3 Ergebnisse

3.1 Qualitätssicherung der präanalytischen und analytischen Studienphasen

Um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten, sind Maßnahmen zur Sicherung der Qualität bei der Durchführung von Genexpressionsstudien sehr wichtig. Dazu gehörte unter anderem, dass alle Pipetten (Fa. Eppendorf AG, Hamburg) und technischen Geräte laufend gepflegt, überprüft und gewartet wurden. Richtigkeits- und Präzisionskontrollen der benutzten Pipetten habe ich persönlich durchgeführt. Die weiteren Maßnahmen der Qualitätssicherung der Experimente sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

3.1.1 Charakterisierung der isolierten RNA-Proben

Alle RNA-Proben wurden auf ihre Konzentration, Reinheit und Integrität hin untersucht. Basierend auf dem Absorptionsquotienten 260 nm zu 280 nm ergab sich bei den RNA-Proben aus Prostatagewebe ein Mittelwert $\pm$ SD von $2{,}00 \pm 0{,}05$. Für die RNA-Proben aus dem Harnblasengewebe betrug der gemittelte Absorptionskoeffizient $2{,}04 \pm 0{,}02$. Alle RNA-Proben waren rein und zeigten weder Lösungsmittel- noch Proteinenverunreinigungen.

Nachfolgend wurde die Integrität der RNA mit den Agilent-2100-Bioanalyzer über die RIN-Werte bestimmt. In Abbildung 7 und Abbildung 8 (Seite 52 f.) sind RNA-Proben mit unterschiedlicher Integrität dargestellt.

Die Abbildung 7 zeigt dazu an einem Schema (A) die Regionen des Elektropherogramms, die für die Ermittlung der RIN-Werte geräteintern über die Agilent Expert-Software herangezogen werden. Typische Bilder unterschiedlicher Integrität von RNA-Proben sind in der Abbildung 7 B, C und D dargestellt.

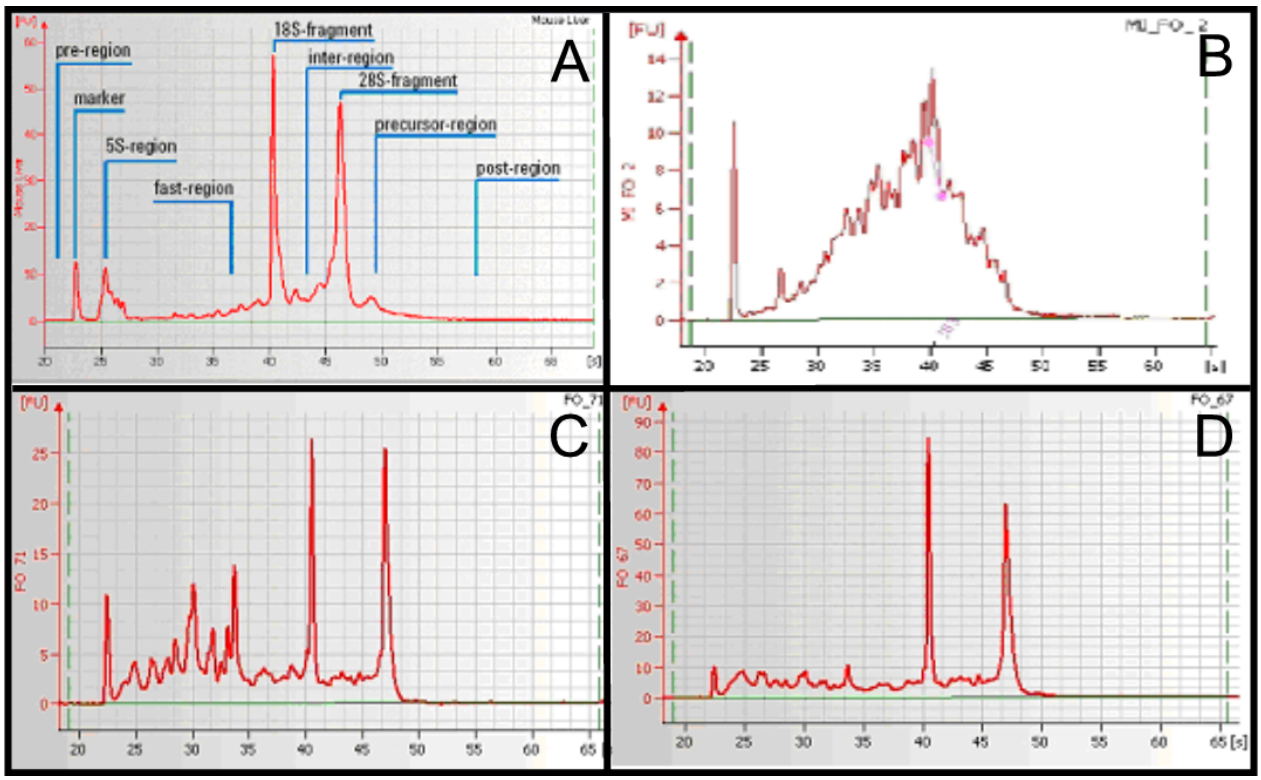

Abbildung 7 Elektropherogramme zur RIN-Klassifikation

Abszissenachse: Zeit in Sekunden, *Ordinatenachse:* Fluoreszenz der Fragmente; **A:** Darstellung kritischer Regionen zur Bestimmung der RNA-Integrität mit Hilfe des RIN-Wertes [80] **B-D:** Darstellung der RNA-Elektropherogramme mit unterschiedlichen Graden der RNA-Integrität, klassifiziert nach dem RIN-Wert $RIN_B = 3$; $RIN_C = 6{,}3$; $RIN_D = 8{,}5$.

In Abbildung 8 A (nächste Seite) sind zu den gerade erwähnten RIN-Werten entsprechende gelähnliche Agilent-Darstellungen wiedergegeben. Die Probe FO-8 weist dabei einen RIN-Wert von 6,1 auf und entspricht damit der elektrophoretischen Auswertung wie sie in Abbildung 7 C gezeigt wird. Die Probe FO-10 verhält sich entsprechend der Abbildung 7 Bild D. Im Gegensatz zur Abbildung 8 A (oberer Chip), in der nicht alle RNA-Proben für weitere Untersuchungen verwendet werden konnten, zeigt die Abbildung 8 B (unterer Chip) RNA-Proben mit RIN-Werten von 6,3 bis 9,0, die aufgrund der akzeptablen Qualität in die weiteren Untersuchungen eingeschlossen wurden.

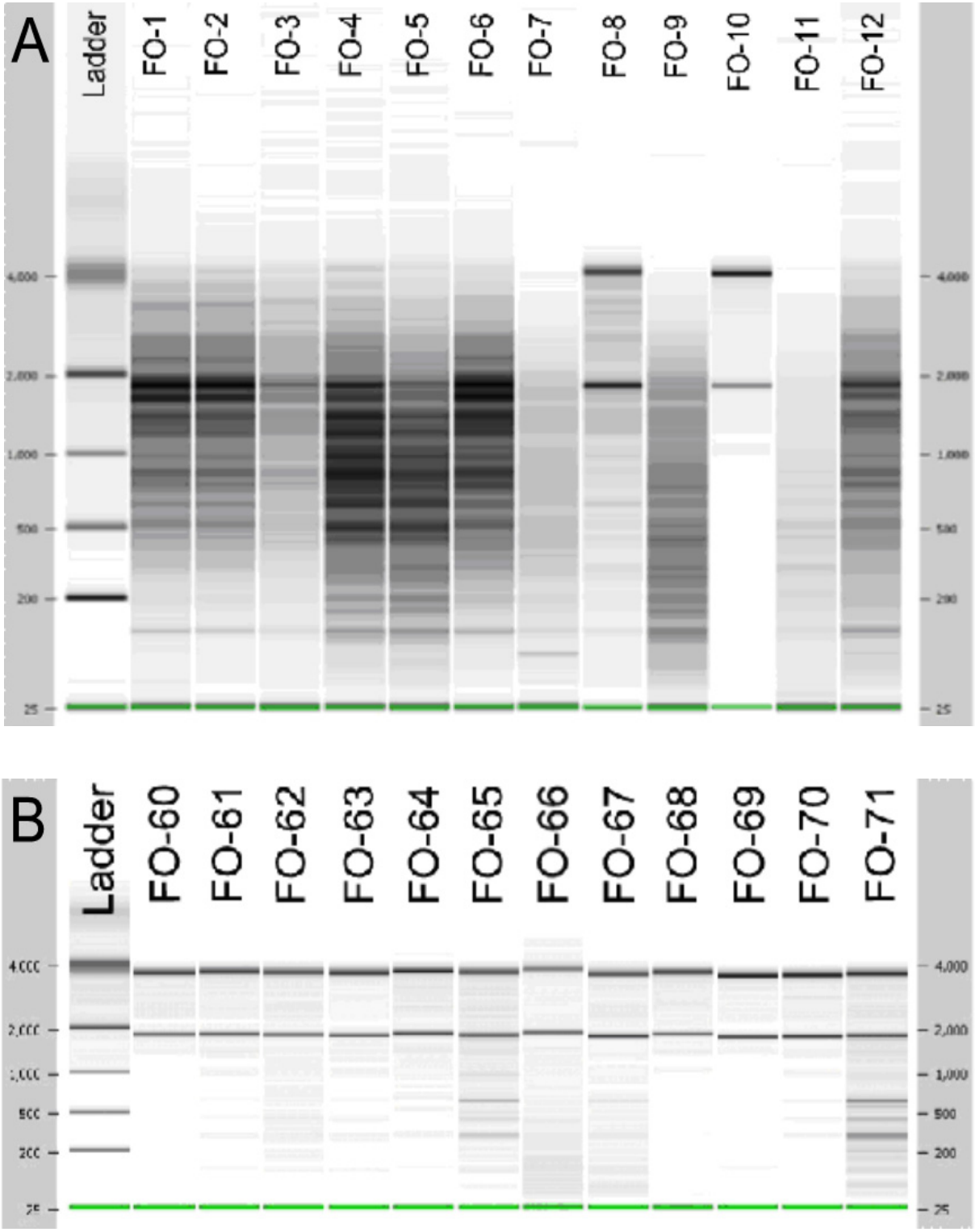

Abbildung 8 Gelähnliche Darstellung des Agilent-2100-Bioanalyzer

Abszissenachse: RNA-Proben; *Ordinatenachse:* Molekulargewichte. **Chip A:** Die RNA-Proben FO-1 bis FO-7 zeigten RIN-Werte < 4 und waren daher nicht für weitere Versuche verwertbar. Lediglich die Proben F0-8 (RIN = 6,1) und FO-10 (RIN = 8,7) waren für Expressionsstudien geeignet **Chip B:** Die RNA-Proben FO-60 bis FO-71 zeigten RIN-Werte von 6,3 bis 9,0; weitere Bewertungen im Text.

Die isolierten RNA-Proben aus den gepaarten malignen Prostataarealen besaßen einen RIN-Wert von $7,9 \pm 0,83$ und aus den nichtmalignen Arealen einen RIN-Wert von $7,8 \pm 0,52$ (Mittelwert $\pm$ SD). Der gepaarte t-Test nach Student zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden RIN-Werten (P = 0,468). Für die Harnblasen lagen die RIN-Mittelwerte der RNA-Proben im malignen Gewebe bei $8,0 \pm 0,67$ und für die Proben aus nichtmalignem Gewebe bei $7,6 \pm 0,79$. Es ergab sich gleichfalls kein signifikanter Unterschied im gepaarten t-Test nach Student (P = 0,097; Abbildung 9).

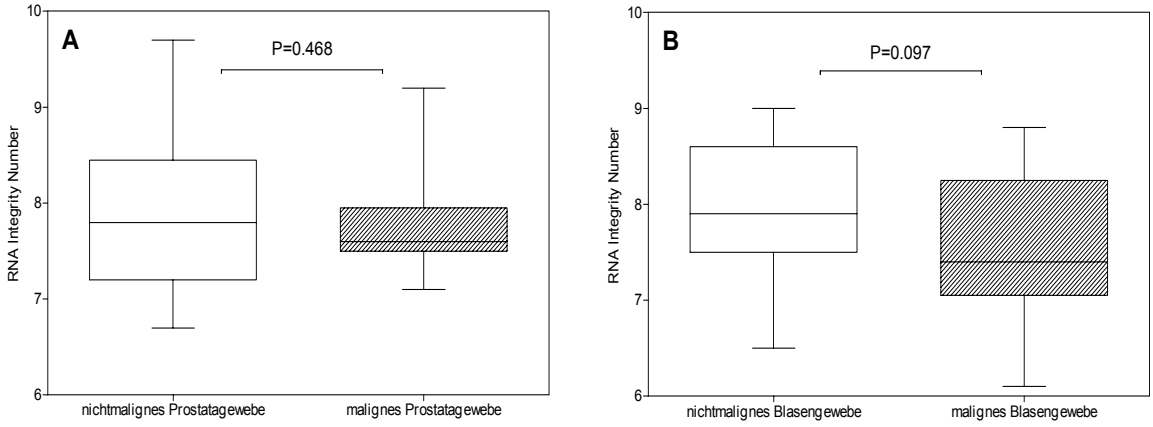

Abbildung 9 RNA integrity Number (RIN) für RNA-Proben der Prostata und Harnblase

Box- und Whisker-Diagramm; die Boxen mit der oberen und unteren Begrenzung stellen die obere und untere Quartile dar, die innere Linie repräsentiert den Median, die Balken verdeutlichen nach oben den höchsten, nach unten den niedrigsten Wert. **A:** RIN-Werte in Gewebeproben der Prostata; **B:** RIN-Werte in Gewebeproben der Harnblase. Die P-Werte wurden mit dem gepaarten t-Test nach Student ermittelt.

3.1.2 Quantifizierung der RNA

Die Richtigkeit und Zuverlässigkeit der RNA-Messungen mit dem in unserer Studie eingesetzten NanoDrop®-ND-1000-Spektrophotometer wurden mit dem konventionellen UV-Spektrophotometer Ultrospec-3000 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) durch Vergleichsmessungen überprüft.

Die Steigung der Regressionsgeraden zwischen den Konzentrationen, die aus Vergleichsbestimmungen derselben RNA-Proben an beiden Photometern resultierten, zeigten keinen Unterschied (Abbildung 10, Seite 55).

Diese Ergebnisse weisen die Übereinstimmung der RNA-Messwerte nach und bestätigen die Richtigkeit der RNA-Bestimmungen mit dem NanoDrop®-Spektrophotometer.

Die Präzision der RNA-Konzentrationsmessungen am NanoDrop®-Gerät habe ich durch Zwölffach-Bestimmungen der RNA von zwei Zelllinien mit hohen und niedrigen Konzentrationen kontrolliert. Die als Variationskoeffizienten angegebene intraserielle Präzision betrug für Proben mit niedriger RNA-Konzentration 0,6 % (92,9 ± 0,56 ng/µl) und für die Proben mit hoher Konzentration 0,34 % (841,6 ± 2,84 ng/µl).

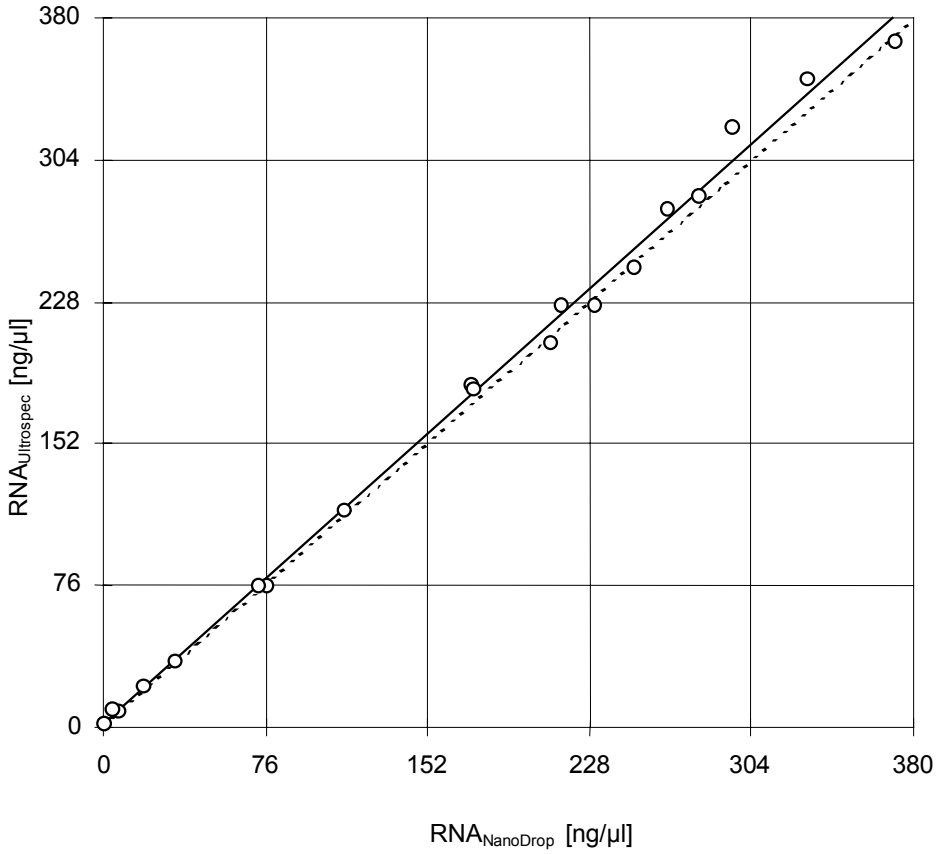

Abbildung 10 Methodenvergleich der RNA-Bestimmungen an zwei Messgeräten

Methodenvergleich UV-Spektrophotometer Ultrospec-3000 (*Ordinatenachse*) – NanoDrop®-ND-1000-Spektrophotometer (*Abszissenachse*). Die Regressionsanalyse nach dem Verfahren von Passing-Bablok [93] ergab die Geradengleichung: $Y_{Konz.Ultrospec} = 1{,}021 * X_{Konz.NanoDrop} + 1{,}99$ ($n = 19$; $r = 0{,}998$).

3.1.3 Nachweis der Spezifität der PCR-Amplifikate

Am ABI-Prism-System war die Spezifität der PCR-Produkte in vorhergehenden Versuchen durch entsprechende Kontrollen bereits nachgewiesen worden [52], so dass keine weiteren Untersuchungen notwendig waren.

Am LightCycler® kann die Spezifität von PCR-Produkten über Schmelztemperaturanalysen erfolgen [94]. Die Schmelztemperaturanalyse sollte bei PCR-Läufen, die mit SYBR Green detektiert werden, generell als Programmschritt aufgenommen werden. Dies ist erforderlich, da bei der SYBR Green-Methode auch unspezifische Produkte bzw. Primer-Dimere ein Fluoreszenzsignal erzeugen [95]. Wird am Ende eines PCR-Laufs die Temperatur kontinuierlich erhöht, so denaturiert mit zunehmender Temperatur die doppelsträngige DNA. Der SYBR Green I-Farbstoff kann an die Einzelstränge nicht mehr binden, was zu einer Fluoreszenzabnahme führt [96]. Im Schmelztemperaturmaximum liegt die Hälfte der DNA doppelsträngig vor. Primer-Dimere und kürzere unspezifische Produkte würden bei niedrigen Schmelztemperaturen zusätzliche Fluoreszenzgipfel zeigen. Ein einziger Fluoreszenzgipfel um den Schmelzpunkt des PCR-Hauptproduktes, der sich aus der negativen ersten Ableitung der stärker werdenden Fluoreszenzabnahme ergibt, ist der Beweis eines sauberen Produktes und einer guten PCR. Die Schmelztemperatur, bei der der Fluoreszenzgipfel erreicht wird, ist eine charakteristische Größe für das Produkt unter diesen Reaktionsbedingungen. In Abbildung 11 (Seite 57) ist dazu als Beispiel die Schmelztemperaturanalyse für das Gen *HMBS* dargestellt. Das einzige Kurvenmaximum (Fluoreszenzgipfel) liegt für das PCR-Amplifikat des *HMBS*-Gens bei einer Schmelztemperatur von 84,96 °C. Dies belegt die Spezifität der PCR für *HMBS.*

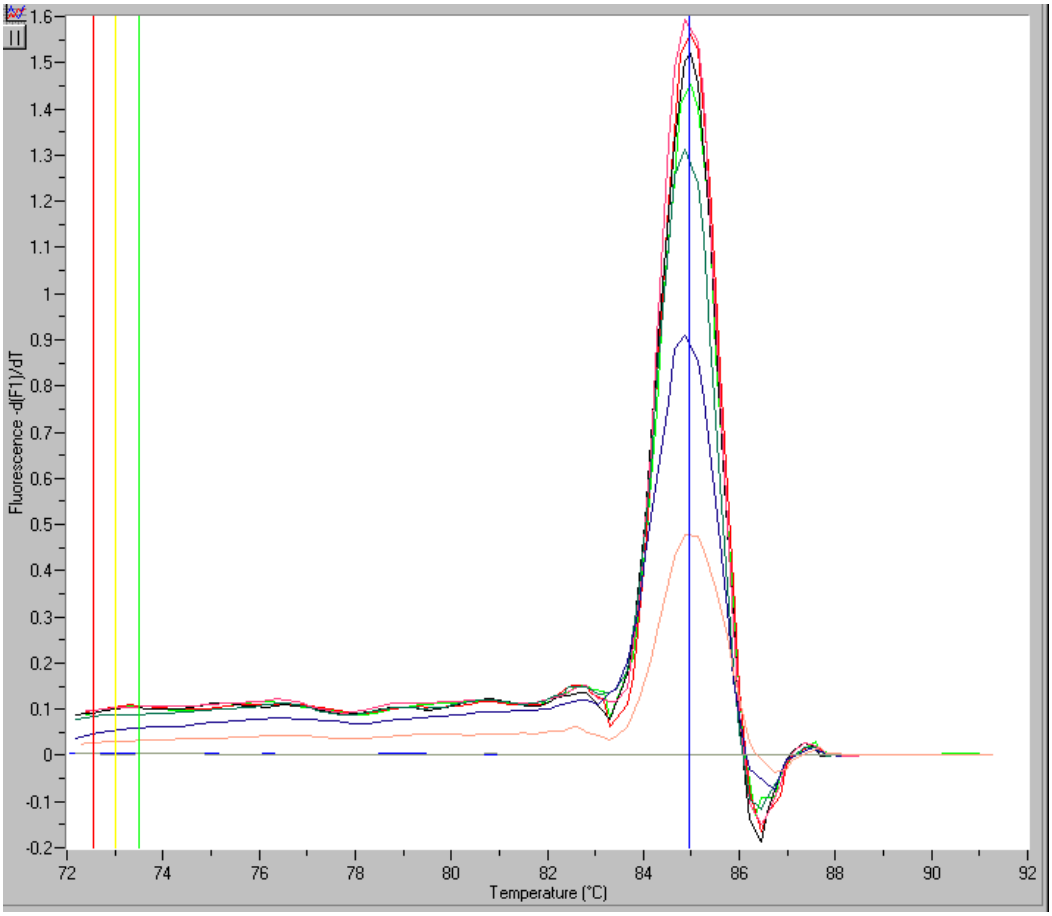

Abbildung 11 PCR-Produktkontrolle für das Gen *HMBS* mit dem LightCycler® durch eine Schmelztemperaturanalyse

Darüber hinaus kann zur Kontrolle der Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese die Produktgröße bzw. über Sequenzanalysen die Nukleotidzusammensetzung überprüft werden. Ich habe alle PCR-Produkte auch mit der Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. In Abbildung 12 und Abbildung 13 (Seite 59 f.) habe ich dazu als Beispiel die Auftrennung neun genspezifischer Amplifikate, die willkürlich aus den PCR-Läufen mit Harnblasenkarzinomen entnommen wurden, dargestellt.

Die über die mitgeführten DNA-Längenstandards und die QuantityOne-Software (Fa. Bio-Rad) ermittelten Molekulargewichte der PCR-Produkte sind für *ACTB* 79 bp (Soll-Amplikongröße 78 bp), *G6PD* 226 bp (Soll: 225 bp), *TBP* 231 bp (Soll: 227), *ALAS1* 132 bp (Soll: 127 bp), *HPRT1* 179 bp (Soll: 181 bp), *GAPD* 225 bp (Soll: 226 bp), *HMBS* 158 bp (Soll: 156 bp) und *K-ALPHA-1* 226 bp (Soll: 232 bp) (Abbildung 12, Seite 23).

Das PCR-Produkt für *SDHA* wies auf dem 2%igen Agarosegel (Abbildung 12) ein Molekulargewicht von 94 bp gegenüber der Sollgröße von 78 bp auf.

Aus diesem Grunde wurde eine erneute Auftrennung in einem 4%igen Agarosegel vorgenommen. Dies ermöglichte eine bessere Auftrennung der DNA im Bereich von < 100 bp. Die Abbildung 13 zeigt, dass mehrere PCR-Amplifikate von *SDHA*-Bestimmungen am LightCycler®, mit 78 - 79 bp der Sollgröße von 78 bp entsprechen.

Insgesamt kann somit geschlussfolgert werden, dass die am LightCycler® amplifizierten Produkte mit den aus der Primerlänge zu erwartenden genspezifischen Nukleotidlängen übereinstimmen. Damit konnte die Spezifität der PCR-Bestimmungen ausreichend belegt werden (vgl. auch Tabelle 7, Seite 33).

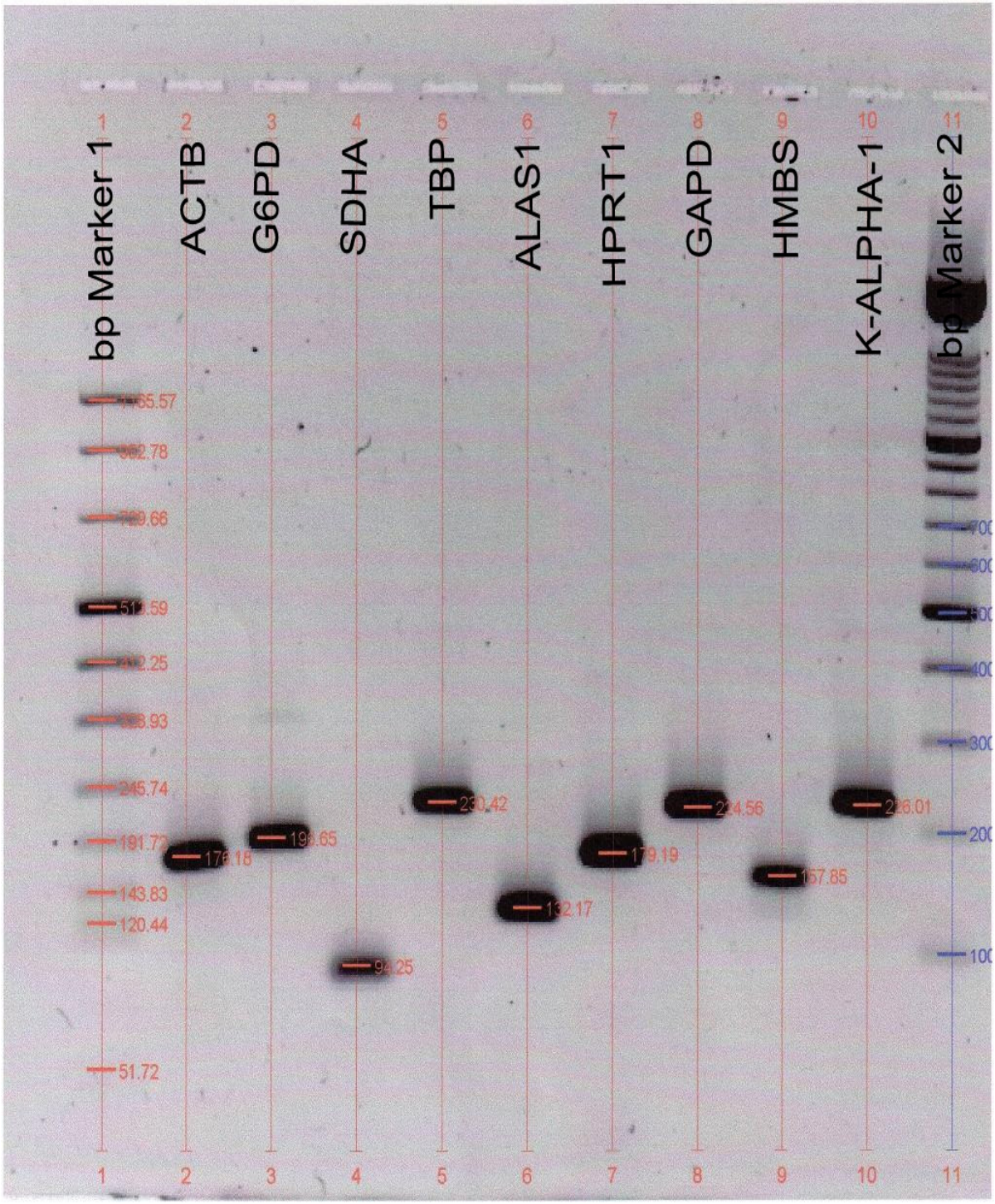

Abbildung 12 Molekulargewichtsbestimmungen der PCR-Produkte an Proben der Harnblase mittels Agarose-Gelelektrophorese (2%iges Agarosegel)

In der Spur 1 und Spur 11 sind zwei verschiedene Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Weitere Bemerkungen im Text.

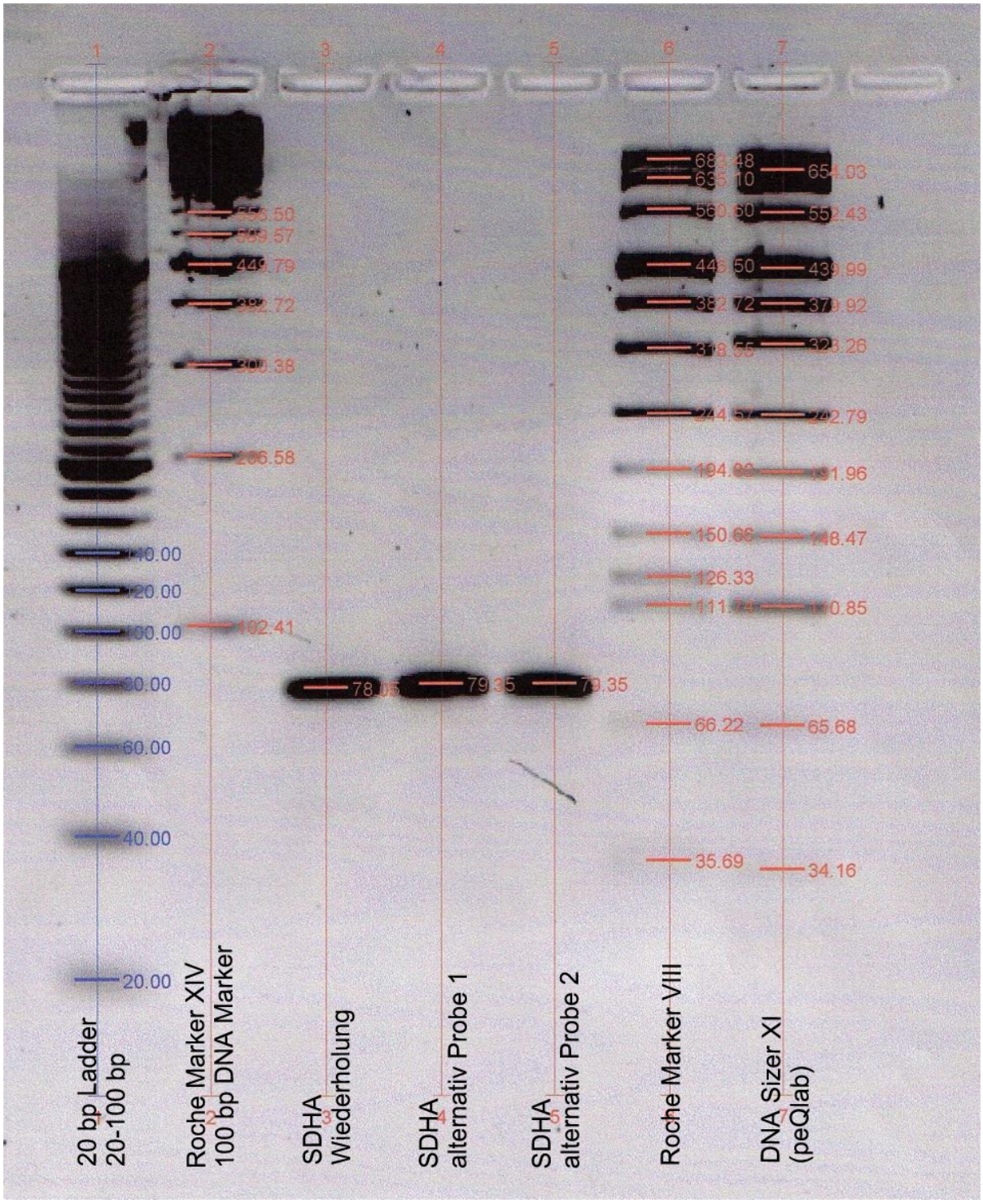

Abbildung 13 Molekulargewichtsbestimmungen der PCR-Produkte für die *SDHA* an verschiedenen Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese (4%iges Agarosegel)

Wiederholung für das Gen *SDHA* mit Molekulargewichtsmarkern (Spur 1, 2, 6, 7), die im Bereich von < 100 bp besser getrennt werden. Weitere Bemerkungen im Text.

3.1.4 Präzisionskontrolle der PCR-Messungen

Die Reproduzierbarkeit der Amplifikationsraten wurde durch die Bestimmung des intraseriellen Variationskoeffizienten an cDNA-Proben hoher und niedriger Konzentrationen für die Gene *GAPD* (n = 10) und *HMBS* (n = 11) ermittelt. Bei *GAPDH* wurden mittlere C_T-Werte von 19,79 und 31,42; bei *HMBS* C_T-Werte von 21,89 und 31,59 erzielt. Die Variationskoeffizienten betrugen 0,41 % und 0,65 % für die *GAPD*-PCR bzw. 0,15 % und 0,59 % für die *HMBS*-PCR. Da alle Messungen der gepaarten Proben grundsätzlich in einer Serie erfolgten, kann von einer sehr guten Reproduzierbarkeit der Messungen am LightCycler® ausgegangen werden.

Die Messungen am ABI-Prism-System waren, wie in der Arbeit von Radonić et al. [52] angegeben, durch einen intraseriellen Variationskoeffizienten von < 1,6 % für alle Bestimmungen gekennzeichnet.

3.2 Identifizierung von Referenzgenen für das Prostatagewebe

3.2.1 Quantifizierung der Genexpression der Housekeeping-Gene im malignen und nichtmalignen Prostatagewebe

In einer der nichtmalignen Gewebeproben wurden bei 5 der untersuchten 16 Gene auffällig hohe Expressionswerte beobachtet. Daraufhin wurde der Ausreißer-Test nach Grubb angewendet, um die Zugehörigkeit dieser Gewebeprobe zur Gesamtheit der anderen nichtmalignen Proben zu testen. Dieser Test beruht auf der Formel:

(13) $$Z = \frac{\text{Mittelwert} - \text{Extremwert}}{\text{SD}}$$

Überschreitet der berechnete Wert „Z“ einen kritischen Betrag, der von der Anzahl der untersuchten Proben abhängt, dann gilt dieser Extremwert als Ausreißer und darf eliminiert werden. Dies war bei einer Gewebeprobe der Fall, so dass die Daten dieses Probepaares aus den weiteren Berechnungen ausgeschlossen wurden.

In den 16 verbliebenen Gewebeproben zeigten die untersuchten 16 Housekeeping-Gene der Prostata einen breiten Bereich hinsichtlich ihrer Genexpressionshöhen. Die C_T-Werte lagen zwischen 16 bis 37 Zyklen (Abbildung 14, Seite 63).

Die Genexpressionen waren zwischen Proben mit pT2- und pT3-Tumoren, zwischen Proben mit verschiedenen Gleason-Graden ≤ 3 und ≥ 4 und zwischen Proben mit einer Gleason-Gesamtpunktzahl < 7 und ≥ 7 nicht signifikant unterschiedlich (t-Test; $P > 0{,}05$). Alle Gene mit Ausnahme von POLR2A waren normalverteilt, was mit dem D'Agostino-Pearson-Omnibus-Test in den malignen und nichtmalignen Gewebeproben nachgewiesen wurde.

Die Genexpressionshöhen wurden in drei willkürlich gewählte Bereiche unterteilt (Abbildung 14). Die malignen und nichtmalignen Proben sind in der Abbildung als separate Box-und-Whisker-Plots dargestellt. Mit relativ hohen Expressionen, charakterisiert durch C_T-Werte unterhalb von 20 Zyklen waren: *ACTB*, *GAPD*, *RPL13A* und *UBC*. Gene mit niedrigen Expressionswerten und C_T-Werten über 28 Zyklen waren: *ALAS1*, *ALB*, *HMBS* und *HPRT1*. Gene mit mittleren Genexpressionen mit C_T-Werten zwischen 20 und 28 Zyklen waren: *B2M*, *G6PD*, *K-ALPHA-1*, *POLR2A*, *PPIA*, *SDHA*, *TBP* und *YWHAZ*.

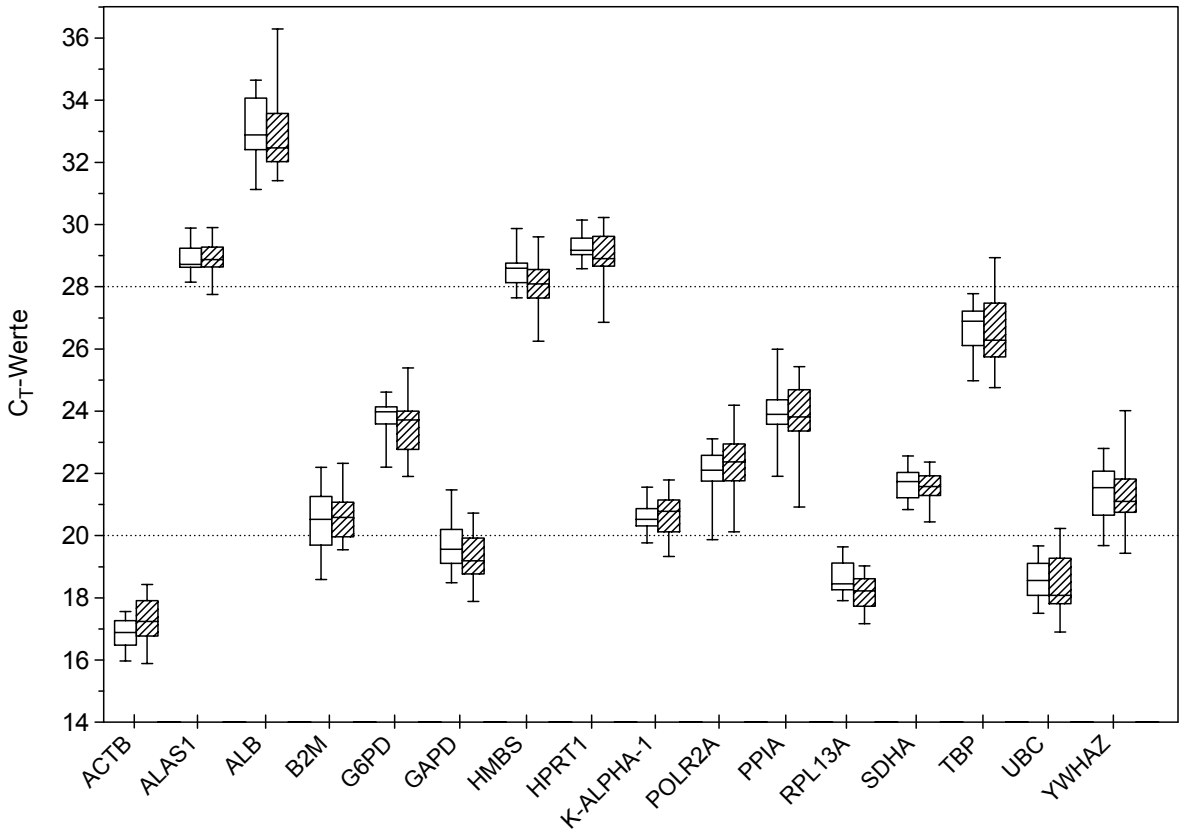

Abbildung 14 Expressionshöhen der Housekeeping-Gene im Gewebe der Prostata

Genexpressionshöhen von Kandidaten-Referenzgenen in 16 gepaarten malignen und nichtmalignen Prostataproben. Die Rechtecke (weiß = nichtmalignes Gewebe; quergestreift = malignes Gewebe) repräsentieren für 16 gepaarte Paaren die 25 %- und 75 %-Quartile mit dem Median als Mittellinie. Die Balken (Whiskers) stellen die Spannweiten der Werte dar. Die *Ordinatenachse* wird durch die gepunkteten Linien bei C_T 20 und 28 in drei willkürlich festgelegte Expressionsbereiche eingeteilt. Weitere Einzelheiten siehe Text.

Die einzelnen Housekeeping-Gene zeigten sehr verschiedene Expressions-Spannweiten. Gene mit einer maximalen Spannweite über etwa 4 bis 5 Zyklen waren *ALB* (Spannweite = 5,16), *PPIA* (Spannweite = 5,07), *YWHAZ* (Spannweite = 4,59) und *TBP* (Spannweite = 4,18). Gene mit einer kleinen Spannweite von ungefähr zwei Zyklen waren *SDHA* (Spannweite = 2,12), *ALAS1* (Spannweite = 2,15) und *K-ALPHA-1* (Spannweite = 2,46).

Mit dem gepaarten t-Test nach Student wurden die Genexpressionen zwischen malignen und nichtmalignen Proben auf eventuell bestehende signifikante Unterschiede geprüft. Gene, die in den Prostatageweben signifikante Unterschiede zeigten, waren das ***ACTB*** (P = 0,010), die ***RPL13A*** (P = 0,013) und das ***HMBS*** (P = 0,009).

Die signifikanten Unterschiede belegen, dass diese Gene zur Normalisierung von Genexpressionsdaten, die zur Differenzierung zwischen malignem und nichtmalignem Prostatagewebe erhoben werden, nicht geeignet sind. Diese drei Gene wurden daraufhin von den nachfolgenden Berechnungen im geNorm- und NormFinder-Programm ausgeschlossen.

3.2.2 Beurteilung der Genexpressionsstabilität der Housekeeping-Gene als Referenzgene für das Prostatagewebe

Vom theoretischen Standpunkt aus handelt es sich bei den 13 verbliebenen Housekeeping-Genen um potentielle Referenzgene, die zur Normalisierung quantitativer RT-PCR-Daten in malignen und nichtmalignen Prostatagewebe verwendet werden können. Um jedoch die am besten geeigneten Normalisierungsgene zu identifizieren, wurde die sogenannte Genexpressionsstabilität, d. h. die größtmögliche Übereinstimmung in der Expression zwischen malignem und nichtmalignem Gewebe mit den Computerprogrammen geNorm, NormFinder, BestKeeper und dem Äquivalenztest validiert [50,56-58].

3.2.2.1 GeNorm

Das geNorm-Programm vergleicht die Genexpressionsstabilitäten über einen berechneten Stabilitätswert „M“ (siehe Kapitel 2.5.2, Seite 44). Alle 13 Gene wiesen nach dieser Berechnungsmethode eine hohe Expressionsstabilität mit niedrigen M-Werten auf. Da die M-Werte für alle Gene < 0,9 waren, lagen sie unterhalb des postulierten geNorm-Grenzwertes von M = 1,5 [50,92].

Die durchschnittlichen Genstabilitätswerte der Kandidaten-Referenzgene werden in der Abbildung 15 A (Seite 65) dargestellt. Der Kurvenverlauf der M-Werte stellt den schrittweisen Ausschluss der am wenigsten beständigen Referenzgene dar. *ALB* und *UBC* wurden zuerst ausgeschlossen und sind somit die am wenigsten stabilen Gene. *ALAS1* und *HPRT1* (beide M = 0,30) wurden als die beiden stabilsten Gene identifiziert.

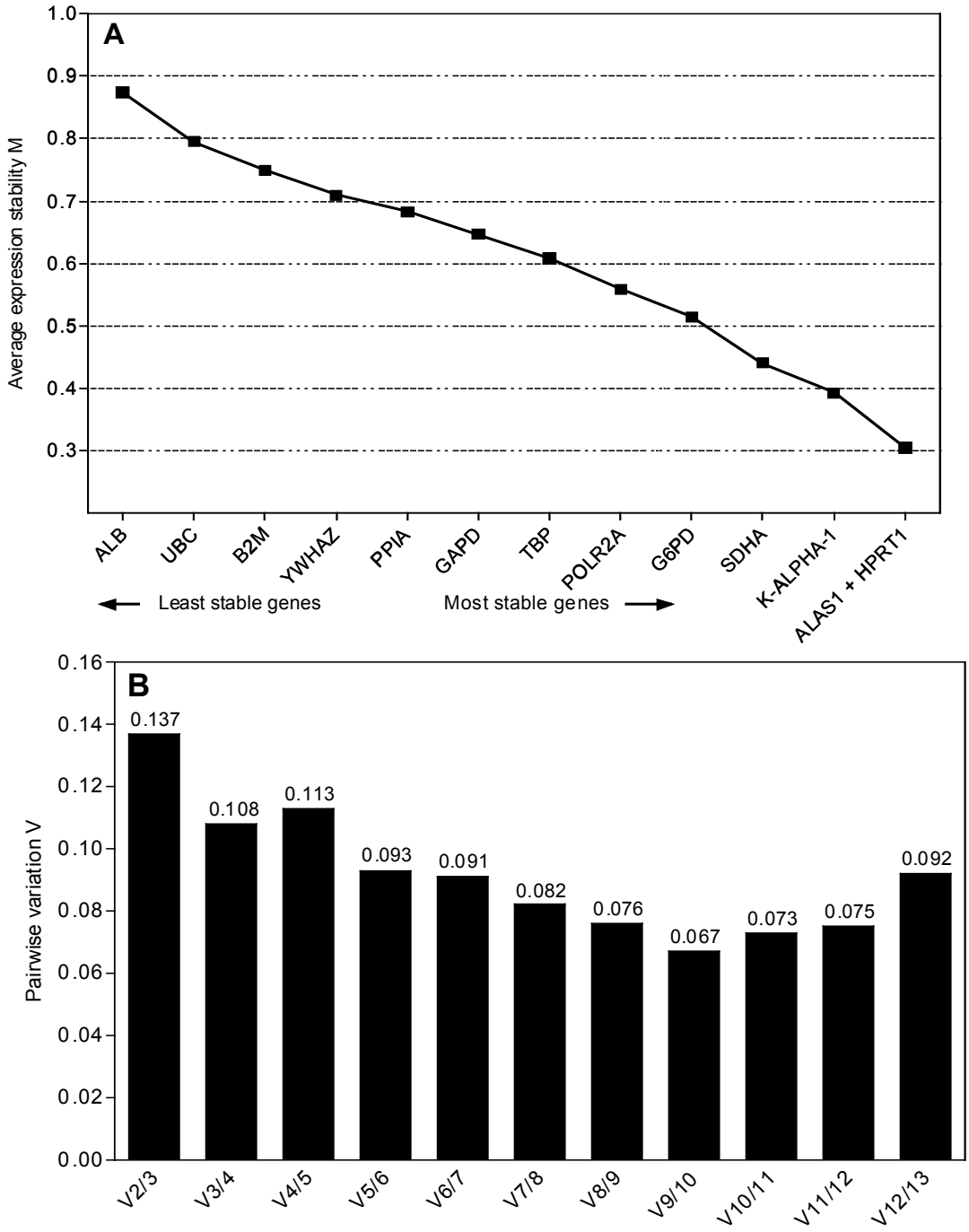

Abbildung 15 Ermittlung der am besten geeigneten Referenzgene für Expressionsuntersuchungen beim Prostatakarzinom mit dem Programm geNorm

Darstellung der Referenzgenermittlung über den M-Wert nach vorherigen Ausschluss der instabilen Gene *ACTB*, *RPL13A* und *HMBS* (t-Test). Die Diagramme entsprechen denen des Originalausdrucks. **A:** Der schrittweise Ausschluss des jeweiligen Gens mit der niedrigsten Stabilität erfolgte über die Berechnung der durchschnittlichen Expressionsstabilität „M“. GeNorm schließt im automatischen Modus in jeder Runde ein Gen mit dem höchsten M-Wert aus bis nur noch zwei Gene übrig bleiben. *Abszissenachse:* Stabilitätsrangfolge der Gene von links nach rechts. **B:** Bestimmung der optimalen Anzahl von Referenzgenen für die Normalisierung. Ausgehend von den letzten beiden stabilen Genen wird berechnet, ob jedes weitere hinzugenommene Gen einen bedeutenden Einfluss auf die Normalisierung hat, z. B. V3/4 zeigt die Variation von 3 Genen in Relation zu insgesamt 4 Genen an. Ein Schwellenwert für $V_{NF} < 0{,}15$ gibt an, dass eine ausreichende Qualität für die Normalisierung erreicht ist.

Das geNorm-Programm errechnet zusätzlich einen Normalisierungsfaktor (V_{NF}-Wert), der ein Kriterium für die optimale Anzahl von Referenzgenen ist (Abbildung 15 B). Bemerkenswert ist, dass bereits *ALAS1* und *HPRT1*, die beiden stabilsten Housekeeping-Gene, einen V_{NF}-Wert von 0,137 erzielen, der kleiner als V_{NF} = 0,15 ist. Das von Vandesompele et al. [50] empfohlene Limit des V_{NF}-Wertes liegt bei 0,15. Beim Erreichen diesen Limits soll es nicht mehr notwendig sein, zusätzliche Referenzgene für die Normalisierung aufzunehmen.

Aus der Tatsache, dass der V_{NF}-Wert sich nicht wesentlich verringerte, wenn mehr als 4 Referenzgene verwendet wurden, kann gefolgert werden, dass die Normalisierung entweder mit zwei (*ALAS1*, *HPRT1*) oder drei Referenzgenen (*ALAS1*, *HPRT1*, *K-ALPHA-1*) ausreichend ist, um eine zuverlässige relative Quantifizierung von Genexpressionen des Prostatakarzinoms vorzunehmen.

3.2.2.2 NormFinder

NormFinder errechnet den Stabilitätswert einer Gruppe von Referenzgenen, die in unterschiedlichen Untergruppen organisiert sein können. Diese sogenannte "Model-Based-Variance"-Schätzung kombiniert die Intra- und Intergruppen-Expressionsveränderung zu einem gemeinsamen Stabilitätswert, der die Referenzgene hinsichtlich ihrer Expressionsstabilität der Reihenfolge nach ordnet. Die Tabelle 12 zeigt die Rangfolge der 13 Kandidaten-Referenzgene, die sich mit der Auswertung durch das Programm NormFinder ergab.

Die Gene *HPRT1*, *ALAS1* und *K-ALPHA-1* wurden als die stabilsten Gene errmittelt. *HPRT1*, mit einem Stabilitätswert von 0,031, ist von diesen drei das stabilste Gen und könnte als Einzel-Normalisierungsgen verwendet werden. Die Kombination beider Gene, *HPRT1* und *ALAS1,* verbessert den Stabilitätswert auf 0,027. Eine noch zuverlässigere Normalisierung kann dadurch erreicht werden [57]. Die Kombination der beiden besten Gene *HPRT1* und *ALAS1* entspricht auch dem Ergebnis des geNorm-Programms.

Tabelle 12 Ermittlung der am besten geeigneten Referenzgene für Expressionsuntersuchungen beim Prostatakarzinom mit dem Programm NormFinder[a]

Reihenfolge	Gen	Stabilitätswert
1	*HPRT1*	0,031
2	*ALAS1*	0,044
3	*K-ALPHA-1*	0,055
4	*SDHA*	0,063
5	*POLR2A*	0,080
6	*G6PD*	0,083
7	*GAPD*	0,106
8	*TBP*	0,111
9	*PPIA*	0,115
10	*YWHAZ*	0,124
11	*B2M*	0,132
12	*UBC*	0,149
13	*ALB*	0,205
Beste Kombination von zwei Genen	*HPRT1 + ALAS1*	0,027

[a] Rangliste der Kandidaten-Referenzgene vom NormFinder-Programm. Eine hohe Genexpressionsstabilität ist durch einen kleinen Stabilitätswert gekennzeichnet. Der Stabilitätswert kombiniert die Intra- und Intergruppen-Varianz der individuellen Gene.

3.2.2.3 BestKeeper

Als weiteres Auswerteprogramm wurde der von Pfaffl et al. [56] eingeführte BestKeeper genutzt. Das Ergebnis der Stabilitätsanalyse mit dem Programm BestKeeper ist in Tabelle 13 wiedergegeben.

Tabelle 13 **Ermittlung der am besten geeigneten Referenzgene für Expressionsuntersuchungen beim Prostatakarzinom mit dem Programm BestKeeper[a]**

Reihenfolge	Gen	Mittlere Abweichung
1	*SDHA*	0,371
2	*HPRT1*	0,390
3	*ALAS1*	0,401
4	*K-ALPHA-1*	0,431
5	*RPL13A**	0,443
6	*ACTB**	0,520
7	*HMBS**	0,537
8	*G6PD*	0,553
9	*POLR2A*	0,584
10	*UBC*	0,605
11	*GAPD*	0,657
12	*PPIA*	0,684
13	*YWHAZ*	0,758
14	*TBP*	0,763
15	*B2M*	0,808
16	*ALB*	0,979

[a] Rangliste der Kandidaten-Referenzgene nach dem BestKeeper-Programm. Eine hohe Genexpressionsstabilität ist gekennzeichnet durch eine kleine mittlere Abweichung.
* Gene mit signifikanten Unterschieden zwischen malignen und nichtmalignen Proben im t-Test nach Student.

Tabelle 13 enthält alle ursprünglich untersuchten 16 Housekeeping-Gene der Prostata. Betrachten wir die *-markierten Gene, von denen wir wissen, dass sie sich in malignem und nichtmalignem Gewebe unterscheiden, so befinden sich diese Gene im Mittelfeld der Rangfolge. Daraus kann gefolgert werden, dass die BestKeeper-Housekeeping-Genanalyse diese Unterschiede (maligne vs. nichtmaligne) nicht erfasst. Die instabilsten Gene *ACTB*, *RPL13A* und *HMBS* hätten in diesem Fall die letzten Plätze der Rangfolge belegen müssen. *SDHA*, *HPRT1* und *ALAS1* sind die stabilsten Gene nach der Analyse durch das BestKeeper-Programm. Damit besteht trotzdem eine recht gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Programme geNorm und NormFinder.

3.2.2.4 Äquivalenztest

Bei der Anwendung des Äquivalenztestes macht sich die Stabilität der Gene durch kleine Konfidenzintervalle der Differenz δ und durch geringe Abweichungen der Mittelwerte zu „Null“ (=gleiche Mittelwerte) bemerkbar. Werden beide Bedingungen gleichermaßen berücksichtigt, ist folgende Reihenfolge abzulesen:

SDHA, *ALAS1*, *HPRT1*, *K-ALPHA-1*, *TBP*, *PPIA*, *UBC*, *G6PD*, *RPL13A, YWHAZ*, *HMBS*, *ALB*, *B2M*, *ACTB*, *GAPD* und *POLR2A*. Der Vorteil dieser Graphik (Abbildung 16, Seite 70) ist, dass auf einen Blick größere Unterschiede zwischen den Untergruppen sofort auffallen. *ACTB* und *RPL13A* heben sich von den anderen Genen deswegen ab, weil sie die „Null“ in ihrem Konfidenzintervall nicht mit einschließen. Diese Graphik verdeutlicht, dass bei einer derart einseitigen Abweichung unterschiedliche Expressionen im malignen und nichtmalignen Gewebe vorliegen. Die Ergebnisse decken sich mit den durchgeführten t-Testen, vgl. Kapitel 3.2.1, Seite 61.

Somit ergibt sich, dass SDHA, ALAS1 und HPRT1 die stabilsten Gene sind, die durch den Äquivalenztest ermittelten wurden.

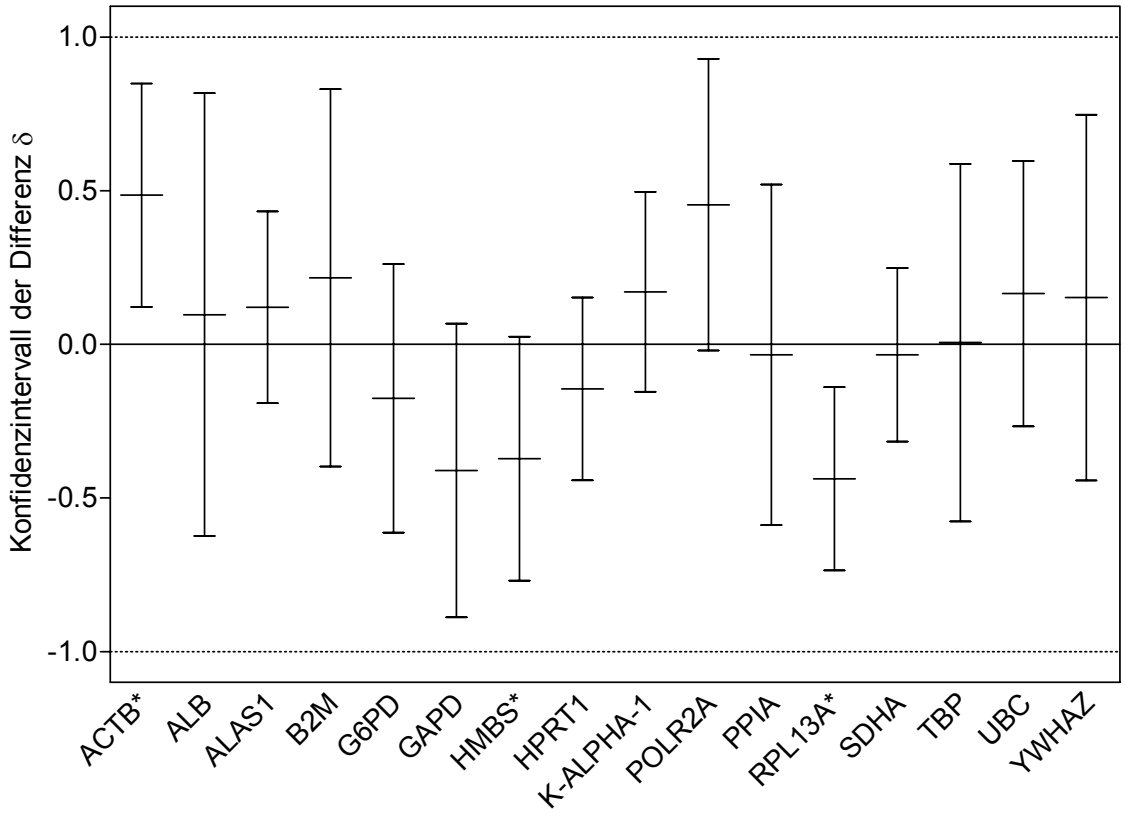

Abbildung 16 Ermittlung der am besten geeigneten Referenzgene für Expressionsuntersuchungen beim Prostatakarzinom mit dem Äquivalenztest

Äquivalenztest für 16 Gene in 16 gepaarten Proben von malignen und nichtmalignen Prostatageweben. Gezeigt werden die Unterschiede der Mittelwerte und die symmetrischen Konfidenzintervalle der logarithmierten Expressionsdaten für die 16 Gene. *Gepunktete Linie*: Die symmetrischen Konfidenzintervalle liegen für alle Gene innerhalb des Intervalls von –1 bis 1. Die malignen und nichtmalignen Gruppen besitzen somit eine $\leq$2-fache Abweichungen in ihren Mittelwerten. Einseitige positive Abweichungen (siehe *ACTB*) stellen eine höhere Expression in nichtmalignem Gewebe dar. Einseitig negative Expressionen (siehe RPL13A) stellen eine niedrigere Expression in nichtmalignem Gewebe dar. * Gen mit signifikanten Unterschieden zwischen malignen und nichtmalignen Proben im t-Test nach Student.

3.2.3 Referenzgene für das Prostatagewebe

Nach Anwendung aller vier Evaluierungsmethoden ist zusammenfassend zu sagen, dass alle Methoden das Ziel haben, Housekeeping-Gene zu identifizieren, die als Referenzgene zur Normalisierung von Zielgenen eingesetzt werden können. Demnach sollte das Ergebnis der verwendeten Evaluierungsmethoden gleich sein.

Mit einer Schnittmengenanalyse wurden die Ergebnisse der angewandten Evaluierungsprogramme zusammengefasst. Es wurden nur die ersten drei Gene in den Ranglisten der jeweiligen Programme als Teilmengen berücksichtigt. In der Abbildung 17 ist dies dargestellt und die entsprechenden Berechnungen sind als Legende in der Abbildung vermerkt. Die aus den Teilmengen vereinigte Schnittmenge für die Identifizierung von Referenzgenen für Expressionsstudien beim Prostatakarzinom enthält die Gene *HPRT1* und *ALAS1*.

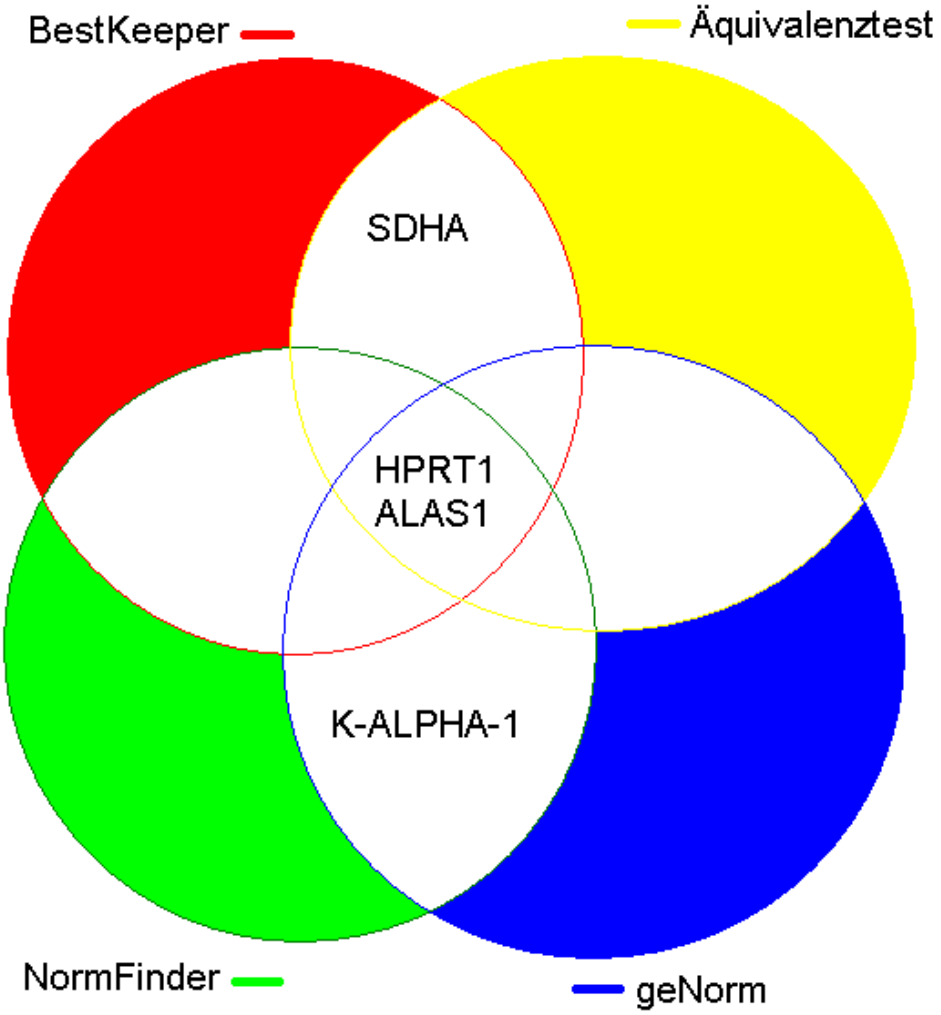

Abbildung 17 Schnittmengendiagramm der Evaluierungsprogramme für die Identifizierung von Referenzgenen für Expressionsstudien beim Prostatakarzinom

Für die Schnittmengenanalyse ergibt sich für die Teilmengen folgende Gleichung:
Best**K**eeper ∩ **Ä**quivalenztest ∩ **N**orm**F**inder ∩ **geN**orm = {Die ersten drei Referenzgene der Programme| *SDHA*, *HPRT1*, *ALAS1* ∈ BestKeeper ∧ *SDHA*, *HPRT1*, *ALAS1* ∈ Äquivalenztest ∧ *HPRT1*, *ALAS1*, *K-ALPHA-1* ∈ geNorm ∧ *HPRT1*, *ALAS1*, *K-ALPHA-1* ∈ NormFinder}.
Zusammengefasst ergibt sich die Schnittmengengleichung: **BK** ∩ **Ä** ∩ **NF** ∩ **gN** = {*HPRT1*, *ALAS1*}

3.3 Identifizierung von Referenzgenen für das Harnblasengewebe

3.3.1 Quantifizierung der Genexpression der Housekeeping-Gene im malignen und nichtmalignen Harnblasengewebe

Die Quantifizierung der Genexpression der Housekeeping-Gene im malignen und nichtmalignen Harnblasengewebe erfolgte ausschließlich am LightCycler®. Für jedes Housekeeping-Gen sind die C_T-Werte der malignen und nichtmalignen Gewebeproben separat in Abbildung 18 (Seite 73) als Box-und-Whisker-Diagramm dargestellt. Es konnten alle Gewebeproben einbezogen werden, da der Ausreißer-Test nach Grubb keine signifikanten Ausreißer detektierte. Die neun Kandidaten-Referenzgene wiesen eine Spannweite der Genexpression zwischen C_T-Werten von 20 bis 34 Zyklen auf. Aufgrund dieser kleineren Spannweite im Vergleich zu den Untersuchungen an den Prostatagewebeproben wurden die Genexpressionsniveaus nur in zwei Bereiche unterteilt.

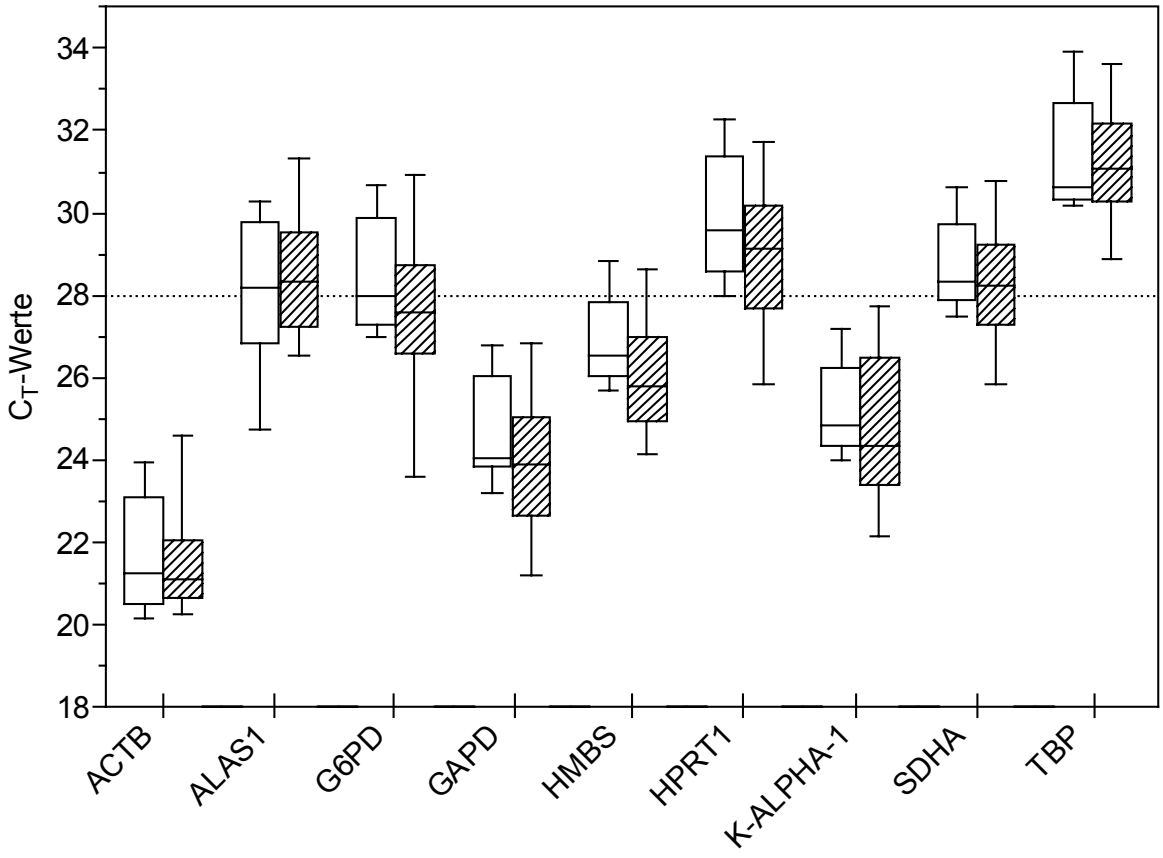

Abbildung 18 Expressionshöhen der Housekeeping-Gene im Gewebe der Harnblase

Genexpressionshöhen von Kandidaten-Referenzgenen in 10 gepaarten malignen und nichtmalignen Harnblasenproben. Die Rechtecke (weiß = nichtmalignes Gewebe; quergestreift = malignes Gewebe) repräsentieren für 10 gepaarte Paare die 25 %- und 75 %-Quartile mit dem Median als Mittellinie. Die Balken (Whiskers) stellen die Spannweiten der Werte dar. Die *Ordinatenachse* wird durch die gepunktete Linie bei C_T 28 in zwei willkürlich festgelegte Expressionsbereiche eingeteilt. Weitere Einzelheiten siehe Text.

Höher exprimierte Gene mit C_T-Werten unterhalb von 28 Zyklen waren: *ACTB*, *G6PD*, *GAPD*, *HMBS* und *K-ALPHA-1*. Gene mit niedrigerer Expression mit C_T-Werten über 28 Zyklen waren: *ALAS1*, *HPRT1*, *SDHA* und *TBP*.

Die Gesamtspannweiten der Kandidaten-Referenzgene differierten ebenfalls unterschiedlich stark. Gene mit einer maximalen Spannweite von über sechs bis sieben Zyklen waren: *HPRT1* (Spannweite = 6,27), *ALAS1* (Spannweite = 6,56), und *G6PD* (Spannweite = 7,29). Kleinere Genexpressions-Spannweiten von ungefähr vier bis fünf Zyklen wiesen *ACTB* (Spannweite = 4,39), *HMBS* (Spannweite = 4,71), *SDHA* (Spannweite = 4,92), *TBP* (Spannweite = 5,03), *K-ALPHA-1* (Spannweite = 5,54) und *GAPD* (Spannweite = 5,66) auf.

Alle Gene, ausgenommen des *ACTB* im malignen Gewebes, zeigten eine Normalverteilung in den malignen und nichtmalignen Gewebeproben. Die Genexpressionen in Gewebeproben von Männern und Frauen unterschieden sich nicht signifikant (P = 0,133 – 0,805). Auch für die verschiedenen Tumorstadien konnten keine Genexpressionsunterschiede ermittelt werden: pT2 vs. pTis/1 (P = 0,2612 – 0,4559); pT3/4 vs. pTis/1 (P = 0,1844 – 0,9141) und pT2 vs. pT3/4 (P = 0,4493 – 0,9641). Abhängigkeiten der Genexpression vom histologischen Differenzierungsgrad konnten nicht ermittelt werden, da alle Karzinomproben den histologischen Differenzierungsgrad G3 aufwiesen.

Mit dem gepaarten t-Test nach Student wurden die Genexpressionen zwischen malignen und nichtmalignen Proben auf eventuelle Unterschiede überprüft. Signifikant unterschiedliche Expressionen wurden für die Gene ***G6PD*** (P = 0,033), ***GAPD*** (P = 0,037) und ***HMBS*** (P = 0,008) beobachtet.

Die signifikanten Unterschiede belegen, dass diese Gene für Normalisierungszwecke in vergleichenden Genexpressionsstudien zwischen malignem und nichtmalignem Harnblasengewebe als mögliche Bezugsgene ungeeignet sind. Die drei Gene wurden daraufhin von den nachfolgenden Berechnungen mit den Programmen geNorm und NormFinder ausgeschlossen.

3.3.2 Beurteilung der Genexpressionsstabilität der Housekeeping-Gene als Referenzgene für das Harnblasengewebe

3.3.2.1 GeNorm

Im Ergebnis der zuerst durchgeführten t-Teste verblieben sechs der neun Housekeeping-Gene (*ALAS1*, *ACTB*, *HPRT1*, *K-ALPHA-1 SDHA*, *TBP*) in der weiteren Bewertung. Sie stehen als mögliche Referenzgene zur Normalisierung von RT-PCR-Daten, die an malignem und nichtmalignem Harnblasengewebe erhoben wurden, zur Verfügung.

Die durchschnittlichen geNorm-Stabilitätswerte der Kandidaten-Referenzgene werden in der Abbildung 19 A (Seite 75) dargestellt. Das *ALAS1*-Gen war hier das instabilste Gen. Die Gene *SDHA* und *TBP* wurden als die zwei stabilsten Referenzgene ermittelt.

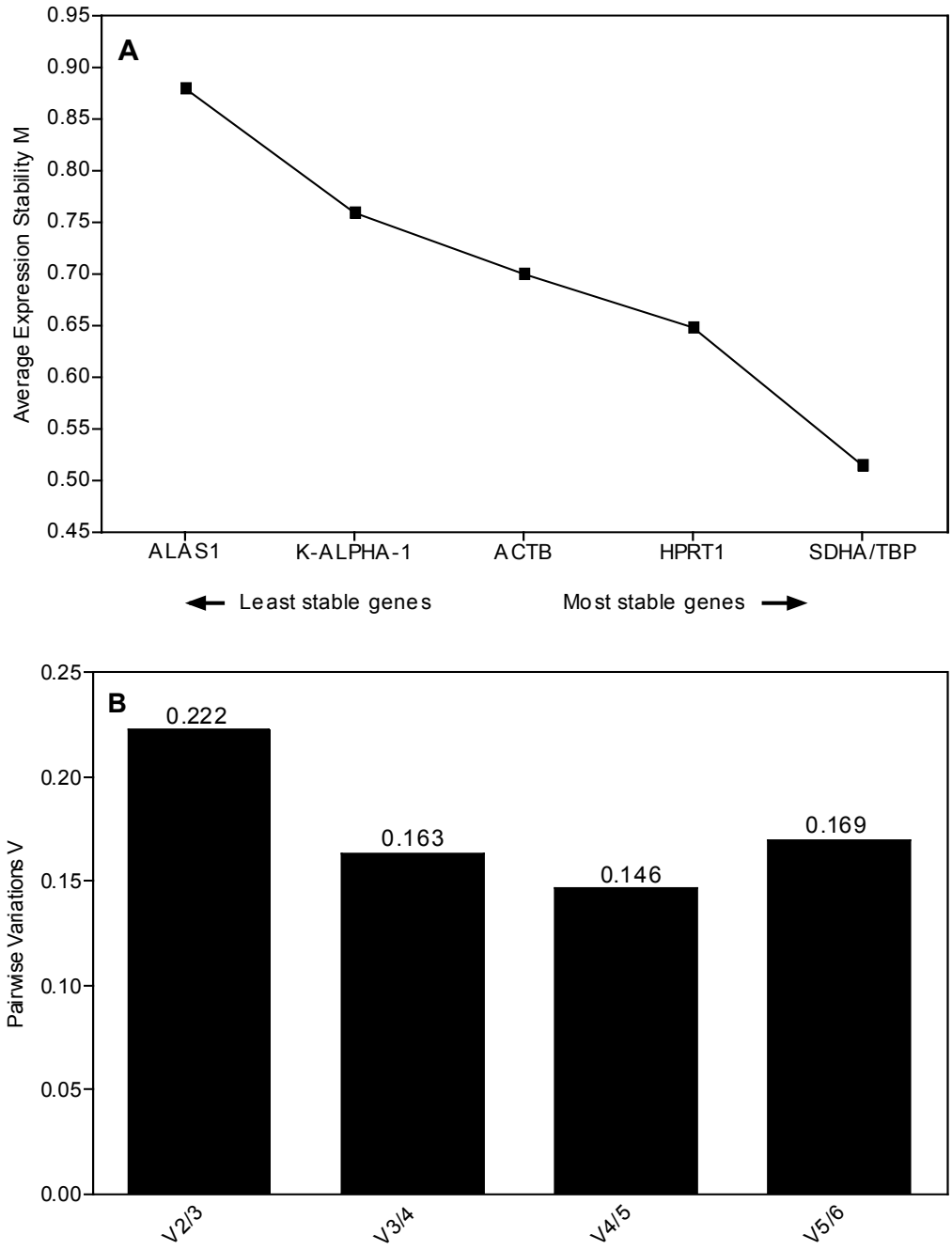

Abbildung 19 Ermittlung der am besten geeigneten Referenzgene für Expressionsuntersuchungen beim Harnblasenkarzinom mit dem Programm geNorm

Darstellung der Referenzgenermittlung über den M-Wert nach vorherigen Ausschluss der instabilen Gene *HMBS*, *GAPD* und *G6PD* (t-Test). Die Diagramme entsprechen denen des Originalausdrucks.
A: Der schrittweise Ausschluss des Gens mit der niedrigsten Stabilität erfolgte über die Berechnung der durchschnittlichen Expressionsstabilität „M". GeNorm schließt im automatischen Modus in jeder Runde ein Gen mit dem höchsten M-Wert aus bis nur noch zwei Gene übrig bleiben. *Abszissenachse:* Stabilitätsrangfolge der Gene von links nach rechts. **B:** Bestimmung der optimalen Anzahl von Referenzgenen für die Normalisierung. Ausgehend von den letzten beiden stabilen Genen wird berechnet, ob jedes weitere hinzugenommene Gen einen bedeutenden Einfluss auf die Normalisierung haben wird, z. B. V3/4 zeigt die Variation von 3 Genen in Relation zu insgesamt 4 Genen an. Ein Schwellenwert für $V_{NF} < 0{,}15$ gibt an, dass eine ausreichende Qualität für die Normalisierung erreicht ist.

Aus der Abbildung 19 B ist ersichtlich, dass *SDHA* und *TBP,* die zwei beständigsten Housekeeping-Gene, einen V_{NF}-Wert von 0,222 erzielten. Dieser Wert verringert sich aber beim Einsatz von insgesamt vier Genen auf einen Faktor von $V_{NF\ 4/5}$ = 0,146. Damit würde der postulierte Stabilitätsgrenzwert von V_{NF} = 0,15 knapp unterschritten. In diesem Falle würden die vier Gene *SDHA* / *TBP* / *HPRT1* / *ACTB* zur Normalisierung herangezogen werden. Dies wäre natürlich sehr aufwendig.

3.3.2.2 NormFinder

Die Tabelle 14 zeigt die Rangfolge der sechs möglichen Referenzgene, die sich mit der Auswertung durch das Programm NormFinder ergab. Die beste Kombination bilden die zwei Gene *SDHA* und *TBP.* Dies entspricht dem Resultat des geNorm-Programms.

Tabelle 14 **Ermittlung der am besten geeigneten Referenzgene für Expressionsuntersuchungen beim Harnblasenkarzinom mit dem Programm NormFinder[a]**

Reihenfolge	Gen	Stabilitätswert
1	*SDHA*	0,117
2	*TBP*	0,128
3	*ACTB*	0,142
4	*K-ALPHA-1*	0,213
5	*HPRT1*	0,260
6	*ALAS1*	0,335
Beste Kombination von zwei Genen	*SDHA* + *TBP*	0,078

[a] Rangliste der Kandidaten-Referenzgene vom NormFinder-Programm. Eine hohe Genexpressionsstabilität ist durch einen kleinen Stabilitätswert gekennzeichnet. Der Stabilitätswert kombiniert die Intra- und Intergruppen-Varianz der einzelnen Gene.

3.3.2.3 BestKeeper

Die Ergebnisse der Stabilitätsanalyse mit dem Programm BestKeeper sind in Tabelle 15 wiedergegeben. In die Berechnungen wurden alle Gene mit einbezogen. Dies betraf auch Gene, die im t-Test signifikante Unterschiede zwischen malignem und nichtmalignem Gewebe ergaben.

Tabelle 15 **Ermittlung der am besten geeigneten Referenzgene für Expressionsuntersuchungen beim Harnblasenkarzinom mit dem Programm BestKeeper[a]**

Reihenfolge	Gen	Mittlere Abweichung
1	*SDHA*	0,925
2	*HMBS**	0,936
3	*ACTB*	1,021
4	*TBP*	1,035
5	*GAPD**	1,122
6	*K-ALPHA-1*	1,175
7	*ALAS1*	1,183
8	*G6PD**	1,201
9	*HPRT1*	1,280

[a] Rangliste der Kandidaten-Referenzgene nach dem BestKeeper-Programm. Eine hohe Genexpressionsstabilität ist durch eine kleine mittlere Abweichung gekennzeichnet.
***** Gen mit signifikanten Unterschieden zwischen malignen und nichtmalignen Proben im t-Test nach Student.

Das *HMBS*-Gen, das neben der *GAPD* und der *G6PD* zu den Genen mit signifikanten Unterschieden zwischen malignen und nichtmalignen Gewebe gehört, steht dabei an zweiter Stelle der Rangliste. Dies zeigt, dass mit dem BestKeeper-Programm diese Unterschiede nicht erfasst werden, da *HMBS* als das zweitbeste Housekeeping-Gen in dieser Rangfolge platziert ist.

Bei Ausschluss der in der Tabelle mit *-markierten drei Gene *HMBS*, *GAPD* und *G6PD* rückt das nächststehende Gen auf. Die mittleren Abweichungen behalten ihre Werte und werden nicht mit der Gesamtheit aller Gene in Beziehung gesetzt. Ich habe dieses Beispiel mit den bereits durch den t-Test ausgeschlossenen Genen angeführt, weil dies noch einmal unterstreicht, dass dieser kritische Bewertungsschritt (t-Test) unbedingt vor der Analyse der Gene mit dem Programm erfolgen muss. Ansonsten sind fragwürdige Ergebnisse nicht auszuschließen.

Bei einem Vergleich von Prostata- mit Harnblasendaten fällt auf, dass die mittleren Abweichungen in den Harnblasenproben größer sind. Dies ist ein Ergeb-

nis, das sich mit der zuvor gezeigten Spannweitenanalyse deckt (Kapitel 3.2.1 und 3.3.1). Die bei der Prostata vom BestKeeper-Programm errechneten mittleren Abweichungen aller untersuchten Gene besitzen einen Wert > 1. Bei den untersuchten Genen in den Harnblasengeweben erreichen nur die ersten beiden diesen Wert.

3.3.2.4 Äquivalenztest

Generell fallen die Konfidenzintervalle der Genexpression für die Harnblase größer aus als bei der Prostata. Aber auch hier lässt sich optisch eine Abgrenzung der Gene *ACTB*, *SDHA* und *TBP* zu den restlichen Genen erkennen (Abbildung 20, Seite 79). Sie besitzen kleinere Intervalle, die sich nahe am Nullpunkt befinden. Dies ist ein Ausdruck von stabiler Expression. Gene mit großem Konfidenzintervall außerhalb des Bereiches von -1,58 bis 1,58 (entspricht der $\leq$ 3-fachen Abweichung der Gruppenmittelwerte) sind die Gene *G6PD*, *GAPD* und *HPRT1*. *Die Gene ACTB, SDHA* und *TBP* sind die vom Äquivalenztest ermittelten stabilsten Gene.

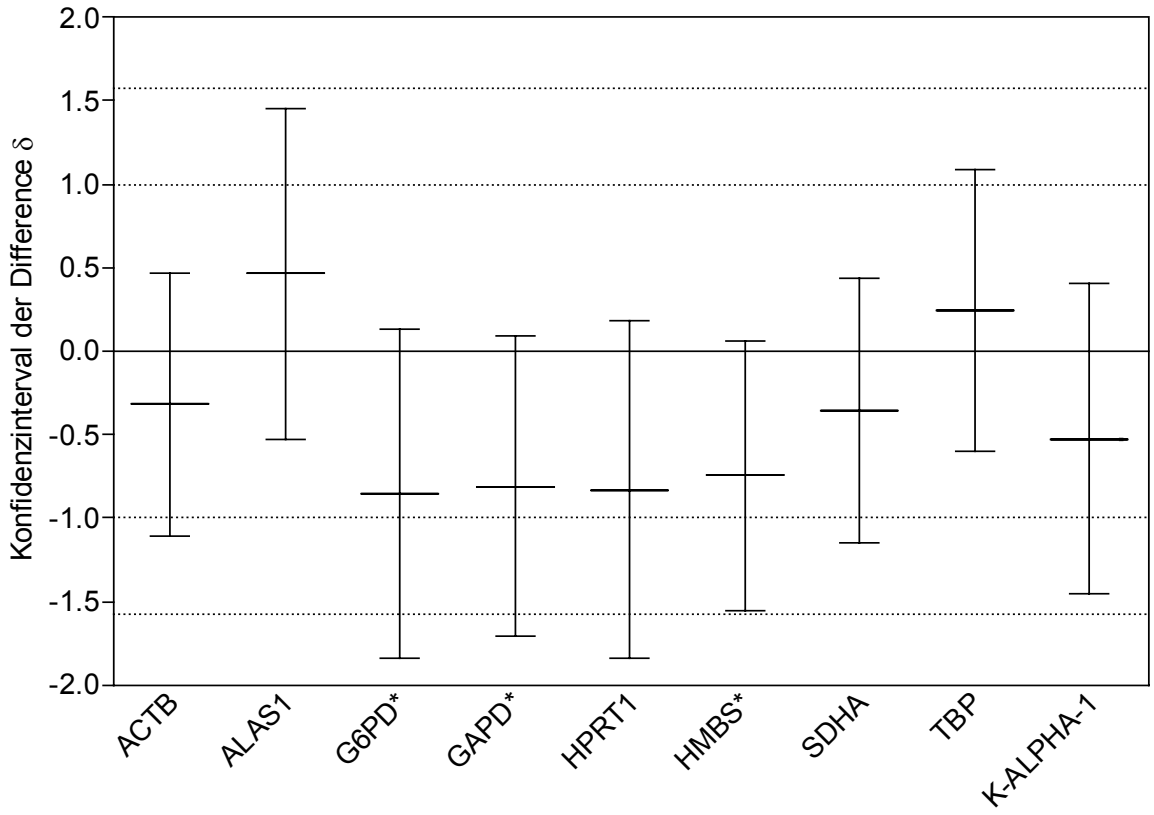

Abbildung 20 Ermittlung der am besten geeigneten Referenzgene für Expressionsuntersuchungen beim Harnblasenkarzinom mit dem Äquivalenztest

Äquivalenztest für 9 Gene in 10 gepaarten Proben von malignen und nichtmalignen Harnblasengeweben. Gezeigt werden die Unterschiede Mittelwerte und die symmetrischen Konfidenzintervalle der logarithmierten Expressionsdaten für die 9 Gene. *Gepunktete Linie*: Die symmetrischen Konfidenzintervalle liegen für die Gene *G6PD*, *GAPD* und *HPRT1* nicht innerhalb des festgelegten Intervalls von -1,58 bis 1,58. Die malignen und nichtmalignen Gruppen besitzen somit eine >3-fache Abweichungen in ihren Mittelwerten. Einseitige negative Abweichungen (z. B. *GAPD*) stellen eine nichtäquivalente höhere Expression im Karzinomgewebe dar.
* Gene mit signifikanten Unterschieden zwischen malignen und nichtmalignen Proben im t-Test nach Student.

3.3.3 Referenzgene für das Harnblasengewebe

Mit einer Schnittmengenanalyse wurden wiederum die unterschiedlichen Ergebnisse der angewandten Evaluierungsprogramme zusammengefasst. Es wurden die ersten drei Gene in den Ranglisten der jeweiligen Programme als Teilmengen berücksichtigt. In der Abbildung 21 (Seite 80) ist dies dargestellt und die entsprechenden Berechnungen sind als Legende in der Abbildung vermerkt. Für die Harnblase ergibt sich eine Nennung der Gene *SDHA* und *TBP* in allen vier Programmen.

Die sich aus den Teilmengen ergebende Schnittmenge zur Identifizierung der stabilsten Referenzgene für Expressionsstudien beim Harnblasenkarzinom besitzt als Inhaltsmenge die Gene *SDHA* und *TBP*.

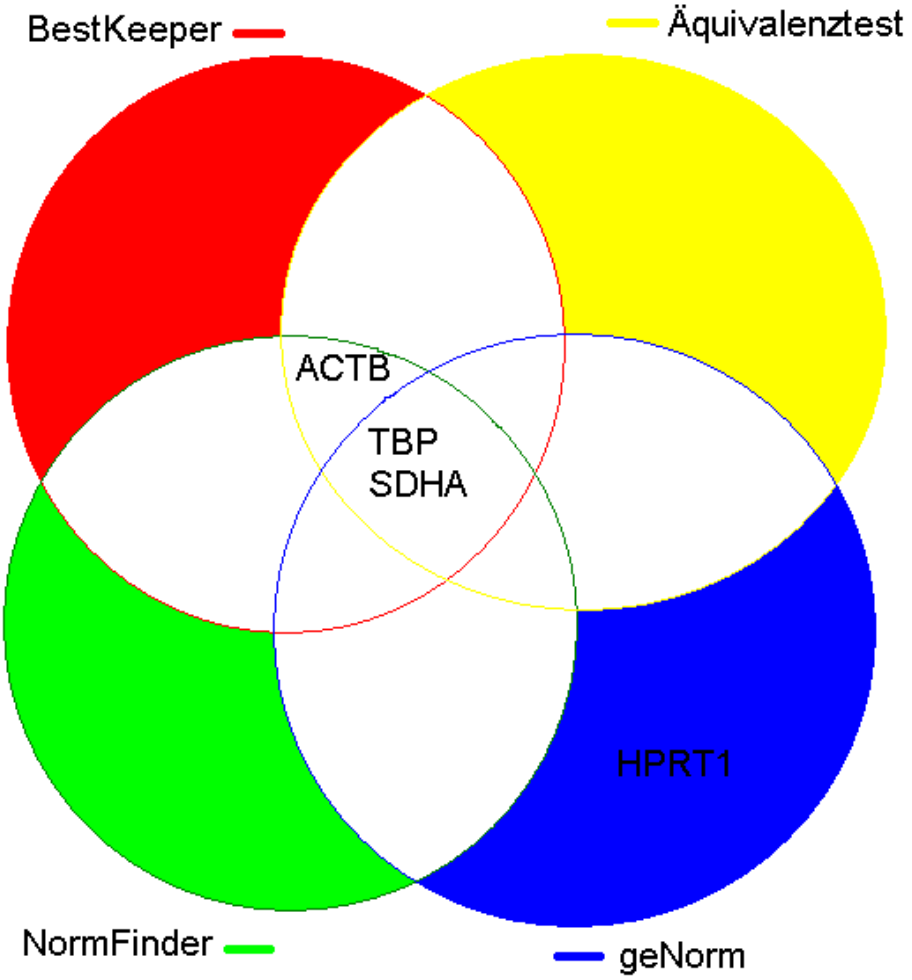

Abbildung 21 Schnittmengendiagramm der Evaluierungsprogramme für die Identifizierung von Referenzgenen für Expressionsstudien beim Harnblasenkarzinom

Für die Schnittmengenanalyse ergibt sich für die Teilmengen folgende Gleichung:
Best**K**eeper ∩ **Ä**quivalenztest ∩ **N**orm**F**inder ∩ **geN**orm = {Die ersten drei Referenzgene der Programme| *ACTB*, *TBP*, *SDHA* ∈ BestKeeper ∧ *ACTB*, *TBP*, *SDHA* ∈ Äquivalenztest ∧ *TBP*, *SDHA*, *HPRT1* ∈ geNorm ∧ *ACTB*, *TBP*, *SDHA* ∈ NormFinder} Zusammengefasst ergibt sich die Schnittmengengleichung: **BK** ∩ **Ä** ∩ **NF** ∩ **gN** = {*SDHA, TBP*}

3.4 Relative Quantifizierung von Zielgenen für das Prostatagewebe

Um die Bedeutung der Wahl geeigneter Referenzgene für die relative Quantifizierung von Zielgenen zu verdeutlichen, habe ich das Beispiel der Gene *RECK* (Abbildung 22, Seite 82) und *PCA3* (Abbildung 23, Seite 83) für das Prostatakarzinom gewählt. Die Expression dieser beiden Gene wird zur Zeit u. a. in der Urologischen Klinik der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Charité Campus Mitte (CCM) erforscht. Zu den Genen selbst werde ich in der „Diskussion“ nähere Ausführungen machen.

Die quantitativen RT-PCR-Messungen der Gene *RECK* und *PCA3* am Light-Cycler® wurden an 14 Gewebepaaren durchgeführt, um den Einfluss verschiedener Housekeeping-Gene auf die Expressionsergebnisse darzustellen. Dazu wählte ich verschiedene Normalisierungsfaktoren aus, die sich mit dem Programm geNorm aus den drei besten Genen (Säule als geNorm3 in Abbildung 22 bezeichnet) bzw. aus den zwei besten Genen (Säule als geNorm2 in Abbildung 22 bezeichnet) ergaben. Der Normalisierungsfaktor *geNorm3* enthält die Gene *ALAS1*, *HPRT1* und *K-ALPHA-1.* Der Normalisierunsgfaktor *geNorm2* enthält die beste Zweier-Kombination von Genen, die sich auch zusätzlich mit dem Programm NormFinder, BestKeeper und dem Äquivalenztest ergab, nämlich *ALAS1* und *HPRT1.* Vergleichend dazu wurde die Normalisierung mit drei Einzel-Genen vorgenommen. Hierfür wurden *HPRT1* als sehr gut geeignetes Referenzgen und die durch den t-Test zur Normalisierung bereits als ungeeignete ermittelten Gene, *ACTB* sowie *RPL13A,* verwendet.

Zur relativen Quantifizierung wurden die RT-PCR-Daten der Zielgene und der Referenzgene in MS-Excel übertragen und manuell berechnet (Abschnitt 2.5.6, Seite 48).

Die relativen Expressionen sind in den Abbildungen 22 und 23 dargestellt. Die Ergebnisse für die *RECK*-Expression zeigen, dass mit dem Normalisierungsfaktor *geNorm3* sowie dem Faktor *geNorm2*, aber auch mit dem als sehr gut geeignetem Einzel-Referenzgen *HPRT1* eine ca. 20 % geringere Expression von *RECK* in malignem im Vergleich zum gesunden Gewebe nachgewiesen wird. Bei der Normalisierung mit dem Einzelgen *ACTB* wird dagegen kein Unterschied zwischen den Expressionen in malignem und nichtmalignem Prostatagewebe festgestellt. Dies ergibt sich deshalb, weil *ACTB* im nichtmalignen

Gewebe stärker als im malignen Gewebe exprimiert wird. Dadurch wird bei der relativen Quantifizierung mit regulierten Genen durch die Quotientenbildung das Ergebnis verfälscht. Das Gegenbeispiel zeigt sich bei der Verwendung von *RPL13A* als Referenzgen. Hier wird eine noch geringere Expression in malignen Gewebeproben (> 30 %) bestimmt.

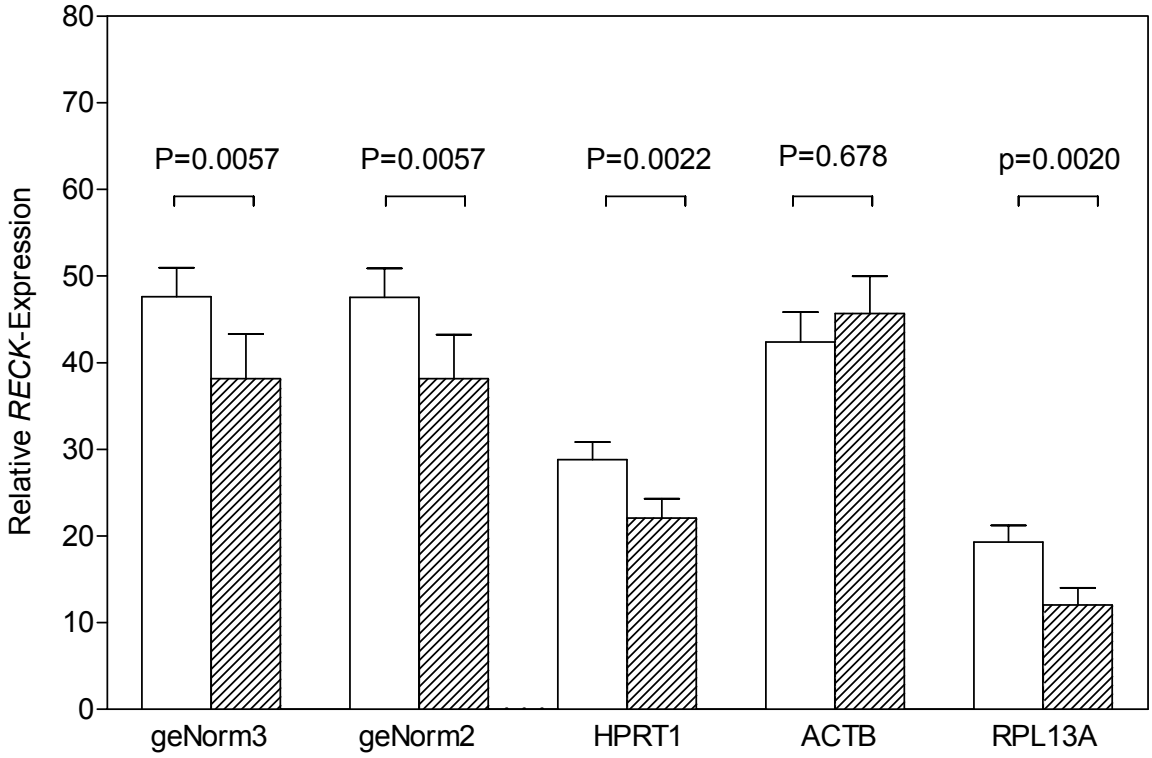

Abbildung 22 Relative *RECK*-Expression in malignen und nichtmalignen Prostatagewebe in Abhängigkeit von Art der Normalisierung

Effekte von zwei Normalisierungsfaktoren und drei einzelnen Normalisierungsgenen auf die Genexpressionshöhen von *RECK* in malignen und nichtmalignen Prostataproben. Weitere Einzelheiten im Text. Die normalisierte *RECK*-Expression ist durch Balken Mittelwerte ± S. E. angegeben. Die Signifikanzen der normalisierten *RECK*-Expression in den nichtmalignen (leere Säule) und malignen (schraffierte Säule) Proben wurden durch t-Teste nach Student berechnet.

Das zweite von mir untersuchte Zielgen, das *PCA3*, ist im Karzinomgewebe der Prostata stark exprimiert. Dies zeigt sich auch nach Anwendung aller oben erwähnten Normalisierungsvarianten. Es werden jedoch auch hierbei relative Verschiebungen je nach Normalisierungsfaktor und Bezugsgen ersichtlich. In Abbildung 23 sind die relativen *PCA3*-Expressionen dargestellt. Die Erhöhungen im Tumorgewebe wurden als Vielfaches der Genexpression gegenüber denen im nichtmalignen Gewebe errechnet (siehe Gleichung 12, Seite 49). Die Normalisierung mit den geNorm3-, geNorm2-Faktoren sowie mit dem Gen *HPRT1* ergaben

eine ca. 17-fache Expressionserhöhung im Tumorgewebe. Dagegen wurde bei der Normalisierung mit dem Gen *ACTB* eine 28-fache und mit dem Gen *RPL13A* eine nur 12-fache Erhöhung berechnet.

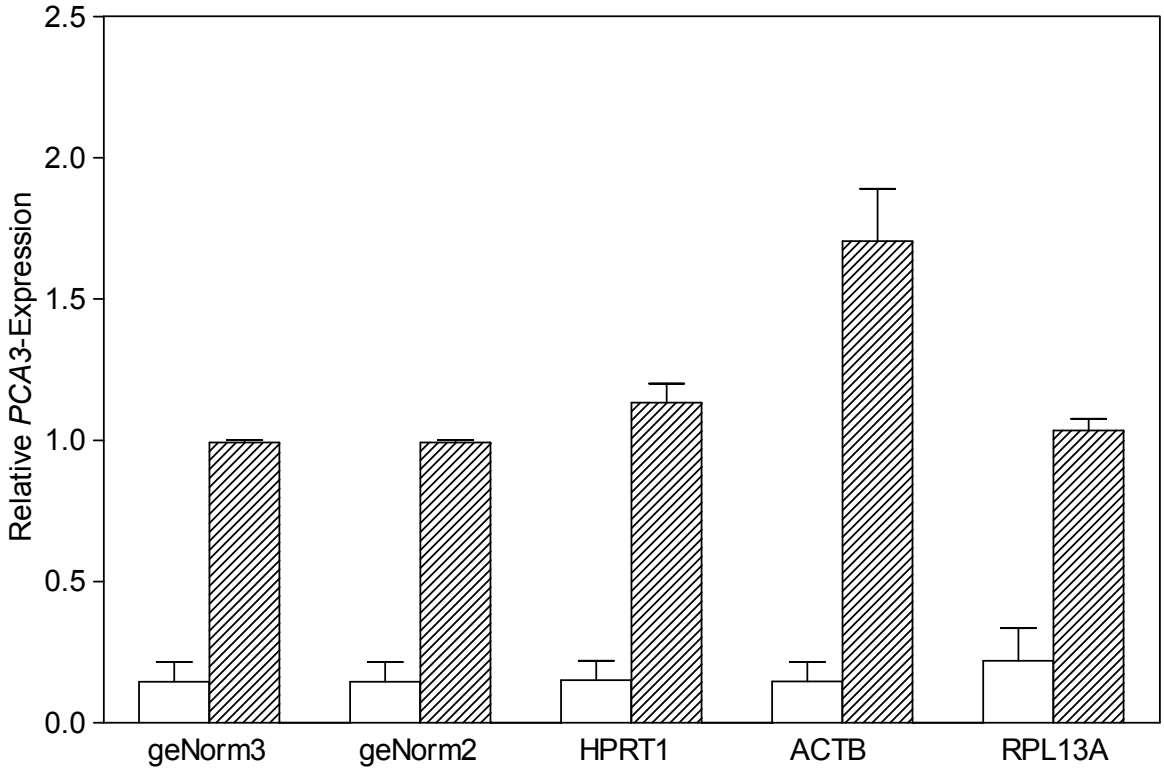

Abbildung 23 Relative *PCA3*-Expression in malignen und nichtmalignen Prostatagewebe in Abhängigkeit von Art der Normalisierung

Effekte von zwei Normalisierungsfaktoren und drei einzelnen Normalisierungsgenen auf die Genexpressionshöhen von *PCA3* in malignen und nichtmalignen Prostataproben. Weitere Einzelheiten im Text. Die normalisierte *PCA3*-Expression ist durch Balken Mittelwerte ± S. E. angegeben. Die Signifikanzen der normalisierten *PCA3*-Expression in den nichtmalignen (leere Säule) und malignen (schraffierte Säule) Proben wurden durch Wilcoxon-Signed-Rank-Teste berechnet. Die relative *PCA3*-Expression in nichtmalignen und malignen Proben unterscheiden sich für alle Normalisierungsfaktoren und Normalisierungsgene signifikant ($P < 0{,}001$).