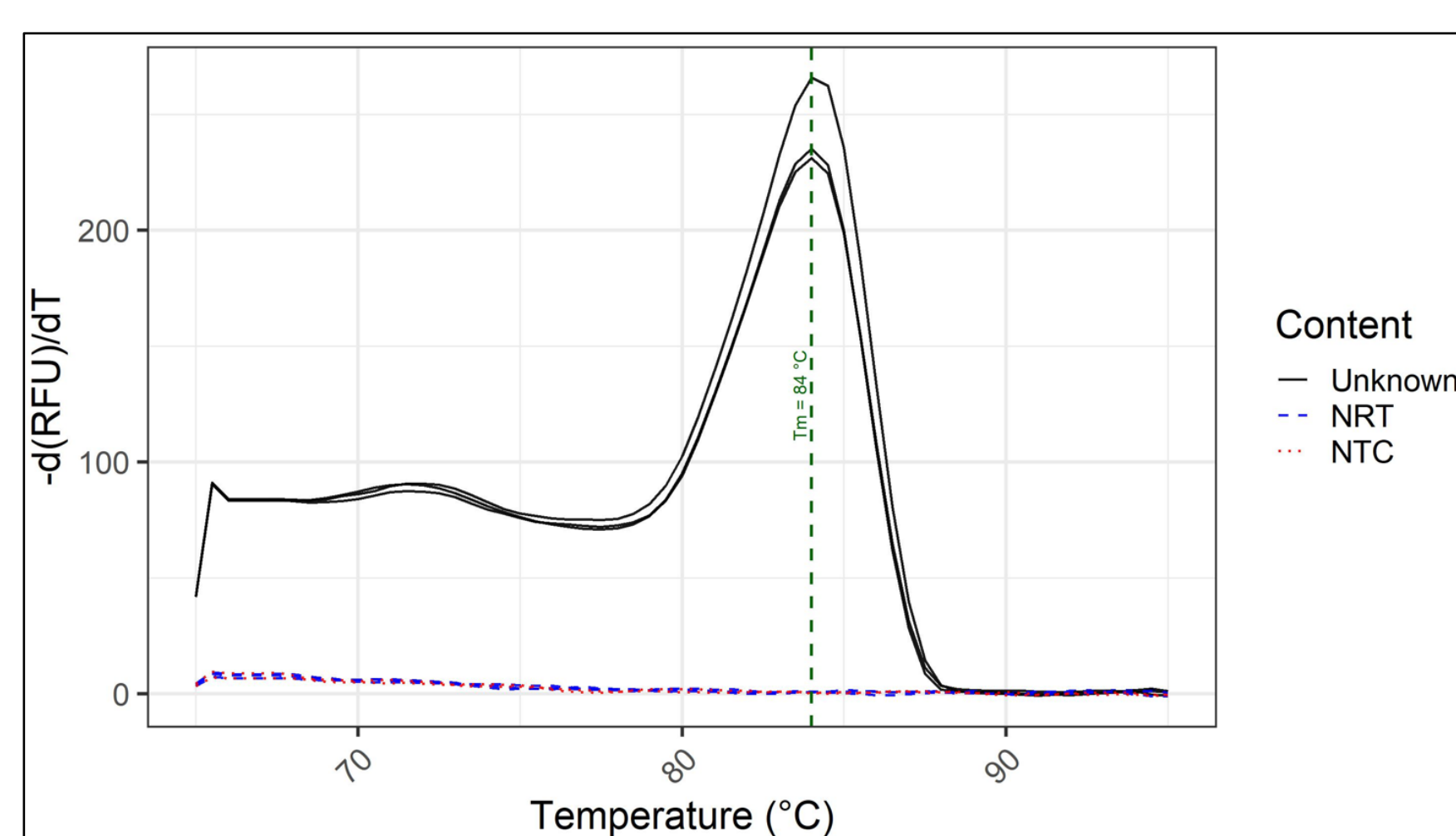
Flussdiagramm der praktischen Laborarbeiten (Teil A)



Flussdiagramm der praktischen Laborarbeiten (Teil B)



Messkurve der Real-Time qPCR (Primer 2)



Melt-Peak der Real-Time qPCR (Primer 2)

Problemstellung

Das orale Plattenepithelkarzinom (OSCC) stellt die häufigste Krebsform im Mund- und Rachenbereich dar. Die Diagnostik umfasst primär eine Endoskopie der Rachen- und Halsregion, bildgebende Verfahren sowie eine Biopsie verbunden mit einem anschließenden Staging-Verfahren. Die Qualität der histologischen Befunde kann stark variieren. Eine Früherkennung und Differenzierung zu entzündlichen Läsionen sind dabei entscheidend für das Outcome der Patienten. Daher sind Biomarker im Hinblick auf die Detektion von progressiven Läsionen von grossem Interesse. In den Studien von Gosh et al. wird mit dem antimikrobiellen Peptid HBD-3 ein solcher Biomarker beschrieben. Im Kontext von malignen Dysplasien stehen dessen tumorprogressiven Eigenschaften im Fokus.

Eine zuverlässige Messung der HBD-3 Expression macht allerdings spez. wie auch valid. Primer-Paare für die Real-Time qPCR notwendig. Die Entwicklung und Validation dieser Primer-Paare ist Gegenstand dieser Bachelor-Thesis.

Lösungskonzept

Die Bachelor-Thesis ist in 3. Phasen unterteilt. In der 1. Phase findet ein Design der Primer mittels Primer-BLAST (NCBI) statt. Die Ergebnisse werden in der 2. Phase anhand der IMT-Kriterien bewertet. Es folgt eine Validation der Primer-Paare mit den stärksten Eigenschaften. Im Rahmen der 3. Phase werden aus den qPCR-Ansätzen die Leistungsmerkmale der Primer erfasst und analysiert.

Ergebnisse

Die Ergebnisse aus den praktischen Laborarbeiten geben die Leistungsfähigkeit der untersuchten Primer wieder. Im Vergleich zu den House keeping Genen (18S / B2M) sind die Primer mit CT-Werten von ca. 30 PCR-Zyklen einigermaßen sensitiv. Die mittleren Schmelztemperaturen liegen bei ca. 85°C und unterscheiden sich somit klar von den Hochrechnungen aus Primer-BLAST. Jedoch finden sich bei drei von vier Primern spez. Bandenmuster und die neg. QK bleiben unterhalb der Nachweisgrenze. Die Standardkurven erfüllen nur bei einem Primer (NCBI_2) die Vorgaben. Folglich

fallen die Effizienz und Linearität in der Tendenz schlecht aus. Dennoch lassen sich mit den Primer-Paaren PCR-Produkte herstellen. Die äußeren Einflüsse auf die PCR-Reaktion sollten in einem nächsten Schritt stufenweise optimiert werden, um die Leistungsmerkmale zu verbessern sowie eine Routine-Testverfahren zu etablieren.

Patrick Gerber

Hauptbetreuer:
Herr Dr. Fabian Ille

Experte:
Herr Dr. Philipp Stämpfli

Kooperationspartner:
HNO Chirurgie Luzerner Kantonsspital

