

## 1 Einleitung

### 1.1 Allgemeine Einführung

Housekeeping-Gene gehören zu einer großen Gruppe von Genen, die Proteine kodieren, welche für die Aufrechterhaltung verschiedener Zellfunktionen essentiell sind. Ich benutze im Folgenden die englische Bezeichnung „Housekeeping-Gen“ anstelle des deutschen Ausdrucks „Haushaltsgen“, da der Terminus „Housekeeping-Gen“ inzwischen auch in der deutschsprachigen Literatur fast ausschließlich verwendet wird. Im Idealfall werden diese Housekeeping-Gene konstant exprimiert, ohne internen oder externen regulatorischen Einflüssen zu unterliegen. Mit Hilfe dieser endogenen Kontrollgene können in Genexpressionsstudien relative Quantifizierungen von klinisch interessanten Zielgenen durchgeführt werden. Die Suche nach dafür geeigneten Housekeeping-Genen sollte für jedes Organ separat erfolgen. Für humanes Prostata- und Harnblasengewebe wurde die Thematik der Housekeeping-Gene bisher nur unzureichend untersucht. Zu diesem Ausgangspunkt meiner Arbeit werde ich in den folgenden Abschnitten Stellung beziehen und daraus die Zielsetzungen der Arbeit ableiten.

In der hier vorgestellten Arbeit sollen Referenzgene, die in der Literatur bereits Verwendung fanden und auch für andere Organsysteme genutzt wurden, für die Anwendung als Normalisierungsgrößen für Prostata- und Harnblasengewebe untersucht werden. Entscheidend hierbei sind sowohl die Expressionshöhen in beiden Geweben als auch der Beweis, dass die Expressionen sich nicht im nichtmalignen und malignen Prostata- und Harnblasengewebe unterscheiden. Erst dann ist ihr korrekter Einsatz für nachfolgende Studien auf mRNA-Ebene zur Entstehung, Diagnostik oder Therapiekontrolle des Prostata- und Harnblasenkarzinoms möglich.

Im Folgenden werde ich die beiden Krebsleiden, auf die sich die Arbeit bezieht, kurz darstellen. Anschließend werde ich zu den Verfahren der RT-PCR-Quantifizierung und zum Problem der endogenen Referenzgene eine kurze Übersicht zum Stand der Forschung geben. Daraus resultieren zahlreiche offene Fragestellungen, die bisher für das Prostata- und Harnblasenkarzinom hinsichtlich valider Genexpressionsdaten ungelöst sind. Auf dieser Basis habe ich dann die Aufgaben abgeleitet, die in dieser Arbeit zu lösen waren.

## 1.2 Theoretischer Teil

### 1.2.1 Das Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom ist mit 11 510 (2003, Statistisches Bundesamt, BRD) jährlichen Todesfällen die zweithäufigste maligne Erkrankung des Mannes in der Bundesrepublik Deutschland. In den Industriestaaten steht es in den tumorbedingten Todesursachen ebenfalls an zweiter Stelle. Die Inzidenz des Prostatakarzinoms nimmt in den letzten Jahrzehnten zu, so dass in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 2003 über 40 000 Neuerkrankungen verzeichnet wurden. Das liegt zum einen daran, dass in den letzten Jahren eine bessere Diagnostik für die Erkrankung von Tumoren im frühen Stadium zur Verfügung steht und zum anderen, dass die Anzahl der Männer im besonders gefährdeten höheren Lebensalter angestiegen ist. Dennoch belegen Obduktionsdaten, dass bei über 50-jährigen mit 40 % und bei über 80-jährigen mit 55 % klinisch inapparente Prostatakarzinome nachgewiesen werden. Der Altersgipfel der Erkrankung liegt im 60. Lebensdezennium. Die Sterblichkeitsrate für das Prostatakarzinom ist rückläufig, was höchstwahrscheinlich sowohl durch die Frühdiagnose als auch durch verbesserte Therapieregime zu erklären ist.

Histologisch handelt es sich in 95 % der Fälle um Adenokarzinome. Die Einteilung erfolgt in vier Stadien nach der internationalen TNM-Klassifikation und zusätzlich nach dem Punktesystem des amerikanischen Pathologen D. F. Gleason (Gleason-Score) [1].

In der Prostata sind die Karzinome zu 70 % im peripheren Drüsenepithel lokalisiert. Seltener entstehen sie im sogenannten Übergangsbereich. Wichtig ist die klinische Unterscheidung zwischen bösartigem Prostatakarzinom und gutartiger Prostatahyperplasie, die ähnliche Symptome (z. B. Miktionsbeschwerden) zeigen können.

Für Männer ab dem 45. Lebensjahr sieht das gesetzlich verankerte Krebsfrüherkennungsprogramm eine Vorsorgeuntersuchung zur frühzeitigen Diagnose des Prostatakarzinoms vor. Mit der Inspektion des äußeren Genitale, der Palpation von regionären Lymphknoten, der digitalen Untersuchung des Rektums und damit auch dem hinteren Teil der Prostata sollen Krebserkrankungen im kurablen Stadium erkannt werden. Die beste diagnostische Maßnahme zur Früherkennung

des Prostatakarzinoms ist jedoch die Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA) im Serum. Trotz gegenwärtiger Kritik an diesem Analyt, dass dadurch eine „Überdiagnose“ und „Übertherapie“ verursacht werden kann, gibt es zur PSA-Bestimmung mit den darauf beruhenden Parametern, wie PSA-Dichte, PSA-Anstiegsgeschwindigkeit sowie dem Quotienten von freiem-PSA zum Gesamt-PSA derzeit keine Alternative [2].

Die gewählte Therapie des Prostatakarzinoms ist abhängig vom Krankheitsstadium. So werden Patienten mit lokal begrenzten Tumoren (T1-2, N0, M0) einer radikalen Prostatektomie (verschiedene Operationsmethoden möglich) unterzogen oder mit hochdosierter Strahlentherapie kurativ versorgt. Die fortgeschrittenen Prostatakarzinome (T3-4, N0, M0) werden unter palliativer Zielsetzung zur Verlängerung der Lebenszeit hormonell behandelt. Die Orchiektomie als Hormonentzug und/oder die Gabe von Hormonpräparaten (Antiandrogene, Östrogene, LH-RH-Agonisten) beeinflussen das hormonabhängige Wachstum des Prostatakarzinoms negativ. Hormonunabhängige Prostatakarzinome werden sekundären Chemotherapien (Estramustin, Docetaxel, Prednison) zugeführt. Bei Fällen mit bekannten Knochenmetastasen und –schmerzen ist die Analgesie das Mittel der Wahl, gefolgt von lokaler Strahlentherapie. Neuerdings werden dafür auch Bisphosphonate eingesetzt.

Die Ätiologie des Prostatakarzinoms ist nicht eindeutig geklärt. Es wird diskutiert, dass endokrinologische sowie Ernährungsfaktoren und genetische Dispositionen zur Entstehung des Prostatakarzinoms beitragen. Über zahlreiche veränderte Expressionen von Genen, sowohl verminderte als auch erhöhte, ist berichtet worden. So ist die Matrix-Metalloproteinase 2 (*MMP2*) an der Tumordinvasion beteiligt und zeigt erhöhte Expressionen im Prostatakarzinomgewebe [3]. *MMP9* und *MMP3* zeigen signifikante Unterschiede im Karzinomgewebe im Vergleich zu Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (BPH) [4,5]. Für Kallikrein 14 (*KLK14*) wurde eine erhöhte Expression im Prostatakarzinomgewebe gefunden [6]. Das Gen mit der größten bisher nachgewiesenen Spezifität für Prostatagewebe ist *PCA3*. Für *PCA3* konnten enorme Genexpressionsunterschiede zwischen gesundem und malignem Prostatagewebe nachgewiesen werden [7-9].

Diese Genexpressionsunterschiede könnten diagnostische, aber auch prognostische und therapeutische Bedeutung besitzen [9-11]. Aus diesem Grund ist die Kenntnis über die Expression von Genen von besonderem Interesse und hat entscheidende Bedeutung für die Entwicklung zukünftiger Therapiestrategien.

### 1.2.2 Das Harnblasenkarzinom

Das Harnblasenkarzinom ist nach dem Prostatakarzinom der zweithäufigste urologische Tumor. Jährlich erkranken in der Bundesrepublik Deutschland ca. 15 000 Menschen und etwa 4 000 Menschen sterben an diesem Leiden. Weltweit starben nach Schätzungen der WHO im Jahr 2000 132 432 Menschen an den Folgen eines Harnblasenkarzinoms [12]. Das entspricht etwa 3,5 % aller Krebstodesfälle. Der Inzidenzgipfel liegt im sechsten bis siebenten Lebensjahrzehnt, wobei Männer bis zu dreimal häufiger erkranken als Frauen.

Die Stadien des Harnblasenkarzinoms werden nach den Vorschlägen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) eingeteilt.

Die Therapie des Karzinoms erfolgt in Abhängigkeit von der individuellen pathologischen Klassifizierung des Tumors hinsichtlich des pathologischen Stadiums und des morphologischen Differenzierungsgrades. Histologisch lassen sich in 95 % der Fälle Urothelkarzinome mit papillärem Wachstumsmuster nachweisen. Bei der Initialvorstellung des Patienten werden 70 % als superfizielle (Mukosa-, Lamina-propria-Infiltration) und 30 % als muskelinvasive Tumoren beschrieben. Patienten mit oberflächlichen Tumoren (Ta, T1, Tis) und Tumorgraden G1 und G2 haben eine gute Prognose. Sie werden einer transurethralen Resektion unterzogen. 60 - 80 % der Patienten entwickeln jedoch, abhängig vom Tumorstadium und Tumorgrad, einen Rezidivtumor. Die Harnblase sollte dann lokal mit einem Chemotherapeutikum behandelt werden. Der aggressivere T1-G3-Tumor wird entweder durch radikale Zystektomie oder mittels Immuntherapie behandelt. Bei muskelinvasiven Tumoren (T2) ist die Standardbehandlung die radikale Zystektomie. Beim fortgeschrittenen und metastasierten Urothelkarzinom (T3, T4) sind die Therapieoptionen jedoch sehr begrenzt und die Heilungschancen äußerst gering. Die Entwicklung neuer Verfahren auf molekularbiologischer Ebene, wie die Gentherapie oder die Erforschung spezifischer Antikörper, wird

daher immer mehr an Bedeutung gewinnen. Erste Ansätze in dieser Richtung sind vielversprechend [13,14].

Zur Ätiologie des Harnblasenkarzinoms gibt es zahlreiche Erkenntnisse, die vor allem aus Beobachtungen und epidemiologischen Studien resultieren. So sind unter anderem industrielle Karzinogene (aromatische Amine), Genussmittelkarzinogene (Rauchinhaltsstoffe), genetische Faktoren, Bilharziose und chronische Entzündungen bekannte Risikofaktoren. Die genauen molekularpathologischen Entstehungsmechanismen sind jedoch größtenteils ungeklärt.

Bisher ist die Zystoskopie und die Urinzytologie der „goldene Standard“ in der Diagnostik des Harnblasenkarzinoms [15]. Durch die Grundlagenforschung zur Karzinogenese des Harnblasenkarzinoms wurden einige neue Marker eingeführt. Konzentrationsunterschiede von *MMP9*, *MMP2*, Blasentumorantigen (*BTA*), *Cytokeratin20* und *Survivin* konnten in Urinproben zwischen Patienten mit und ohne Harnblasenkarzinom beobachtet werden [16-23]. Auf Grundlage dieser Expressionsunterschiede werden verschiedene Testsysteme für Urinproben entwickelt, die die Diagnostik des Harnblasenkarzinoms verbessern sollen.

### 1.2.3 Expressionsanalysen mit Hilfe der RT-PCR

Die quantitative Echtzeit-RT-PCR (qRT-PCR), die entsprechend dem englischen Begriff auch als „real-time-RT-PCR“ bezeichnet wird, ist eine aussagekräftige, mit hoher Präzision arbeitende Methode zur Quantifizierung von Genexpressionen. Sie dient der Untersuchung der Genregulierung und spielt damit eine große Rolle beim Verständnis molekularbiologischer Prozesse. Die Analytik beruht darauf, dass die aus dem Gewebe isolierte RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in eine copy-DNA-Sequenz (cDNA) umgeschrieben wird. Die cDNA wird während der PCR vervielfacht (amplifiziert) und gemessen. Sowohl die RNA als Ausgangsmaterial der RT-PCR als auch methodische Besonderheiten der quantitativen real-time PCR sowie Methoden der Expressionsdatenauswertung werden in meiner Arbeit als wichtige Einzelpunkte besprochen.

### 1.2.3.1 RNA-Isolierung

Eine Vorbedingung für zuverlässige Expressionsanalysen ist eine intakte RNA. Das präparative Vorgehen bei der Gewinnung des Gewebes sowie dessen Lagerung bis zur eigentlichen Analytik sind entscheidende und kritische Einflussfaktoren für die RNA-Stabilität und –Integrität [24]. In der Literatur wurde diese Tatsache bisher für Prostata- und Harnblasengewebe nur unzureichend beachtet. Schwierigkeiten bei der Isolierung einer stabilen nicht-degradierten RNA bereiten die ubiquitär vorkommenden Ribonukleasen, welche zu einer Degradation der RNAs führen. Um diese störenden Effekte zu verhindern, müssen bereits bei der Gewebegewinnung geeignete Schutzmaßnahmen für die RNA getroffen werden, um das Genexpressionsmuster zu erhalten. Der Einsatz von Reagenzien (z. B. RNAlater Stabilization Reagent, Fa. Qiagen GmbH, Hilden; RNAlater<sup>®</sup>, Fa. Ambion, Huntingdon, UK), die die RNA sofort nach der Gewebeentnahme stabilisieren, sind daher zwingend notwendig. Die sich anschließenden Analyseverfahren zur RNA-Konzentrations- und Integritätsbestimmung (NanoDrop<sup>®</sup>-Spektrophotometer, Agilent-2100-Bioanalyzer<sup>®</sup>) weisen inzwischen eine außerordentliche hohe analytische Sensitivität auf. Diese ermöglichen, dass bereits geringe RNA-Verunreinigungen bzw. RNA-Integritätsverluste nachweisbar werden.

Der Agilent-2100-Bioanalyzer ist ein Mikrofluid-Analysengerät der sogenannten Lab-on-a-Chip-Technologie das u. a. die Ermittlung der Integrität isolierter RNA-Proben ermöglicht. Auf einem 12-Well-Nano-LabChip wird nach dem Prinzip der Kapillarelektrophorese isolierte Gesamt-RNA in ihre Fragmente der Größe nach getrennt. Über eine spezielle Software wird das resultierende Elektropherogramm sowohl zur Konzentrationsbestimmung als auch zur Einschätzung der Integrität der isolierten RNA herangezogen. Als Kriterien der Integrität dienen der berechnete 28S/18S-rRNA-Quotient (intakte Eukaryonten-ribosomale RNA erreicht einen maximalen Quotienten von 2,0) sowie die RNA Integrity Number (RIN; intakte RNA erreicht maximal einen Wert von 10,0). Für alle weiteren Versuche kann auf der Grundlage dieser RNA-Integritätsmerkmale ausschließlich mit RNA-Proben höchster Qualität weiter gearbeitet werden.

### 1.2.3.2 Echtzeit-RT-PCR-Analytik

Im nächsten Arbeitsschritt erfolgt die reverse Transkription der selektierten intakten Gesamt-RNA-Proben, d. h. die Synthese von cDNA. Auch hier gibt es inzwischen mehrere kommerzielle Transkriptionskits (z. B. Fa. Qiagen GmbH, Hilden, Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), die jedoch für die Prostata- und Harnblasen-RNA bisher nicht getestet wurden. Erst danach kann die Quantifizierung der Genexpression mittels Echtzeit-RT-PCR erfolgen. Mit dem LightCycler<sup>®</sup>-Instrument wurde im Jahr 1997 erstmals die fluoreszenzgestützte Echtzeit-Messung von PCR-Amplifikaten eingeführt [25]. Inzwischen stehen hierfür verschiedene Geräte zur Verfügung (z. B. LightCycler<sup>®</sup>, Fa. Roche; ABI-Prism-7700, Fa. Perkin-Elmer/Applied Biosystems, Foster City, Ca, USA; iCycler, Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Innerhalb sehr kurzer Zeit hat sich dieses Verfahren für Gen-Expressionsstudien in den verschiedensten Geweben bewährt. Die zeitaufwendige Blockcycler-PCR mit anschließender Agarose-Gel-elektrophorese und densitometrischer Gelauswertung zur Produktquantifizierung wurde damit abgelöst. Zusammen mit einer neuen RNA-Isolierungstechnologie durch RNA-Bindungen an eine Silikagel-Membran einer Mikrozentrifugationssäule bietet diese Methodik eine optimale Möglichkeit, quantitative RNA-Analysen aus geringsten Probenmengen vorzunehmen.

Für die RT-PCR Analytik am LightCycler<sup>®</sup> sind für meine Arbeiten verschiedene Voruntersuchungen bzw. Methodenadaptationen erforderlich gewesen. Die Auswahl der verwendeten genspezifischen Primer erfolgte nach einer intensiven Medline-Recherche (Tabelle 3 und Tabelle 4, Seite 14 f.). Teilweise konnten auch kommerziell erhältliche Housekeeping-Gene-Selection-Sets (Fa. Roche) eingesetzt werden.

### 1.2.3.3 RT-PCR-Quantifizierungsmethoden

Zwei grundlegende Quantifizierungsstrategien der Genexpression finden in der Auswertung von Echtzeit-RT-PCR-Daten Anwendung. Man unterscheidet zwischen der absoluten und der relativen Quantifizierung, wobei jede für sich Vor- und Nachteile aufweist.

Bei der absoluten Quantifizierung wird die Konzentration eines Zielgens in einem absolut gemessenen Zahlenwert ausgedrückt. Hierbei wird aus einer

externen Standardprobe, meist einer Plasmid-DNA, die Zielsequenzen enthält, eine Verdünnungsreihe hergestellt. Entsprechend der eingesetzten Standardmenge wird nach der Amplifikation über die  $C_T$ -Werte (siehe Kapitel 2.4.4) eine Eichkurve erstellt. Über den  $C_T$ -Wert der unbekannt Probe wird die DNA-Ausgangsmenge aus der externen Standardkurve berechnet und als absoluter Wert mit einer definierten Einheit (Kopienzahl,  $\mu\text{g}$ , Anzahl/ $\mu\text{l}$ ) angegeben. Nachteile dieser Methode sind jedoch, dass Effizienzunterschiede, wie sie sowohl während der reversen Transkription als auch in der PCR zwischen externen Standards und unbekannter Proben-DNA bestehen, nicht berücksichtigt werden. Probeninhomogenitäten zwischen Proben der Standardkurve und der Patienten-cDNA, die sich auch aus z. B. unterschiedlicher Präanalytik ergeben, finden ebenfalls keine Beachtung. Zum Ausgleich solcher Messfehler dient die relative Quantifizierung, die im Folgenden beschrieben wird.

Bei der relativen Quantifizierung kann über ein endogenes Referenzgen die Quantifizierung eines Zielgens in der gleichen cDNA-Probe erfolgen. Die Bedingung hierfür ist ein stabil exprimiertes Referenzgen. Dies wird im nächsten Kapitel „1.2.3.4 Referenzgene und ihre Identifikation“ weiter ausgeführt. Ferner wird für die relative Quantifizierung vorausgesetzt, dass die PCR-Effizienzen der Standards denen der Proben entsprechen.

Die Menge eines Zielgens als auch die eines Referenzgens wird über cDNA-Verdünnungsreihen ermittelt. Die Genexpressionen des Zielgens kann dann als relative Menge zum Referenzgen ausgedrückt und errechnet werden [26-29]. Damit ergibt sich die folgende Verhältnisgleichung:

$$(1) \quad \text{relative Genexpression} = \frac{\text{Zielgen}}{\text{Referenzgen}}$$

Da oft Effizienzunterschiede zwischen den PCRs der Zielgene und der Referenzgene bestehen, sollten diese bei der Quantifizierung mit berücksichtigt werden [30,31]. Hierzu benötigt man zwei Standardkurven, eine für das Referenzgen und die zweite für das Zielgen. Die Standardkurven für jedes Gen werden über cDNA-Verdünnungsreihen hergestellt. Die Ausgangskonzentration einer unbekannt Probe für das Zielgen wird über die Standardkurve ermittelt. Für das Referenzgen wird ebenfalls die Ausgangskopienzahl in der dazugehörigen Standardkurve bestimmt. Beide Gene werden miteinander in Beziehung gesetzt.



Der gebildete Quotient bleibt als Resultat dimensionslos. Dies bezeichnet man als Effizienz-korrigierte relative Quantifizierung [32].

**Tabelle 1** Beispiel zur relativen Quantifizierung der Genexpression von Zielgenen mittels Referenzgenen

	Gewebe 1	Gewebe 2
Zielgen „x“ [Kopienanzahl, Mittelwert]	$8,74 \times 10^2$	$3,78 \times 10^3$
Referenzgen „y“ [Kopienanzahl, Mittelwert]	$5,83 \times 10^4$	$2,7 \times 10^5$
Relative Genexpression [Zielgen/Referenzgen]	<b>0,015</b>	<b>0,014</b>

Vorteil der relativen Quantifizierung ist, dass Inhomogenitäten im Ausgangsmaterial (z. B. RNA-Qualität) zwischen den Proben korrigiert werden können. Auch die schwer kontrollierbare Effizienz der cDNA-Synthese wird dadurch nivelliert. Aus dem Beispiel der Tabelle 1 wird ersichtlich, dass trotz unterschiedlicher cDNA-Menge im Gewebe 1 und 2 über die Quotientenbildung eine Aussage zur Genexpression des Zielgens „x“ möglich ist. Das Zielgen „x“ ist in beiden Gewebeproben annähernd gleich hoch exprimiert. Die Gewebeproben sind vergleichbar geworden.

Die in Tabelle 1 genannten Gewebe 1 und 2 könnten hierbei für Zellen mit differierendem Stoffwechsel (z. B. unterschiedliche Organe) aber auch für verschiedene Zellzustände gleicher Gewebe (maligne Harnblase vs. nichtmaligne Harnblase) stehen.

Da eine absolute Quantifizierung zur Beantwortung der Frage, welche mRNA-Expressionen z. B. im Tumor im Vergleich zum gesunden Gewebe signifikant verändert sind, nicht unbedingt erforderlich ist, gilt die relative Quantifizierung als die Methode der Wahl für quantitative Expressionsanalysen.

#### 1.2.3.4 Referenzgene und ihre Identifikation

Die im vorherigen Abschnitt 1.2.3.3 geschilderte Berechnung der relativen Quantifizierung benötigt Referenzgene. An diese in der Literatur auch als Housekeeping-Gene, Normalisierungsgene, Bezugsgene, Referenzgene, interne Standards oder endogene Kontrollgene beschriebene Komponenten sind einige Voraussetzungen geknüpft, bevor man sie zur Quantifizierung einsetzen kann. Als Housekeeping-Gene bezeichnet man Gene, die im Transkriptionsprozess der Zelle keiner Regulation unterliegen.

In den Zellen des menschlichen Organismus sind ca. 30 000 Gene vorhanden. Da jedoch in jeder Zelle die Genmenge ungefähr gleich ist, muss die Zelle, um verschiedene Aufgaben zu bewältigen, Gene regulieren. Housekeeping-Gene sind als aktive Gene in der basalen Zellfunktion eingegliedert. In der Vergangenheit wählte man diese Housekeeping-Gene mit grundlegenden Aufgaben für die Zellfunktionen, die Zellentwicklung, die Aufrechterhaltung des Zellstoffwechsels und die Zellstruktur als Bezugspunkte für die Charakterisierung der Expression von Zielgenen. Es galt die Annahme, dass diese Gene in allen Gewebearten konstitutiv exprimiert werden und keiner Regulationen unterliegen.

Dies bedeutet, dass je nach klinischer Fragestellung, z. B. bei Vergleichen von Normal- und Tumorgewebe, von Proben bei behandelten- oder unbehandelten Krankheiten oder von Tumoren verschiedener Stadien (z. B. T1 und T2) gleiche mRNA-Expressionen des jeweiligen Kontrollgens gemessen werden sollten. Diese Unabhängigkeit von genregulatorischen Mechanismen würde es ermöglichen, solche Gene zur Normierung der Expression eines anderen Gens, des sogenannten Zielgens, einzusetzen. In einem solchen Fall spricht man, wie oben bereits erläutert, von einer relativen Quantifizierung mittels endogenen Kontrollgens. Die Tabelle 2 (Seite 11) gibt Auskunft über die in dieser Arbeit verwendeten Gene mit ihren Funktionen und ihrer Genlokalisierung.

**Tabelle 2 Funktionen von Housekeeping-Genen in eukaryontischen Zellen und deren Genlokalisierung**

Symbol	Gen-Name	Stichwörter zur Funktion	Gen-Ort
ACTB	Actin $\beta$	Strukturprotein des Zytoskeletts, mit Aufgaben für Zellbewegung, Struktur und Integrität.	7p15-p12
ALAS1	Delta Aminolevulinate, Synthase 1	Multiple Funktionen u.a.: -Katalysator der Reaktion: Succinyl-CoA + Glycin = 5-Aminolevulinat + CoA + CO <sub>2</sub> -Enzym ist Pyridoxalphosphat-abhängig.	3p21.1
ALB	Albumin	-Trägerprotein für Steroide, Fettsäuren und Thyroidhormonen. -Stabilisator des extrazellulären Volumens.	4q11-q13
B2M	Beta-2 Microglobulin	-In Membranen aller bisher untersuchten Zellen exprimiert. -Beta-Kette des MHC 1 (major histocompatibility complex).	15q21-q22.2
G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	-Kodiert für die Glucose-6-phosphatdehydrogenase -Katalysator der Reaktion: Glucose-6-phosphat $\rightarrow$ Glukose (Glukoneogenese).	Xq28
GAPD	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-Katalysator der reversiblen oxidativen Glyceraldehyd-3-phosphatase in der aeroben Glykolyse.	12p13
HMBS	Hydroxymethylbilane synthase <i>Alias:</i> Porphobilinogen-deaminase (PBGD)	-Drittes Enzym der Häm-Biosynthese: Katalysator der Polymerisation von insgesamt vier Porphobilinogenen zum Tetrapyrrol.	11q23.3
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1	-Funktion in der Wiederverwertung von Purinen: Einführung von Hypoxathin und Guanin in den Nukleotidstoffwechsel.	Xq26.1
K-ALPHA-1	K-ALPHA-1 tubulin, alpha, ubiquitous	-Bestandteil der Mikrotubuli des eukaryonten Zytoskeletts mit Aufgaben an Zellteilung, Formerhaltung, Motilität und Zellpolarität.	12q12-12q14.3
POLR2A	Polymerase (RNA)II (DNA directed) polypeptide A 220kDa <i>Alias:</i> RNA polymerase II (RPOL2)	-Funktion im zellulären Transkriptionsprozess. -Kodiert für die größte Untereinheit der RNA-Polymerase II.	17p13.1
PPIA	Peptidylprolyl isomerase A <i>Alias:</i> Cyclophilin A (CYPA)	-kodiert für ein Mitglied der Familie der Peptidyl-prolyl cis-trans-isomerasen (PPIase). PPIasen katalysieren die Isomerisierung der cis-trans-Konformation und beschleunigen die Faltung der Proteine. -PPIA sind Cyclosporin-Bindeproteine und hemmen die T-Zell-vermittelten Immunantworten.	7p13-p11.2
RPL13A	Ribosomal protein L13a	-Kodiert für ribosomale Proteine, -Katalysator in der Proteinsynthese. -lokalisiert im Zytoplasma.	19q13.3
SDHA	Succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	-Funktion bei der Energiegewinnung des Organismus. -Mitochondrialer Elektronentransport: Träger von Elektronen von FADH zu Coenzym Q (Ubichinon). -Succinat + Ubichinon $\rightarrow$ Fumarat + Ubichinol.	5p15
TBP	TATA box binding protein	-Funktion im zellulären Transkriptionsprozess. -Gen kodiert für TBP (TATA box binding protein) -Polymerasen I, II, III benötigen mehrere Transkriptionsfaktoren (TF; als Initiationskomplexe) bevor sie an die Startstelle der DNA binden. -TBP erkennt AT-reiche Regionen (TATA-Box Promotorregion der DNA) und andere promotorspezifische Sequenzen und bindet sie als erstes.	6q27
UBC	Ubiquitin C	-Involviert in die ATP-abhängige zelluläre Proteindegradation. -Zentrale Rolle in der Regulierung der Zelle durch das proteosomale-proteolytische System.	12q24.31
YWHAZ	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide <i>Alias:</i> Phospholipase A2 (PLA)	-Vermittelt die Signalweiterleitung durch Bindung an phosphoserinhaltige Proteine. -Umwandlung von Phospholipiden zu Arachidonat.	8q23.1

Neuere Experimente belegen jedoch, dass die bisher gewählten ubiquitär vorkommenden Housekeeping-Gene ebenfalls im Zellzyklus reguliert werden können, wie z. B. durch Hypoxie [33], durch Medikamente und durch veränderte pathologische oder experimentelle Zustände [34-39]. Daraus lässt sich schließen, dass Housekeeping-Gene möglicherweise nicht nur die grundlegenden Zellfunktionen ermöglichen, sondern auch in anderen dynamischen Funktionsabläufen der Zelle involviert sind [40,41]. Housekeeping-Gene sind somit nicht zwangsläufig als Referenzgene für relative Genexpressionsanalysen anzusehen. Sie bedürfen der separaten Verifizierung zur Eignung als Referenzgene für das jeweilige Organ und für den zu untersuchenden Zustand.

Die in der Literatur veröffentlichten Angaben zu den Referenzgenen und ihrer Nutzung zur Normierung von Genexpressionen sind daher insgesamt sehr widersprüchlich [42-44]. Ein Teil der unterschiedlichen Angaben resultiert sicherlich daher, dass in den letzten Jahren die technischen Voraussetzungen für die mRNA-Quantifizierung von Genen erheblich verbessert wurden. Dadurch konnte der Erkenntnisstand über das Expressionsverhalten auch von Housekeeping-Genen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen bedeutend erweitert werden. Diese neuen Erkenntnisse werden aber bisher noch unzureichend in den Versuchsplanungen berücksichtigt. So verwundert es nicht, dass z. B. Zielgene mit Housekeeping-Genen normiert wurden, deren konstante Expression im Gewebe nicht explizit nachgewiesen ist bzw. sogar gegenteilig belegt werden konnte. Beispiele sind u. a. die Gene Glycerin-Aldehyd-Phosphatdehydrogenase (*GAPD*),  $\beta_2$ -Mikroglobulin (*B2M*) und  $\beta$ -Actin (*ACTB*) [33,42,43,45-48]. Gleichzeitig fehlen aber auch detaillierte Untersuchungen für einzelne Organe. Für weniger sensitive Methoden wie dem Northern-Blot könnten die gängigen Normierungsgene (*GAPD*, *ACTB*) durchaus berechtigt sein. Bei der Quantifizierung der mRNA-Expression mittels quantitativer Echtzeit-RT-PCR ist es jedoch notwendig, ein für die spezifischen experimentellen Bedingungen geeignetes Kontrollgen zu finden [45,49].

Referenzgene sollten folgende Eigenschaften besitzen:

- Sie sollten ohne Beeinflussung durch das experimentelle Studiendesign konstant und stabil exprimiert werden [28].
- Zielgene und Referenzgene sollten ähnliche Expressionshöhen besitzen [28,46,50].
- Referenzgene sollten keine veränderten funktionellen Kopien besitzen (Pseudogene) [28,50-52].

Es gibt eine Reihe von Autoren, die sich mit dem Thema der Normalisierung bei Genexpressionsanalysen und quantitativer RT-PCR auseinandergesetzt haben [42,47,48,53-55]. Verschiedene Lösungswege, verbunden mit unterschiedlichen Computerprogrammen, wurden empfohlen.

Die Berechnungsverfahren und -programme von Pfaffl et al. [56], Vandesompele et al. [50], Andersen et al. [57] und Haller et al. [58] sollen in dieser Arbeit verwendet werden. Die beiden erstgenannten Autoren beschreiben, dass ihre Programme aus einer Gruppe von untersuchten Referenzgenen stabile von weniger stabilen Referenzgenen mathematisch selektieren können. Sie zeigten dies anhand von Experimenten am Corpus Luteus von Kühen (Pfaffl et al. [56]) und humanen Knochenmark- und Neuroblastomzellen (Vandesompele et al. [50]). Andersen et al. [57] hingegen untersuchten achtzehn Referenzgene in 28 humanen Harnblasenkarzinomproben. Diese Arbeitsgruppe bietet ein interessantes Verfahren zur Normierung der Genexpression von Housekeeping-Genen mit Hilfe des Programms NormFinder an. Die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe sind jedoch keineswegs eindeutig und geben Anlass zur fehlerhaften Interpretation, da ein Paarvergleich von gesundem und bösartigem Harnblasengewebe vom selben Patienten nicht erfolgte. Ein neues Programm von Haller et al. [58], das ebenfalls stabile Referenzgene zu identifizieren vorgibt, soll in dieser Arbeit zusätzlich zur Eignungstestung der Referenzgene herangezogen werden. Weitere mögliche Analyseverfahren stehen zur Auswahl [59-62]. Die dargestellten Methoden belegen, dass zahlreiche Verfahren, Referenzgene zu identifizieren, existieren.

Im Vordergrund der von mir geplanten Studie steht der Vergleich von Genexpressionen im Tumor- und Normalgewebe. Arbeiten für die humane Prostata und Harnblase, die eine größere Anzahl von Referenzgenen vergleichend für die Echtzeit-RT-PCR auswertet und über verschiedene Prüfverfahren analysiert, existieren bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht.

### 1.3 Literaturrecherche zu Referenzgenen beim Prostata- und Harnblasenkarzinom

Experimente mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-PCR sind in den letzten Jahren vielfältig durchgeführt worden, weil mit ihr unter anderem Genexpressionsunterschiede aus geringem Probenausgangsmaterial detektiert werden können. Seit 1996 ist damit die Anwendung der Echtzeit-PCR-Technik fast exponentiell gestiegen. Derzeit können 75 897 Einträge in der Medline/PubMed-National Library of Medicine [63] gezählt werden.

Für Expressionsstudien zum Prostatakarzinom konnten in der PubMed-Bibliothek 120 Einträge gezählt werden (Stand Juli 2005; MeSH-Termini: „prostatic neoplasm, gene expression, RT-PCR“). Die Online verfügbaren und relevanten 56 Arbeiten, publiziert zwischen August 2003 und Juli 2005, wurden nach ihrer Verwendung von Referenzgenen zur Normalisierung von Genexpressionen ausgewertet (Tabelle 3). Dabei wurde festgestellt, dass neun unterschiedliche Gene zur Normalisierung eingesetzt wurden.

**Tabelle 3** Medline-Recherche: Nutzung von Referenzgenen bei Genexpressionsstudien des Prostatakarzinoms\*

Referenzgen-Symbol	Anzahl der Nennung	%
<i>ACTB</i>	20	36
<i>GAPD</i>	15	27
<i>18S-ribosomal RNA</i>	10	17
<i>TBP</i>	4	7
<i>HPRT1</i>	2	3,5
<i>β-Tubulin</i>	2	3,5
<i>RPL13A</i>	1	1,7
<i>HMBS</i>	1	1,7
<i>PPIA</i>	1	1,7

\* Auswertung von 56 Arbeiten zwischen 08/2003 - 07/2005

Für Genexpressionsanalysen, die das Organ Harnblase betreffen, konnten 710 Einträge gezählt werden (Stand Juli 2005; MeSH Termini: „bladder neoplasm, gene expression“). Eine weitere Verfeinerung mit dem MeSH-Terminus „RT-PCR“ lieferte 130 Einträge. Von diesen konnten 64 Arbeiten, die über das Internet zugänglich waren und in der Zeit von September 1998 bis Juli 2005 publiziert wurden, näher analysiert werden (Tabelle 4, nächste Seite).

Auch für die Harnblase wurden neun unterschiedliche Gene für Normalisierungszwecke in der Literatur herangezogen.

**Tabelle 4** Medline-Recherche: Nutzung von Referenzgenen bei Genexpressionsstudien des Harnblasenkarzinoms\*

Referenzgen-Symbol	Anzahl der Nennung	%
<i>GAPD</i>	23	36
<i>ACTB</i>	22	34
<i>18S-ribosomal RNA</i>	7	11
<i>β2Mikroglobulin</i>	5	8
<i>TBP</i>	3	5
<i>PPIA</i>	2	3
<i>HMBS</i>	1	1,5
<i>TBP and GAPD</i>	1	1,5

\* Auswertung von 64 Arbeiten zwischen 09/1998-Juli/2005

Die durchgeführten Datenbankrecherchen und das Literaturstudium zum Thema „relative Quantifizierung“ verdeutlichen drei wesentliche Aspekte:

- a) Es existiert kein einheitlicher Standpunkt zur Verwendung von geeigneten Referenzgenen beim Prostata- und Harnblasenkarzinom.
- b) *ACTB* und *GAPD* werden häufig als Referenzgene für die Normalisierungen beim Prostata- [64-67] und Harnblasenkarzinom [68-71] herangezogen, obwohl bereits über gegensätzliche Erfahrungen zu diesen konventionellen Genen für die Normalisierung berichtet wurde [46].
- c) Bis zum heutigen Zeitpunkt sind keine bedeutenden Studien durchgeführt worden, die Empfehlungen bezüglich spezifischer Normierungsgene für beide Tumoren geben.

#### 1.4 Problemstellung und Zielsetzungen der Arbeit

Genexpressionsanalysen beim Prostata- und Harnblasenkarzinom verfolgen sowohl diagnostische als auch therapeutische Zielstellungen. Diese Analysen ermöglichen die Feststellung, welche Gene eine veränderte Expression unter pathologischen Bedingungen ergeben. Erhöhte, aber auch verminderte, Expressionen können mögliche Indikatoren eines Karzinoms sein. Diese Marker haben oftmals auch prädiktive und prognostische Bedeutung. Da die erhöhte Expression sich meistens nicht nur auf der mRNA-Ebene, sondern auch auf dem Proteinniveau widerspiegelt, ergeben sich auch neue Therapiemöglichkeiten.

Proteine, von denen Inhibitoren bekannt sind bzw. für die Inhibitoren hergestellt werden können, eignen sich als therapeutische Zielstrukturen.

Für quantitative Untersuchungen der Genexpression an urologischen Tumoren werden häufig Housekeeping-Gene als interne Standards angewendet. Bis zum jetzigen Zeitpunkt liegen jedoch keine systematischen Untersuchungen zu evaluierten Normierungsgenen beim Prostata- und Harnblasenkarzinom vor.

Diese kurzen Erläuterungen sollen verdeutlichen, dass die Weiterentwicklung der Diagnostik und Therapie in der Krebsforschung ganz wesentlich auch von zuverlässigen quantitativen Ergebnissen entsprechender Genexpressionsanalysen beeinflusst wird. Das haben moderne Chip-Analysen bereits eindeutig gezeigt [72-75].

Anhand dieser Ausführungen ergaben sich folgende Schlussfolgerungen für die Zielsetzung meiner Arbeit:

1. Untersuchungen zur Genexpression im Gewebe in Relation zu konventionellen histopathologischen Kenngrößen sind Grundvoraussetzungen für die Weiterentwicklung in der Diagnostik und Therapie beim Prostata- und Harnblasenkrebs. Zur relativen Quantifizierung von Expressionsveränderungen werden geeignete Referenzgene benötigt.
2. Die Anwendung innovativer Analyseverfahren, wie die RNA-Integritätsbestimmung mittels Agilent-2100-Bioanalyser und die quantitative Echtzeit-RT-PCR-Technologie mit dem ABI-Prism-7700- und dem LightCycler®-Gerät, sind erforderlich, um die Zuverlässigkeit der Expressionsuntersuchungen zu gewährleisten.
3. Die relative Quantifizierung von Genexpressionen ist z. Zt. aufgrund von sensitiveren Analyseverfahren mit vielen neuen offenen Fragen behaftet. Deshalb bedarf es kritischer Bewertungen von Ergebnissen und intensiver Untersuchungen von verschiedenen Housekeeping-Genen, um sie als Grundlage für die Beurteilung von Genexpressionen im Karzinomgewebe heranziehen zu können.
4. Die Untersuchungen sind nicht nur aus wissenschaftlicher und erkenntnistheoretischer Sicht von Interesse, sondern haben auch weiterführende diagnostische und therapeutische Konsequenzen.



Folgende Zielsetzungen habe ich mir deshalb für diese Arbeit gestellt:

- Genexpressionsanalyse von potentiellen Referenzgenen in humanem Prostata- und Urothelgewebe auf mRNA-Ebene mittels Echtzeit-RT-PCR.
- Anwendung von state-of-the-art-Methoden: Gewebegewinnung mittels moderner Stabilisierungslösungen, neue quantitative und qualitative RNA-Analytik [76].
- Bestimmung der ausgewählten Housekeeping-Gene im malignen und nicht-malignen Prostata- und Harnblasengewebe derselben Patienten.
- Berechnung eventueller Unterschiede der Housekeeping-Gene (Paarvergleich) zwischen den Gewebeproben als Initialschritt zur Festlegung von geeigneten Referenzgenen.
- Prüfung von Computerprogrammen zur Validierung von Referenzgenen [50,56-58].
- Empfehlung eines Housekeeping-Gens bzw. einer Kombination verschiedener Gene zur Normierung für die relative Quantifizierung von Genexpressionen beim Prostata- und Harnblasenkarzinom.
- Berechnung von Korrelationen zwischen der Genexpression in Abhängigkeit von histopathologischen Befunden (Tumorstadium; Differenzierungsgrad).