

F a c h a r b e i t

aus dem Fach

Chemie

**- Polymerase-Kettenreaktion (PCR) -
Theorie und Darstellung als digitales Medium**



Verfasser: Thomas Jungwirth
Leistungskurs: 3C1 Chemie
Kursleiter: LAss Kurt Gallenberger
Abgabetermin: 25. Januar 2008

Erzielte Note: in Worten:

Erzielte Punkte: in Worten:

.....
Unterschrift des Kursleiters

(Eingangsstempel)

Inhaltsverzeichnis

I. Persönliche Einführung	S. 3
II. Grundlagen der PCR-Technik	S. 3
1. Geschichte	S. 3
2. Zellbiologische Grundlagen	S. 4
3. Denaturierung der DNA-Doppelstränge	S. 6
4. Primerhybridisierung (Annealing)	S. 6
5. Verlängerung der DNA-Einzelstränge (Elongation)	S. 7
6. Vermehrung (Amplifikation)	S. 9
7. Produktion und Nachweis	S. 10
III. Durchführung der Computeranimation in 3D	S. 13
1. Inhalt der Animation	S. 13
2. Verwendete Software	S. 13
3. Computerausstattung	S. 14
4. Vom Papier zur CD	S. 14
IV. Schlussbemerkung	S. 15
V. Literaturverzeichnis	S. 16
VI. Erklärung	S. 17
VII. Anhang	S. 18

I. Persönliche Einführung

Zu Beginn möchte ich anmerken, dass das Thema dieser Facharbeit, so wie es jetzt ist, am Anfang noch gar nicht existiert hat. Der Titel des ursprünglichen Themas lautete „Entwicklung einer Modellapparatur zur Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) an der Schule“. Ziel dieses Themas sollte es sein ein Gerät zu entwickeln, das die Durchführung der PCR an Schulen möglich macht. Dafür sollte es vor allem umweltfreundlich und billig sein. Nach Rücksprache mit Herrn Kratzer von der Technischen Universität München und Herrn Dr. Weilke von der Firma Roche Diagnostics GmbH in Penzberg verlor dieses Thema jedoch schnell an Bedeutung, da hier selbst bereits nach kleinen, billigen Lösungen ohne revolutionäre Ergebnisse geforscht wurde und Chemikalien gängiger Nachweismethoden, wegen ihrer karzinogenen Wirkung, für den Schulalltag nicht zugelassen sind. Nach weiterem Kontakt mit Herrn Dr. Weilke und Gesprächen mit meinem Lehrer Herrn Kurt Gallenberger entschloss ich mich bei diesem sehr interessanten Thema zu bleiben, das wichtigste rund um die PCR theoretisch festzuhalten und, um eine Praxis beizubehalten, eine 3D-Animation der PCR zu erstellen.

II. Grundlagen der PCR-Technik

1. Geschichte

Im Jahr 1983 erfand der amerikanische Biochemiker Kary Banks Mullis die Technik der Polymerase-Kettenreaktion, welche in vitro, also außerhalb eines Organismus stattfindet. Er entwickelte ein Verfahren, durch das sich ausgewählte Sequenzabschnitte einer DNA mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase in kurzen aufeinanderfolgenden Temperaturzyklen immer wieder kopieren und dadurch exponentiell vervielfältigen ließen. Für diese revolutionäre Entdeckung erhielt er zehn Jahre später (1993; sieben Jahre nach der Veröffentlichung 1986) zusammen mit dem kanadischen Chemiker Michael Smith den Nobelpreis im Fach Chemie. Die Verwendung thermostabiler Taq-Polymerase, welche aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wird, machte das ständige Zugabe neuer Polymerase nach der Denaturierung der DNA überflüssig. Daraufhin verkaufte Mullis seine Patentrechte an den Pharmakonzern Hoffmann La Roche. Die PCR-Methode ist heute ein wichtiger Bestandteil der genetischen Analytik und aus keinem gentechnischen Labor mehr wegzudenken. Mit der PCR-Technik ist es möglich, kleinste Mengen von genetischem Erbmateriale in kürzester Zeit zu vervielfachen, wodurch es dann mit herkömmlichen Techniken wie der

Gelelektrophorese nachgewiesen werden kann und eröffnete dadurch eine Vielzahl neuer Möglichkeiten in der Kriminalistik, Gerichtsmedizin, Lebensmittelanalytik, Archäologie und natürlich auch in der Humangenetik.²

2. Zellbiologische Grundlagen

Die Desoxyribonukleinsäure (DNS/DNA (*engl. acid* für Säure)) ist die Trägerin der Erbinformation von Organismen. Die DNA ist ein langes Molekül in Form einer Doppelhelix - zwei Stränge, die sich wie eine verdrehte Strickleiter regelmäßig umeinander winden (vgl. Titelbild). Die Stricke dieser Leiter bestehen aus Zuckern (3'-Ende) und Phosphaten (5'-Ende). Die Sprossen sind aus je zwei, durch Wasserstoffbrücken miteinander verbundenen, komplementären Basen, den eigentlichen Trägern der Erbinformation, zusammengefügt. Es gibt in der DNA insgesamt vier solcher Basen: Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C).

Nur zwei dieser Basen können eine gemeinsame Sprosse bilden: Adenin mit Thymin, sowie Guanin mit Cytosin. Andere Kombinationen passen, auf Grund der unterschiedlichen Anzahl von Stellen, an denen sich Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können, nicht zueinander (vgl. Abb.1).

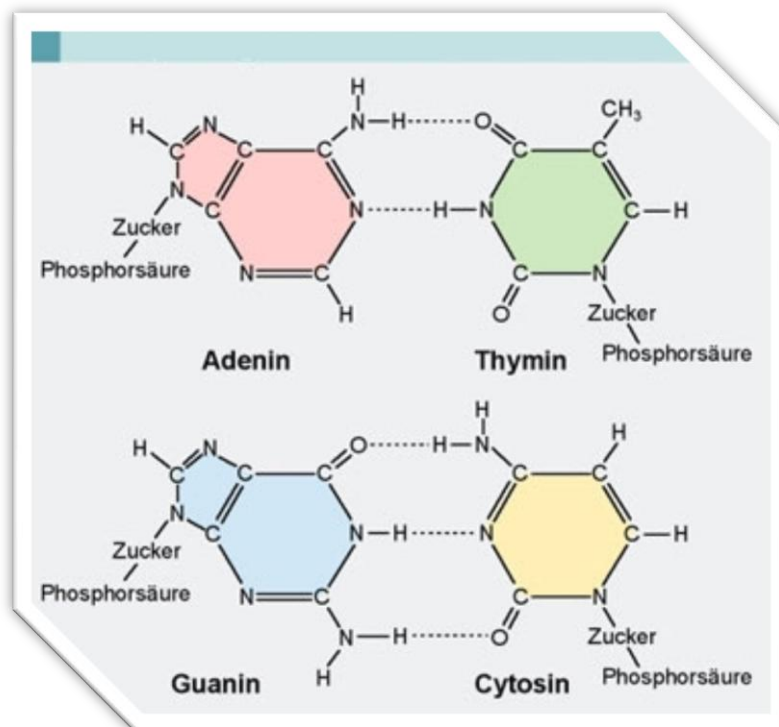


Abb.1: Basenpaarungen in der DNA²

² Quelle: Literaturverzeichnis 5, 6, 7, 14

Die beiden DNA-Einzelstränge sind komplementär zueinander, was bedeutet, dass sich aus der Basenfolge des einen Stranges eindeutig die des gegenüberliegenden ergeben muss. An Adenin kann nur Thymin und an Guanin nur Cytosin binden – und umgekehrt. Jede dieser Basen ist immer mit einem Zucker- und einem Phosphatmolekül verknüpft. Diese Verbindung aus Base, Zucker und Phosphat wird als Nukleotid bezeichnet und ist der Grundbaustein von Nukleinsäuren wie DNA und RNA/RNS (Ribonukleinsäure). Teilt sich eine Zelle und will ihre Erbinformationen weitergeben, entspiralisiert sich die Doppelhelix und der Doppelstrang trennt sich wie ein Reißverschluss in die zwei Einzelstränge auf. An jedem dieser Einzelstränge wird ein komplementäres, neu synthetisiertes Gegenstück gebildet, so dass nach einer Zellteilung zwei identische DNA-Doppelstränge vorliegen bzw. in jeder Zelle ein kompletter DNA-Doppelstrang vorliegt. So dient ein Strang also als Matrize (*engl.* Template) zur Bildung seines Gegenübers.

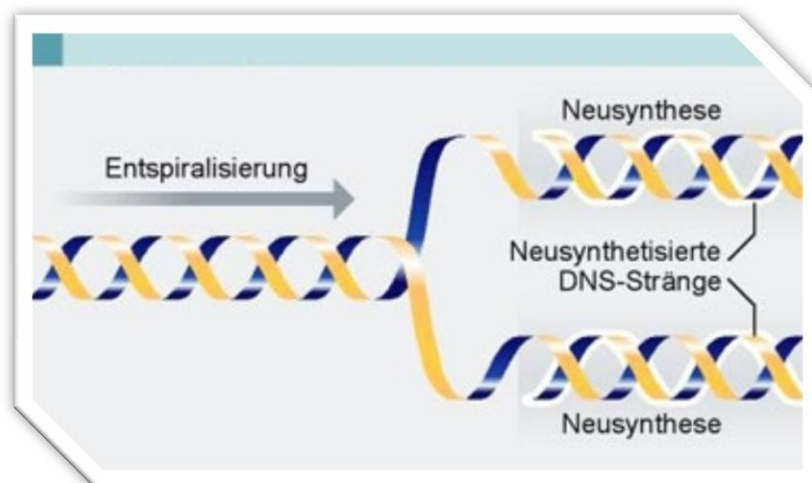


Abb.2: Replikation der DNA ³

Damit das funktioniert und die Basen in der richtigen Reihenfolge angefügt und verknüpft werden, verfügt jeder Zellkern über spezialisierte Enzyme, die Polymerasen, welche katalysierend wirken und die Vervielfältigung der Erbinformation kontrollieren. Auch hat die Polymerase-Kettenreaktion diesem Enzym ihren Namen zu verdanken, dessen Fähigkeiten in der PCR auf geniale Weise genutzt werden. ³

³ Quelle: Literaturverzeichnis 7

3. Denaturierung de DNA-Doppelstränge

Schritt1: Denaturierung (Denaturation, Schmelzen oder engl. Melting):

Die Reaktionslösung wird mit allen Bestandteilen (doppelsträngige DNA, die die Zielsequenz enthält, Polymerasen, meist Taq-Polymerase, Primer, welche als Startsequenz dienen, und Nukleotide, welche an die Primer angehängt werden) zunächst auf über 90 °C erhitzt, um die DNA-Stränge zu trennen.

Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten (vgl. Abb.1), werden aufgebrochen; die DNA denaturiert. Oft wird die DNA im ersten Zyklus für längere Zeit erhitzt, um sicherzustellen, dass sich sowohl die Ausgangs-DNA, als auch die Primer vollständig voneinander getrennt haben und nur noch Einzelstränge vorliegen.⁴

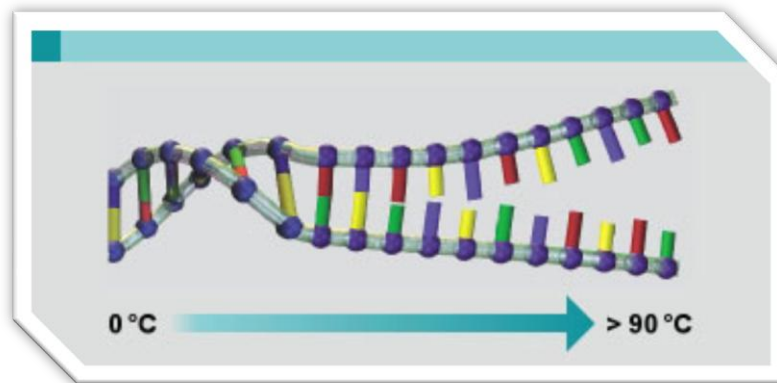


Abb.3: Denaturierung des DNA-Doppelstrangs bei über 90 °C⁴

4. Primerhybridisierung (Annealing)

Schritt 2: Primerhybridisierung (engl. primer annealing): Nach Auftrennung der DNA in Einzelstränge wird die Temperatur soweit abgesenkt, dass die sogenannten Primer (Oligonukleotide) spezifisch an die komplementären Stellen der DNA hybridisieren, an denen die Kopie beginnen soll. Sie markieren damit den Startpunkt für die Tätigkeit der Polymerasen und gleichzeitig den Anfang bzw. das Ende des DNA-Abschnitts, der vervielfältigt werden soll. Ein Primer besteht aus etwa 12 bis 20 Nukleotiden, die gezielt für den spezifischen DNA-Abschnitt hergestellt werden. Auf welche Temperatur dann letztendlich gekühlt werden muss, ist von den Primern abhängig und liegt normalerweise 2 - 3 °C unter ihrem Schmelzpunkt, im Normalfall zwischen 50 und 65 °C.

⁴ Quelle: Literaturverzeichnis 6, 8, 9

Wird die Temperatur zu hoch eingestellt, können die Primer nicht binden und es wird kein Produkt (DNA-Amplikon) gebildet. Bei zu niedriger Temperatur binden die Primer auch an andere, nur teilweise komplementäre Stellen der genomischen DNA, wodurch auch diverse unerwünschte DNA-Abschnitte kopiert werden, statt der eigentlichen Zielsequenz.⁵

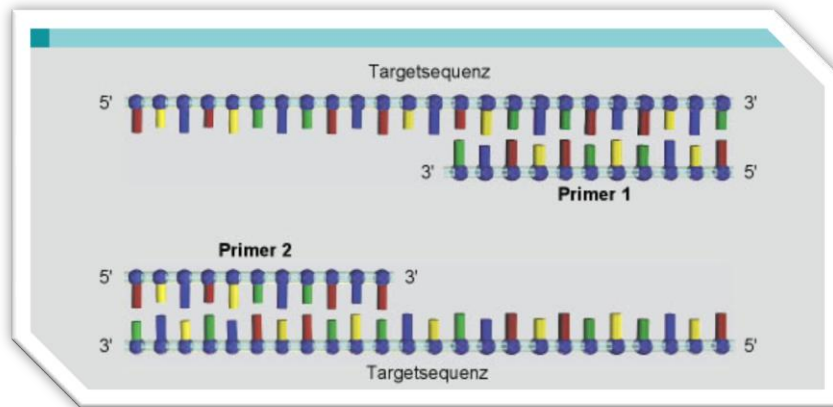


Abb.4: Primerhybridisierung – Zwei Primer bilden die Ziel-DNA⁵

5. Verlängerung der DNA-Einzelstränge (Elongation)

Schritt 3: Elongation (DNA/DNS-Synthese, Polymerisation oder Verlängerung):

Die Polymerase lagert sich an das offene 3'-Ende eines hybridisierten Primers am überstehenden DNA-Gegenstrang an und beginnt den Primer mit weiteren Nukleotiden komplementär zum Gegenstrang zu verlängern. Zur Steigerung der Produktivität wird die Temperatur im Elongationsschritt auf das Aktivitätsoptimum der Polymerase bei 72 °C angehoben. Für die PCR werden zum Beispiel folgende, besonders hitzestabile DNA-Polymerasen eingesetzt:

Taq-Polymerase: Isoliert aus dem Namen gebenden Bakterium *Thermus aquaticus*, das in Geysiren und heißen Quellen bei 60 - 80 °C lebt, und ist besonders produktiv.

Tth-Polymerase: Isoliert aus dem thermophilen Bakterium *Thermus thermophilus*. In Gegenwart von Manganionen kann diese Polymerase im Gegensatz zu den anderen Polymerasen auch Primer an RNA-Gegensträngen verlängern und damit sowohl DNA- wie auch RNA-Sequenzabschnitte als DNA-Amplikon vervielfältigen.

⁵ Quelle: Literaturverzeichnis 6, 8, 9, 14

Pwo- / Pfu-Polymerase: Die Kürzel Pwo und Pfu stehen für *Pyrococcus woesei* bzw. *Pyrococcus furiosus*, thermophile Archaeobakterien, aus denen diese Polymerasen isoliert wurden. Während zum Beispiel die Taq-Polymerase statistisch bei 10.000 Nukleotiden ein falsch gepaartes Nukleotid einbaut, besitzen diese Enzyme eine sogenannte ‚Proofreading Activity‘. Durch diese Korrekturfunktion wird bei jedem angehängten Nukleotid noch einmal die Hybridisierung zum Gegenstrang überprüft und bei einer Fehlpaarung das Nukleotid wieder abgespalten. Dadurch benötigen diese Enzyme deutlich mehr Zeit für den Elongationsschritt als beispielsweise die Taq-Polymerase. Die ‚Proofreading Activity‘ wird beim Klonieren genutzt, wenn Sequenzabschnitte vervielfältigt und dann in das Genom eines Organismus integriert werden sollen, wobei die Korrektheit der gesamten Sequenz essentiell ist.

Da Pwo- und Pfu-Polymerasen sehr teuer sind, wird für die übrigen PCR-Operationen die wesentlich günstigere, dafür weniger akkurate Taq-Polymerase verwendet, die für diese auch meist ausreichend ist. Ist nun das entsprechende Temperaturoptimum erreicht, komplettieren die Polymerasen den Strang am 3'-Ende des Primers mit den ebenfalls zugesetzten Nukleotiden zum Doppelstrang (vgl. Abb.5). Der Primer wird nicht wieder abgelöst, da er den Anfang des Einzelstrangs bildet. Zudem brechen lose Verbindungen zwischen Primern und DNA-Abschnitten wieder auf, die nicht vollständig komplementär sind; ein weiterer Korrektur-Mechanismus der Natur. Die Zeit, die dieser Schritt benötigt, hängt ebenso von der verwendeten DNA-Polymerase, wie auch von der Länge des DNA-Fragments, das vervielfältigt werden soll, ab. Das doppelsträngige PCR-Produkt nennt man Amplikon.⁶

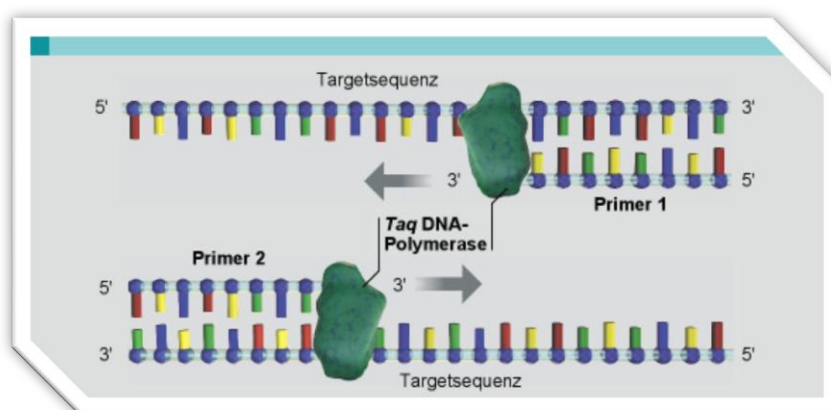


Abb.5: Elongation der DNA-Stränge am 3'-Ende des Primers⁶

⁶ Quelle: Literaturverzeichnis 6, 8, 9, 14

6. Vermehrung (Amplifikation)

Durch die Temperatur gesteuert, werden die drei Schritte (Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation) nun circa 30 mal wiederholt. Das geniale Prinzip der PCR ist, dass die neu gebildeten DNA-Stränge im nächsten Zyklus als Muster wieder kopiert werden. Beim ersten Ablesen der Original-DNA wird über das Ende des gewünschten DNA-Abschnitts hinaus verlängert. Bei jeder weiteren Kopie davon wird mit dem jeweils anderen Primer der Gegenstrangsequenz gestartet (vgl. Abb.4 und Abb.5), so dass daraus nur noch der definierte Sequenzabschnitt amplifiziert wird (Amplifikation = Vervielfältigung; Produkt: Amplifikat oder Amplikon).

Da das beidseitig begrenzte Amplikon exponentiell vermehrt wird, die Erstprodukte mit den undefinierten Enden dagegen nur linear, ist nach einigen Zyklen nur noch das definierte Amplikon von Bedeutung. Theoretisch entstehen aus einem DNA-Zielmolekül nach 20 Zyklen circa eine Million Kopien, nach 30 Zyklen schon eine Milliarde, so dass nach Abschluss der PCR ausreichend Material für laboranalytische Detektionsverfahren oder präparative Arbeiten zur Verfügung steht. Auf diese Weise kann im Extremfall ein einziges DNA-Zielmolekül aus einer großen Menge von DNA anderer Sequenz herausamplifiziert und sicher nachgewiesen werden, was mit keiner anderen Methode so einfach möglich ist.⁷

Anzahl der Zyklen	Anzahl Amplikate (= Kopien der Targetsequenz)
1	$2^1 = 2$
2	$2^2 = 4$
3	$2^3 = 8$
4	$2^4 = 16$
5	$2^5 = 32$
6	$2^6 = 64$
20	$2^{20} = 1.048.576$
30	$2^{30} = 1.073.741.824$

Abb.6: Exponentielles Wachstum der Amplikate⁷

⁷ Quelle: Literaturverzeichnis 8, 9, 14

7. Produktion und Nachweis

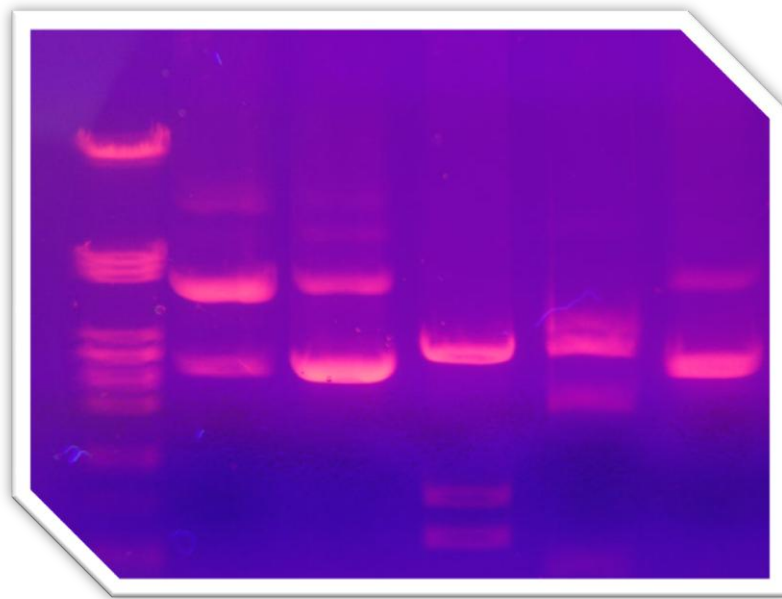
Produziert bzw. vermehrt wird die DNA in einem sogenannten Thermocycler. Dieses Gerät ist in der Lage die Temperaturzyklen einer Polymerase-Kettenreaktion selbständig durchzuführen. Eine Weiterentwicklung dieses Geräts ist der von der Firma Roche entwickelte LightCycler[®] für die quantitative Real-time PCR (qPCR, quantitative Echtzeit-PCR). Diese ist eine Vervielfältigungsmethode, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion beruht und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung, also einer quantitativen Analyse, mittels spezieller Software am Computer bietet. Durchgeführt wird die Quantifizierung mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus, deshalb auch der Name ‚Real Time‘/Echtzeit. Mit der Menge der PCR-Produkte nimmt auch die Fluoreszenz proportional zu, was eine Quantifizierung möglich macht. Eine gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente, die sonst übliche Nachweismethode, ist nicht nötig, da die Daten sofort verfügbar sind. Das Kontaminationsrisiko für nachfolgende PCR-Ansätze ist wesentlich verringert, da die Reaktionsgefäße mit den extrem hohen Amplikon-Konzentrationen nach der Reaktion nicht mehr geöffnet werden müssen.⁸



Abb.7: LightCycler[®] der Firma Roche⁸

⁸ Quelle: Literaturverzeichnis 10, 11, 13, 14

Die Real-time qPCR ermöglicht den qualitativen Nachweis einer bestimmten DNA-Sequenz und eine wesentlich präzisere und leistungsfähigere Quantifizierung als früher angewandte Methoden, bei denen nur das Endprodukt nach der PCR bewertet wird. Eine gängige und anschauliche Nachweismethode für die Amplikons ist die Agarose-Gelelektrophorese, welche auch für einen Vaterschaftstest oder zum Erstellen eines genetischen Fingerabdrucks in der Kriminalistik genutzt wird. Sie ist eine molekularbiologische Methode, um Nukleinsäure-Stränge (RNA oder DNA) nach ihrer Größe/Länge zu trennen und um ihre Größe/Länge durch Vergleich mit Strängen bekannter Größe/Länge zu bestimmen. Das Gel besteht aus langen Agarosepolymerfäden, die zu einem Gel vernetzt werden. Je höher die Agarose konzentriert ist, desto kleiner sind die Poren, die sich im Gel befinden. Das Prinzip der Gelelektrophorese gleicht dem eines Siebs, nur für Moleküle. Um die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle durch die Gelmatrix wandern zu lassen, wird ein elektrisches Feld verwendet. An der Kathode (negativer Pol) befinden sich sogenannte Taschen, in die die DNA-Proben pipettiert werden. Die kleineren Moleküle können sich schneller als große durch das Gel zur Anode (positiver Pol) bewegen und somit wird eine Auftrennung der Stränge nach ihrer Größe/Länge ermöglicht. War die Elektrophorese erfolgreich, kann das Gel unter einer UV-Lampe betrachtet werden. Ethidiumbromid, das sich in die DNA eingelagert hat, fluoresziert im ultravioletten Licht.⁹



*Abb.8: DNA-Banden im UV-Licht*⁹

⁹ Quelle: Literaturverzeichnis 10, 11, 14

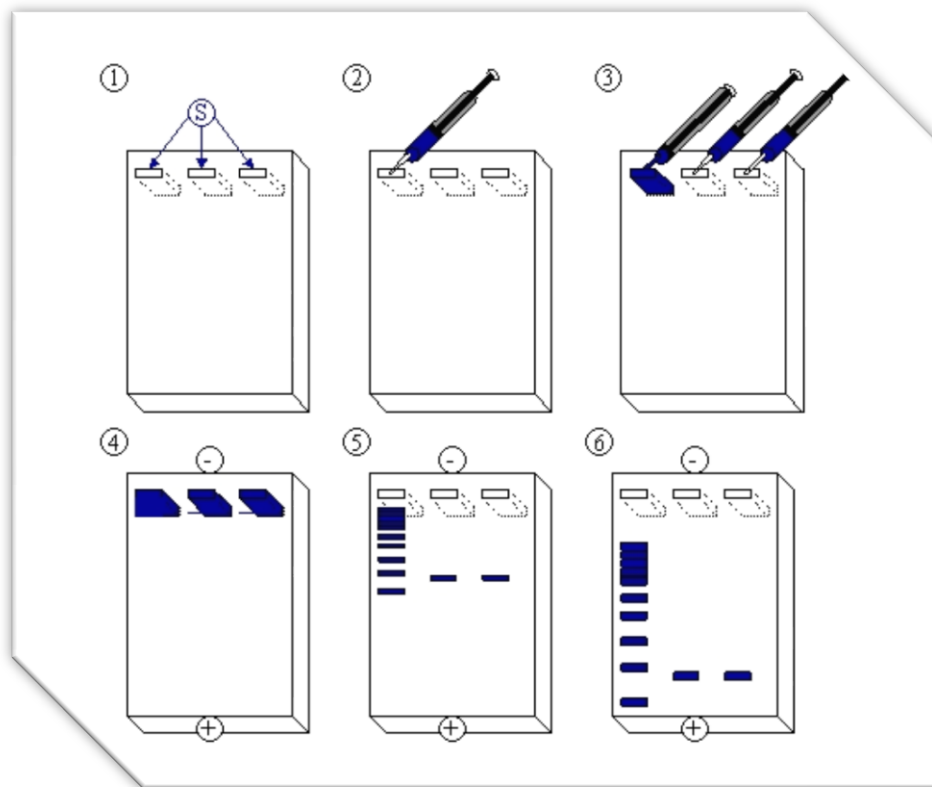


Abb.9: Schematische Darstellung der Agarose-Gelelektrophorese¹⁰

- (1) Das Agarosegel mit 3 Taschen (S).
- (2) Einspritzen von DNA-Leiter in die erste Tasche.
(Mischung verschiedener DNA-Stränge bekannter Länge, mit der die DNA-Probe verglichen werden kann, um deren Größe zu bestimmen)
- (3) Die zu untersuchenden Proben 2 und 3 werden aufgetragen.
- (4) Eine Spannung wird angelegt. Die DNA wandert zur positiv geladenen Anode, weil sie, auf Grund der Phosphatreste, negativ geladen ist.
- (5) Kleine DNA-Fragmente wandern schnell, große langsam durch das Gel. Die DNA ist währenddessen normalerweise nicht sichtbar. Daher wird der Fortschritt an der Farbfrent abgelesen, die sich mit einem DNA-Fragment bestimmter Länge auf gleicher Höhe durch das Gel bewegt, je nach Farbstoff und Agarose-Konzentration unterschiedlich schnell bzw. langsam.
- (6) Anhand der Farbfrent wird abgeschätzt, wann die Elektrophorese beendet und ausgewertet wird.¹⁰

¹⁰ Quelle: Literaturverzeichnis 12

III. Durchführung der Computeranimation in 3D

1. Inhalt der Animation

Der Inhalt der Animation beschränkt sich grob auf die drei wichtigsten Schritte der PCR: Denaturierung, Primerhybridisierung (Annealing) und Elongation.

Mit Hilfe eines Thermometers wird verdeutlicht, dass jeder der oben genannten Schritte eine ganz spezielle Temperatur benötigt. Dieses wird zwischen jedem Schritt, zusammen mit einer Erklärung, und während der laufenden Schritte eingeblendet. Zudem wurden allgemeine Erklärungen zu jedem Einzelschritt und der PCR angefügt, die zum weiteren Verständnis dienen sollen. Die in der Animation vorkommenden Werte stammen aus dem Standardprotokoll für die Taq-Polymerase der Firma Roche.

2. Verwendete Software

Die Einzelanimationen, der größte Arbeitsanteil des Films, wurden mit der Software ‚Blender‘ (Version 2.45) erstellt. ‚Blender‘ ist eine im Internet frei erhältliche 3D-Grafiksoftware (mit der GPL lizenziert). Sie enthält Funktionen, um dreidimensionale Körper zu modellieren, sie zu texturieren, zu animieren und zu rendern. ‚Blender‘ besitzt einen eingebauten Videoschnitteditor und eine Spiel-Engine. Als Skriptsprache wird Python benutzt. Ursprünglich war ‚Blender‘ ein firmeninternes Programm des niederländischen Animationsstudios NeoGeo. Der Chefentwickler Ton Roosendaal gründete 1998 die Firma NaN (Not a Number Technologies), um ‚Blender‘ weiterzuentwickeln und zu vertreiben. Nach dem Bankrott von NaN stimmten die Gläubiger zu, ‚Blender‘ für einen Betrag von 100.000 Euro unter die freie Softwarelizenz GNU General Public License (GPL) zu stellen. Daher wurde 2002 von Roosendaal die Stiftung ‚Blender Foundation‘ mit dem Ziel gegründet, Spenden zu sammeln, was bereits zwei Monate nach der Gründung erreicht wurde.

Geschnitten und zusammengefügt wurden die Animationen mit dem Programm ‚Adobe Premiere Pro CS3‘ (APP CS3), einem kommerziellen und auch für den Profibereich entwickelten Film- und Videoschnittprogramm der Firma Adobe Systems. Das aus APP CS3 exportierte Video wurde mit der in der kommerziellen Brennsoftware ‚Nero 7‘ enthaltenen Komponente ‚Nero Vision‘ im „mini-DVD“-Format gebrannt. Ebenso wurde mit ‚Nero Vision‘ das Titelmanü der beiliegenden CD erstellt.¹¹

¹¹ Quelle: Literaturverzeichnis 2, 3, 4

3. Computerausstattung

Zum Erstellen der Animation wurden zwei Computer benutzt:

Der Desktop-PC (Prozessor: AMD Athlon™ XP 3000+, 2.17 GHz; Arbeitsspeicher: 1,00 GB; Betriebssystem: Microsoft Windows XP Professional) diente in erster Linie zum Kennenlernen der Software ‚Blender‘ und dann hauptsächlich dazu, die Grundgerüste der in der Animation vorkommenden Elemente zu modellieren.

Der Laptop (Prozessor: Intel Core 2 Duo T7500 2x 2.20 GHz; Arbeitsspeicher: 2,00 GB; Betriebssystem: Microsoft Windows Vista Ultimate) wurde, auf Grund der höheren Rechenleistung und des größeren Arbeitsspeichers, zum animieren der Grundgerüste, zum Rendern der mit ‚Blender‘ erstellten Einzelanimationen, wie auch zum Schneiden, Exportieren (Adobe Premiere Pro CS3) und zum Erstellen bzw. Brennen des fertigen Films mit Titelmanü auf CD benutzt (Nero Vision).

4. Vom Papier zur CD

Die ersten Schritte in Richtung Animation begannen wie bei fast allem Filmen mit einem Storyboard auf einem Blatt Papier. Als ich mir soweit über Ablauf der Animation klar war, konnte ich mich nun fast auf elektronisches Terrain begeben.

Um mit der Animationssoftware ‚Blender‘ umgehen zu können waren zuerst 400 Seiten Tutorial auf Englisch durcharbeiten. Danach war es mir möglich dreidimensionale Objekte zu erstellen, zu texturieren, zu animieren und schließlich auch zu rendern.

Die daraus entstandenen Einzelanimationen wurden dann in das Videoschnittprogramm ‚Adobe Premiere Pro CS3‘ importiert. Mit diesem Programm konnte ich die

Einzelanimationen auf einem virtuellen Zeitstrahl anordnen, statische Elemente wie Texte und Bilder hinzufügen, Videos übereinanderlegen und Überblendungen einfügen.

Der fertige Film wurde dann mit Hilfe des Video-Codecs „H.264“ von Apple im *.mov-Format exportiert, um ein gutes Dateigröße : Qualität Verhältnis zu erhalten.

Da das *.mov-Format von Apple nicht standardmäßig mit dem Betriebssystem Windows kompatibel ist, wird zur Wiedergabe ein externer Player (zum Beispiel der Apple QuickTime Player) benötigt. Hier kam ‚Nero Vision‘ zum Einsatz. Damit konnte ich eine Kompatibilität zu Windows schaffen, indem ich den Film in das Programm importierte und eine Windows kompatible CD mit Titelmanü im „mini-DVD“-Format erstellte bzw. dann auch brannte. Diese CD kann problemlos mit dem Windows Media Player abgespielt werden und wird als DVD-Format erkannt.

VI. Schlussbemerkung

Mich persönlich hat an diesem Thema die Einfachheit und Komplexität der PCR, wie auch der biochemische Ursprung, der hier technisch umgesetzt wurde, fasziniert.

Obwohl die PCR im Endeffekt aus nur drei einfachen Schritten besteht, können durch die Verwendung verschiedener Polymerasen und Primer sehr viele verschiedene Ergebnisse für unterschiedlichste Einsatzmöglichkeiten erzielt werden. Wieder einmal ist ein genialer und eigentlich selbstverständlicher Mechanismus der Natur für den Menschen fassbar geworden.

Der theoretische Teil der Facharbeit, in dem es um die PCR allgemein geht, war relativ gut zu bewältigen, da hierfür im Internet viele, aktuelle und vor allem sehr gute Informationen zu finden waren. Die in der Facharbeit abgebildeten Grafiken wurden zur optischen Aufwertung der Facharbeit digital nachbearbeitet, so dass sie nicht mehr zu 100 % mit den Originalen übereinstimmen.

Der praktische Teil, die Darstellung der PCR in 3D, musste, wie oben erklärt, in mehreren Etappen absolviert werden und war mit verhältnismäßig hohem Arbeitsaufwand verbunden.

Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei meinem Lehrer Herrn Kurt Gallenberger, der mich von Anfang an bei der Bewältigung des Themas unterstützt hat und mir während der ganzen Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ebenso bedanke ich mich auch bei Herrn Dr. Christian Weilke, von der Firma Roche Diagnostics GmbH in Penzberg, der sich freundlicherweise dem Anfangsthema angenommen hat und mich bei dem jetzigen Thema mit seiner Zeit und seinem Fachwissen jederzeit unterstützt hat und erheblich zum Gelingen der Facharbeit beigetragen hat.

V. Literaturverzeichnis

01. Ruhr-Universität Bochum, DNA-Doppelhelix - 05. Januar 2008

<http://www.ruhr-uni-bochum.de/philosophy/struktur/dna5.jpg>

02. Wikipedia, Blender (Software) - 05. Januar 2008

http://de.wikipedia.org/wiki/Blender_%28Software%29

03. Wikipedia, Adobe Premiere - 05. Januar 2008

http://de.wikipedia.org/wiki/Adobe_Premiere

04. Nero, Enthaltene Applikationen - 22. Januar 2008

<http://www.nero.com/deu/nero8-applications-included.html>

05. Facharbeit von Dominik Bahr, Geschichte der PCR - 05. Januar 2008

<http://polymerase.de/2.html>

06. Wikipedia, Polymerase-Kettenreaktion - 05. Januar 2008

<http://de.wikipedia.org/wiki/PCR>

07. Roche in Deutschland, Was ist PCR? - 05. Januar 2008

http://www.roche.de/diagnostics/infektionsdiagnostik/pcr_technologie.htm?sid=0c000283e48252c75a70e861956915b5

08. Roche in Deutschland, PCR: Eine ausgezeichnete Methode - 05. Januar 2008

http://www.roche.com/pcr_d.pdf

09. Roche in Deutschland, Funktionsweise der PCR - 05. Januar 2008

http://www.roche.de/in_Deutschland/infektionsdiagnostik/pcr_funktionsweise.htm?sid=3b34c505428d3da7f57e17b08040e7a5

10. Wikipedia, Thermocycler - 05. Januar 2008

<http://de.wikipedia.org/wiki/Thermocycler>

11. Wikipedia, Real time quantitative PCR - 05. Januar 2008

http://de.wikipedia.org/wiki/Real_time_quantitative_PCR

12. Wikipedia, Agarose-Gelelektrophorese - 05. Januar 2008

<http://de.wikipedia.org/wiki/Agarose-Gelelektrophorese>

13. Roche Applied Science, LightCycler[®] - 05. Januar 2008

<https://www.roche-applied-science.com/sis/lightcycler/images/lc2/LC2.gif>

14. Herr Dr. Christian Weilke, Firma Roche Diagnostics GmbH in Penzberg

E-Mail: christian.weilke@roche.com | Tel.: +49-8856-605722

VI. Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die Facharbeit ohne fremde Hilfe angefertigt und nur die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Benediktbeuern, den 24. Januar 2008

.....

Ort

Datum

Thomas Jungwirth

VI. Anhang

Der Anhang befindet sich auf der mit „Anhang zur Facharbeit ...“ beschrifteten CD in dem Verzeichnis „/Anhang“. Dort sind alle Webseiten, die im Literaturverzeichnis angegeben sind, im *.pdf-Format ausgedruckt.

Ebenfalls befinden sich auf dieser CD in dem Verzeichnis „/Facharbeit“ aus sicherheitstechnischen Gründen nochmal der schriftliche Teil der Facharbeit im *.pdf-Format, sowie der Film im *.mov-Format, der mit dem ebenso beiliegendem Apple QuickTime Player problemlos abgespielt werden kann.

Auf der beigelegten CD mit der Beschriftung „Polymerase-Kettenreaktion in 3D“ befindet sich der praktische Teil dieser Facharbeit, die 3D-Animation der Polymerase-Kettenreaktion als Film mit Titelmü (Verzeichnis „/VIDEO_TS“), die der Veranschaulichung des Themas dienen soll. Die CD ist im „miniDVD“-Format gebrannt und für die Wiedergabe im Windows Media Player ausgelegt.

Nach dem Einlegen in das CD-Laufwerk wird die CD halbautomatisch gestartet.