

## 4 Diskussion

Die vorliegende Untersuchung ist der erste systematische Vergleich einer großen Anzahl möglicher Referenzgene hinsichtlich ihres Gebrauchs zur relativen Quantifizierung bei Genexpressionsstudien in Prostatakarzinom- und Harnblasenkarzinomproben.

Wie ich in den Medline-Recherchen in der Einleitung gezeigt habe, gibt es bis zum heutigen Zeitpunkt keine einheitliche Betrachtungsweise zur Verwendung von Referenzgenen für Genexpressionsanalysen beim Prostata- und Harnblasenkrebs. Die Literaturrecherchen belegen, dass die Autoren unterschiedliche Referenzgene, bona fide es sei die geeignete Wahl, für die relative Quantifizierung beim Prostata- und Harnblasenkarzinom heranziehen. Entsprechend dieser Literaturrecherche liegen für das Prostatagewebe nur zwei Artikel über verschiedene Referenzgenauswertungen vor [52,97]. Diese Arbeiten wurden jedoch entweder mit kommerziell erhältlichen DNA- oder RNA-Proben oder mit einer kleinen Anzahl ungepaarter Gewebeproben durchgeführt [52,97]. Für die Harnblase existiert bisher nur ein Artikel zur Referenzgenauswertung [57]. Auch bei dieser Studie wurden keine gepaarten Gewebeproben eingesetzt.

Obwohl Methoden zur Identifizierung von Referenzgenen vorhanden und seit längerem bekannt sind, liegen bisher jedoch für das Prostata- und Harnblasenkarzinom keine zufrieden stellenden Untersuchungen zur Festlegung von tatsächlich geeigneten Referenzgenen zur relativen Quantifizierung von mRNA-Daten vor. Dies begründete die Thematik der vorliegenden Arbeit.

Alle experimentellen Daten und Resultate, die hier dargestellt wurden, basieren auf folgenden Besonderheiten des Studiendesigns meiner Arbeit:

1. Den Gebrauch von gepaarten malignen und nichtmalignen Gewebeproben von derselben Prostata bzw. Harnblase.
2. Der Verwendung mikrodissasierter Proben aus malignen und nichtmalignen Arealen bei der Prostata, um eindeutige Gewebedifferenzierungen zu garantieren.
3. Objektivierter und strenger Qualitätskontrolle der isolierten RNA.
4. Simultaner Untersuchung von 16 möglichen Referenzgenen für die Prostata und von 9 Referenzgenen für die Harnblase unter optimierten Bedingungen der quantitativen Bestimmung mit der Echtzeit-RT-PCR.

5. Der Verwendung verschiedener Computerprogramme in Kombination mit einem vorhergehenden t-Test nach Student, um die bestmöglichen Referenzgene entsprechend ihrer Eignung als Normalisierer einzuordnen.

In der folgenden Diskussion werde ich deshalb auf diese Punkte gesondert eingehen.

Die Entscheidung, gepaarte, mikrodissizierte Gewebeproben einzusetzen, werde ich im Kapitel „4.1 Gewinnung des zu untersuchenden Gewebematerials“ kommentieren. In den Kapiteln „4.2 Qualitätskontrolle der isolierten RNA für Genexpressionsstudien“ und „4.3 Echtzeit-RT-PCR“ werde ich mich im Wesentlichen den analytischen Voraussetzungen widmen, die für die Festlegung von Referenzgenen zu beachten sind. Im Kapitel „4.4 Auswertung der Housekeeping-Gen-Daten zur Auswahl geeigneter Referenzgene“ werde ich dann separat für das Prostata- und Harnblasenkarzinom die Selektionskriterien der empfohlenen Referenzgene begründen. Im Kapitel „4.5 Normalisierung von Zielgenen am Beispiel der Gene *RECK* und *PCA3*“ wird abschließend der Einfluss von Referenzgenen auf die Normalisierung von Zielgenen besprochen.

#### **4.1 Gewinnung des zu untersuchenden Gewebematerials**

Als wichtige Voraussetzungsbedingungen für zuverlässige Resultate habe ich besonders die ersten beiden Punkte des Studiendesigns, die Analytik gepaarter, möglichst mikrodissizierter Gewebeproben betrachtet. Durch die Untersuchung malignen und nichtmalignen Gewebes von ein und demselben Patienten, d. h. die Wahl von gepaarten Gewebeproben anstelle von Proben malignen und nichtmalignen Gewebes unterschiedlicher Probanden, kann die interindividuelle Streuung ausgeschlossen werden. Die intraindividuelle Streuung ist in der Regel kleiner, so dass eine höhere Aussagekraft der Daten zu erwarten ist.

Für beide Organsysteme wurde eine geeignete Methode zur Gewinnung der Gewebeproben erarbeitet. Für die Prostata habe ich dazu die Einzelheiten im Abschnitt „Material und Methoden“ beschrieben. Da Prostatakarzinome häufig heterogen und multifokal in der Prostata auftreten, ist der Einsatz von makroskopisch beurteiltem Gewebematerial aus Prostataektomieproben kaum für zuverlässige Analysen angebracht. Durch die Vorteile der Mikrodissektionstechnik konnten

die gewünschten homogenen Areale aus der Prostata unter dem Mikroskop gekennzeichnet, histologisch klassifiziert, herausgeschnitten und weiterverarbeitet werden [46,78,98]. Zahlreiche neuere Expressionsstudien an der Prostata wurden auch weiterhin ohne Mikrodissektion durchgeführt [64,99]. Ich glaube jedoch, dass solche entscheidenden Untersuchungen zur Ermittlung von Referenzgenen als Grundlage für eine Vielzahl anderer Experimente unbedingt an Mikrodissektionsproben erfolgen sollten.

Für Untersuchungen am Harnblasenkarzinom wurden Gewebeproben unter makroskopischer Sichtung entnommen und nach entsprechender histologischer Charakterisierung weiter aufgearbeitet. Eine Differenzierung zwischen malignem und nichtmalignem Gewebe ist hierbei schon visuell möglich. Die Gewebeproben wurden sofort nach der Entnahme in einer RNA-Stabilisierungslösung (RNAlater) konserviert. Die Anwendung der RNAlater-Lösung zur Stabilisierung der RNA in Gewebeproben hat sich bei vielen Expressionsanalysen als sehr erfolgreich erwiesen [24,100,101]. Diese Verfahrensweise der sofortigen Überführung des Gewebematerials in die RNA-Stabilisierungslösung zeigte sich in Vorversuchen als unbedingt notwendig. Gewebeproben der Harnblase scheinen anfälliger für eine RNA-Degradation zu sein als das Prostatagewebe. Höchstwahrscheinlich weist das sehr stoffwechselaktive Urothel wesentlich mehr RNasen auf als das Prostatagewebe. Ohne den Einsatz der RNA-Stabilisierungslösung gelang es nicht, RNA-Proben mit ausreichender RNA-Integrität zu gewinnen. Nur durch die hier beschriebene Art der Gewebevorbereitung sowie den Einsatz kommerziell erhältlicher RNA-Isolierungskits konnte eine ausreichende Menge RNA mit guter Qualität aus den Gewebeproben isoliert werden.

#### **4.2 Qualitätskontrolle der isolierten RNA für Genexpressionsstudien**

Besondere Aufmerksamkeit habe ich auf die Kontrolle der RNA-Integrität mit Hilfe des Agilent-2100-Bioanalyzers [45,46,49] einschließlich einer neuen Auswertesoftware für die Berechnung der RIN-Werte [80] gelegt. Das Agilent-2100-Bioanalyzers-System erlaubt eine empfindlichere und umfassendere Analyse von isolierten RNA-Proben als es mit dem herkömmlichen Gelelektrophorese-Verfahren über das 28S/18S-rRNA-Bandenverhältnis möglich ist [80]. Diese Methode wurde vor kurzem als Standardverfahren für die RNA-

Qualitätseinschätzung empfohlen und gilt als state-of-the-art-Methode für Experimente auf RNA-Ebene [82]. Aus diesem Grund wurde die Entscheidung getroffen, mit Gesamt-RNA anstelle von mRNA, die auch schneller abgebaut werden kann, in den oben beschriebenen Experimenten aus Prostata- und Harnblasenproben zu arbeiten. Der Vorteil liegt in der genauen Bestimmung der Integrität der RNA und in der höheren Stabilität von Gesamt-RNA-Proben. Die wesentliche Bedingung war, Proben mit gleich guten Qualitätskriterien einzusetzen. Diese hohen Qualitätsanforderungen können bei der Nutzung von mRNA nicht so leicht realisiert werden, weil Ergebnisse mit dem Agilent-2100-Bioanalyzer hier nur bildlich als Elektropherogramme und nicht als numerische Daten ausgegeben werden können. Mit der Nutzung von Gesamt-RNA in Verbindung mit dem Agilent-2100-Bioanalyzer und der neuen Software ergibt sich die Möglichkeit, RNA-Proben mit gleicher Qualität über deren RIN-Werte für Genexpressionsstudien einzusetzen.

Der Zeit- und Arbeitsaufwand ist bei Geräten der neueren Generation, wie dem NanoDrop<sup>®</sup>-Spekrophotometer zur RNA-Quantifizierung und dem Agilent-2100-Bioanalyzer im Vergleich zu den klassischen Methoden darüber hinaus geringer.

Um eine gleich bleibende Qualität aller Proben zu gewährleisten, wurden nur RNA-Proben mit einem hohen Reinheitsgrad und einer hohen Integrität, d. h. mit einem  $A_{260/280}$ -Verhältnis von  $\geq 1,90$  und einem RIN-Wert von  $\geq 7,0$  bei der Prostata bzw. von  $\geq 6,1$  bei der Harnblase in diese Studie einbezogen. Die in der Arbeit und in die Berechnung eingeschlossenen Proben sind damit eine Auswahl von einer ursprünglich größeren Anzahl von RNA-Proben. So gab es für die Harnblase mindestens zehn Probenpaare, die unterschiedliche RIN-Werte zwischen malignen und nichtmalignen Geweben aufwiesen. Die RIN-Werte sollten aber mit dem Ziel des exakten Vergleiches zwischen den Gewebepaaren einen annähernd gleichen Wert besitzen. Probenpaare mit Unterschieden im RIN-Wert wurden daher nicht in die Referenzgen-Studie einbezogen.

### 4.3 Echtzeit-RT-PCR

Die quantitative RT-PCR auf der Basis des Echtzeit-Messprinzips ist eine inzwischen weit verbreitete Technik, die mit hoher Sensitivität, guter Reproduzierbarkeit und einem weiten dynamischen Quantifizierungsbereich bei Genexpressionsstudien eingesetzt wird [28,102].

Um physiologische und pathologische Zusammenhänge der Zelle zu verstehen, ist die quantitative Echtzeit-RT-PCR als eine geeignete Methode anzuwenden, um auch geringe Expressionsunterschiede ermitteln zu können. Die zuvor von mir abgesicherte RNA-Qualität und RNA-Quantität waren Voraussetzungen für die hohe Zuverlässigkeit der Bestimmungen. Für die reverse Transkription hatten wir in Vorversuchen über einzelne Zielgen-PCR-Bestimmungen ermittelt, dass mit Random-Primern eine höhere cDNA-Syntheserate erzielt wurde als mit Oligo-(dT)-Primern [103].

Die quantitative RT-PCR wurde an zwei verschiedenen PCR-Geräten durchgeführt. Es wurden die im Kapitel „2.4.1 Geräte für die Echtzeit-PCR“ (Seite 27) beschriebenen Echtzeit-PCR-Automaten verwendet. Obwohl somit Unterschiede im Gerät- und Softwareaufbau bestanden, sind die Ergebnisse über mitgeführte Kontrollmaterialien abgesichert worden. Die Präzisionskontrolldaten beider Geräte waren vergleichbar. Für beide Detektionsmethoden, SYBR Green und TaqMan-Sonden, werden in der Literatur ähnliche dynamische Bereiche und Sensitivitäten beschrieben [104,105].

Die PCR-Effizienzen haben einen wesentlichen Einfluss auf die Zuverlässigkeit und Varianz von quantitativen Expressionsergebnissen. PCR-Effizienzen können sich sowohl von Zielgenen als auch von Referenzgenen unterscheiden, daher ist eine Effizienz-korrigierte relative Quantifizierung von Expressionsdaten zu empfehlen. Verschiedene Methoden der PCR-Effizienzermittlung werden diskutiert [32]. Eine bisher in der Praxis oft geübte Methode ist die Effizienzberechnung, die über cDNA-Verdünnungsreihen für jede genspezifische PCR ermittelt wurde. Über Standardkurven lässt sich die Ausgangskonzentration der Proben für jeden  $C_T$ -Wert ermitteln. Aus den Steigungen der Standardkurven werden die PCR-Effizienzen berechnet, die sich PCR-abhängig zwischen Ziel- und Referenzgenen erheblich unterscheiden können. Würde dies nicht bei der Quantifizierung beachtet, so würden die Ausgangskonzentrationen fehlerhaft bestimmt. Die Effizienzen

sollten daher unbedingt in die Rechnungen mit einbezogen werden, da bereits geringe Effizienzunterschiede, wie z. B. von nur 3 %, eine Über- bzw. Unterschätzung der Zielgenexpression von 47 % generieren können [89,106]. Das hier angewandte Verfahren zur PCR-Effizienzberechnung ist eine etablierte Methode und lässt sich über die in beiden PCR-Geräten integrierte Software aus den Anstiegen der linearen Regressionsgeraden schnell ermitteln. Die Effizienzunterschiede wurden bei der in der Arbeit durchgeführten relativen Quantifizierung an den Genen *RECK* und *PCA3* mit berücksichtigt.

Die hohe Reproduzierbarkeit der PCR-Messungen konnte anhand der seriellen und interseriellen Kontrollen auch von anderen Arbeitsgruppen belegt werden [25,83,107-109]. Da zusätzlich alle Bestimmungen der Proben aus malignem und korrespondierendem nichtmalignen Gewebe in einem Lauf erfolgten, wurden eventuelle Fehler zwischen verschiedenen Läufen eliminiert und somit die Zuverlässigkeit der Daten erhöht.

Meine Versuche am Prostatagewebe zeigten darüber hinaus, dass die Genexpression der überprüften Kandidaten-Referenzgene weder durch ihr Tumorstadium noch durch ihren Tumorgrad beeinflusst wurde. Auch für das Harnblasengewebe wurden keine geschlechts- oder stadienspezifischen Unterschiede in der Expression der Housekeeping-Gene festgestellt. Dies ist eine wichtige Vorbedingung für weiterführende Experimente. Andere Autoren haben dagegen verschiedene Genexpressionsunterschiede z. B. beim Harnblasenkarzinom gefunden [57]. Sie beschrieben, dass Unterschiede zwischen Ta- und T2-4 - Tumoren bestehen. Die Ursachen dazu sind bisher nicht geklärt. Es muss jedoch betont werden, dass in der angesprochenen Arbeit keine so detaillierten Angaben zur RNA-Qualität der eingesetzten Proben gemacht wurden wie in der hier vorliegenden Studie. Fehlerhafte Interpretationen sind somit nicht auszuschließen.

#### **4.4 Auswertung der Housekeeping-Gen-Daten zur Auswahl geeigneter Referenzgene**

Der Einsatz von Housekeeping-Genen für die Normalisierung bei Expressionsdaten ist eine permanent geführte Debatte [46,51] mit zahlreichen Für und Wider [28,39,46]. Wie in der Einleitung erwähnt, existieren kontroverse Resultate hinsichtlich der stabilen Expression von Housekeeping-Genen unter

verschiedenen Bedingungen. Gründe für diese Diskrepanzen sind nicht immer offensichtlich, selbst dann nicht, wenn gleiche Gewebematerialien untersucht wurden. Ganz allgemein wird jedoch inzwischen anerkannt, dass die Annahme einer allgemeinen stabilen Expression der Housekeeping-Gene falsch ist [45,46,50,58]. Die Expressionshöhe eines Housekeeping-Gens, das als Referenzgen benutzt werden soll, kann nicht nur zwischen verschiedenen Geweben sondern auch im gleichen Gewebe bei variablen Bedingungen Schwankungen aufweisen [34,35,110]. Wenn dies in der Vergangenheit nicht immer festgestellt wurde, liegt es in erster Linie daran, dass diese Unterschiede bei Messungen mit anderen Techniken (z. B. densitometrische Elektrophorese-Gel auswertungen, Northern-Blot-Analysen) aufgrund geringerer Sensitivität und Zuverlässigkeit nicht erkannt wurden.

Um zu prüfen, ob ein Housekeeping-Gen als Referenzgen für die Normalisierung eingesetzt werden kann, ist es notwendig, die Fragestellung für das jeweilige Experiment exakt zu definieren. Studien zur Ermittlung von Unterschieden der Genexpression, z. B. zwischen behandelten und unbehandelten Patienten, in Abhängigkeit vom Alter oder dem Geschlecht, aber auch vom Tumorstadium oder dem Tumorgrad, sollten berücksichtigen, dass nicht nur Zielgene, sondern auch Housekeeping-Gene unter diesen Bedingungen Schwankungen unterliegen können. Die Grundeigenschaft eines Referenzgens, um für Normalisierungszwecke verwendet zu werden, ist seine konstante, stabile Genexpression zwischen den jeweilig zu untersuchenden Merkmalen (Gruppen). Die Eignung möglicher Referenzgene sollte daher für die jeweilige Fragestellung erst geklärt werden, bevor die eigentliche Studie zur Genexpression eines Zielgens durchgeführt wird. Literaturdaten zeigen jedoch, dass in vielen Arbeiten auf Referenzgene zurückgegriffen wird, die diesen Grundsatzprinzipien nicht genügen bzw. sich unter anderen Bedingungen als geeignet erwiesen haben.

In meiner Arbeit war die Fragestellung, geeignete Referenzgene für Genexpressionsstudien im Karzinomgewebe der Prostata und der Harnblase zu finden. Mein Vorgehen beinhaltete hierbei zwei Schritte. Im ersten Schritt wurden entsprechend dem Studiendesign Anwärter von Referenzgenen hinsichtlich ihres Genexpressionsniveaus in den gepaarten malignen und nichtmalignen Proben bewertet (Abbildung 14, Seite 23; Abbildung 18, Seite 73). Gene mit signifikant unterschiedlichen Genexpressionsniveaus innerhalb dieser gepaarten Gruppen wurden deshalb sofort von der weiteren Bewertung als mögliche Referenzgene

ausgeschlossen. Bei drei der 16 Gene (*ACTB*, *RPL13A* und *HMBS*) wurden für das Prostatagewebe signifikante Genexpressionsunterschiede zwischen malignen und nichtmalignen Proben nachgewiesen. Für die Harnblase ergaben sich signifikante Expressionsunterschiede bei den Housekeeping-Genen *GAPD*, *G6PD* und *HMBS*. Daraus kann geschlossen werden, dass die jeweils drei genannten Gene im Tumorgewebe reguliert werden und für die Normalisierung von Zielgenen in den Prostata- bzw. Harnblasenkarzinomproben nicht verwendet werden können.

Die im Kapitel 1.3 beschriebene Verwendung von Referenzgenen in der Literatur gibt unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse Aufschluss über die Fülle von fragwürdigen Ergebnissen in einzelnen Literaturarbeiten. So sind die hier nachgewiesenen regulierten Gene *ACTB* für das Prostatakarzinom 20-mal und für das Harnblasenkarzinom *GAPD* 23-mal verwendet worden [64-66]. Der Einsatz dieser beiden Gene, die auch für Normalisierungszwecke bei anderen Organen benutzt werden, wird seit längerem immer wieder kritisiert [29,33,42,43,47,53]. Meine Ergebnisse zeigen eindeutig, dass sich *GAPD* für die Genexpressionsstudien des Prostata- und Harnblasenkarzinoms und auch *ACTB* für das Prostatakarzinom nicht als Referenzgene eignen. Ich führe diese klare Aussage auch darauf zurück, dass ich, zumindest für die Prostata, Mikrodisektionsproben verwendet habe. Dies ist in anderen Arbeiten nicht erfolgt, so dass sowohl „Kontaminationen“ mit nichtmalignem Zellmaterial wie auch mit stromalen Zellbestandteilen zu verfälschten Expressionsdaten geführt haben könnten. Außerdem konnten für die Gene *ACTB* und *GAPD* Pseudogene nachgewiesen werden [111-114], die eine Verwendung dieser beiden Gene zur Normalisierung der Genexpression zusätzlich schwieriger machen.

Die im ersten Schritt durchgeführte „Eingangsberechnung“ halte ich für unbedingt erforderlich, um regulierte Gene zu erkennen und sie von weiteren Berechnungen auszuschließen. Die Voraussetzungen für die Anwendung der gepaarten Students t-Teste war gegeben, da alle untersuchten Gene bis auf jeweils eine Ausnahme im Prostata- und Harnblasengewebe normalverteilte  $C_T$ -Werte aufwiesen. Sicherlich ist richtig, dass  $C_T$ -Werte den Schwellenzyklus in der exponentiellen Phase der charakteristischen PCR-Kinetik widerspiegeln und damit nicht als ideal normalverteilt beschrieben werden können [26]. Aber auch Berechnungen mit dem entsprechenden parameterfreien Wilcoxon-Test ergaben



identische Signifikanzen. Gleichzeitig muss betont werden, dass die im Folgenden eingesetzten Programme geNorm, NormFinder und BestKeeper zur Feststellung der besten Referenzgene nicht imstande waren, die regulierten Gene eigenständig ohne vorgeschalteten t-Test zu ermitteln.

Im anschließenden zweiten Schritt wurden dann die stabilsten Referenzgene oder die Referenzgenkombinationen zur Normalisierung von Zielgenen mit den Programmen geNorm, NormFinder und BestKeeper sowie dem Äquivalenztest ermittelt [50,56-58]. Nur die Anwendung dieser Programme zusammen mit einem vorgeschalteten gepaarten t-Test oder auch ungepaarten t-Test bei anderer Fragestellung ist daher eine geeignete Methode zur Identifizierung von Referenzgenen.

Die Suche nach geeigneten Referenz-Genen ist zeitraubend und kostenintensiv. Zur Vereinfachung der Suche wurden verschiedene Programme und Methoden vorgeschlagen [58,59,61]. Die Softwareprogramme geNorm und NormFinder wurden inzwischen auch in anderen Studien angewandt, um geeignete Referenzgene aus einer Vielzahl möglicher Kandidaten-Referenzgene herauszufiltern [45,57,115-119]. Die verwendeten Programme besitzen Vor- und Nachteile. Allen gemeinsam ist jedoch, dass sie einfach zu bedienen sind, wobei für den Äquivalenztest eigenständig ein MS-Excel-Arbeitsblatt mit Formeln erstellt werden musste. Mit den Programmen geNorm, NormFinder und BestKeeper war es, wie bereits betont, nicht möglich, die jeweils drei regulierten Gene zu identifizieren. Die Problematik, sich auf die Ergebnisse der drei Programme, ohne vorher durchgeführten gepaarten t-Test zu verlassen, wird auch dadurch deutlich, dass die Ergebnisse erst bei vorgeschalteten t-Tests identisch sind. Ansonsten werden über die Programme geNorm und NormFinder jeweils andere Referenzgene als „beste“ aufgelistet. Ebenfalls belegen andere Autoren, dass die beiden Programme bei Untersuchungen in anderen Geweben unterschiedliche Ergebnisse zeigen [57]. Erst in Kombination mit einem vorangestellten t-Test kann die Anwendung der beiden Programme für mRNA-Expressionsanalysen empfohlen werden, in denen verschiedene Untersuchungsgruppen verglichen werden.

Der Äquivalenztest stellt außerordentlich gut die Ergebnisse dar. Beim Äquivalenztest kann man die weniger stabilen Housekeeping-Gene im Wesentlichen schon durch Ansicht der Expressionsbereiche herausfiltern. Die graphische Darstellung bietet die Möglichkeit, sehr schnell zu erkennen, welche Gene nur kleine Varianzen aufweisen und damit als geeignete Referenzgene verwendet

werden können. Durch einseitige Abweichungen (von „Null“ verschieden) können unmittelbar Aussagen getroffen werden, in welcher Untersuchungsgruppe das mögliche Referenzgen höher oder niedriger exprimiert ist. Nachteile des Äquivalenztests sind jedoch, dass der Benutzer sich selber die Kriterien für die Stabilität von Genen erarbeiten muss. So werden von den Autoren zweifache oder dreifache Abweichungen des Konfidenzintervalls der Gene akzeptiert [58]. In diesem Fall kann die Normalisierung mit ihnen durchgeführt werden.

Die Berechnungsgrundlage des BestKeeper-Programms zur Auswahl von Referenzgenen basiert auf dem Mittelwert und der Standardabweichung der Gene und ist sehr einfach gehalten. Aus diesem Grund ist es dem Programm nicht möglich, eine Referenzgenauswahl aus Untergruppen (maligne vs. nichtmaligne) zu errechnen [120]. Das BestKeeper-Programm besitzt aber den Vorteil, dass es unter Beachtung von Effizienzunterschieden aller untersuchten Gene die automatische Normalisierung von Zielgenen ermöglicht.

Ich konnte für die im Rahmen meiner Arbeit untersuchten Kandidaten-Referenzgene nachweisen, dass mit allen angewendeten Berechnungsmethoden die Gene *HPRT1*, *ALAS1*, *K-ALPHA-1* und *SDHA* in der Prostata die beständigsten Genexpressionen besitzen. Diese Gene liegen jeweils innerhalb der drei willkürlich definierten Niveaus niedriger, mittlerer und hoher Genexpression (Abbildung 18, Seite 73). Somit stehen Referenzgene im Prostatakrebsgewebe bereit, die einen weiten Expressionsbereich möglicher Zielgene abdecken. Vor kurzem wurde *HPRT1* als universelles Einzel-Referenzgen für Genexpressionsstudien in verschiedenen Geweben in der Krebsforschung empfohlen [97]. Die Zielgennormalisierung, die nur auf einem Referenzgen basiert, wird jedoch auch als kritisch angesehen. So konnte nachgewiesen werden, dass die konventionelle Normalisierungsstrategie, basierend auf einem einzelnen Housekeeping-Gen, zu ungenauen Normalisierungswerten mit Abweichungen bis zum dreifachen in 25 % bzw. bis zum sechsfachen in 10 % der Fälle führen kann [50]. Bereits 1999 haben Suzuki et al. [29] darauf aufmerksam gemacht, dass 90 % der Transkriptionsanalysen, die in hochrangigen Zeitschriften publiziert wurden, nur auf ein Referenzgen normalisiert waren, wie z. B. auf die Gene *GAPD*, *ACTB* oder *18S-rRNA*, *28S-rRNA*. Meine Literaturrecherchen haben ebenfalls gezeigt, dass auch beim Prostata- und Harnblasenkarzinom selten mehrere Referenzgene zur Normalisierung der Genexpression eingesetzt wurden.

Es wird deshalb von verschiedenen Autoren vorgeschlagen, einen Normalisierungsfaktor, der mehrere einzelne geeignete Referenzgene zusammenfasst, zu verwenden [39,45,50,52]. Solch ein Normalisierungsfaktor hat den Vorteil einer zuverlässigeren Normalisierung. Dies gilt besonders auch für Situationen, in denen kein einzelnes optimales Referenzgen vorhanden bzw. noch nicht gefunden ist [57]. In der vorliegenden Arbeit erbrachte jedoch die Verwendung nur eines Referenzgens (*HPRT1*) für die relative Quantifizierung der *RECK*- und *PCA3*-Expression beim Prostatakarzinom ähnliche Ergebnisse wie bei Verwendung von zwei (*HPRT1* und *ALAS1*) oder drei (*HPRT1*, *ALAS1* und *K-ALPHA-1*) Referenzgenen (Abbildung 22, Seite 82 und Abbildung 23, Seite 83). Dies liegt sicher an der hohen Expressionsstabilität der *HPRT1*-mRNA im Prostatagewebe.

Die beständigsten Gene, die von geNorm, NormFinder, BestKeeper und dem Äquivalenztest für die Harnblase errechnet wurden, waren die Gene *SDHA*, *TBP*, *ACTB* und *HPRT1*. NormFinder errechnete für die Normalisierung mit nur einem Gen die *SDHA* als das entsprechende Referenzgen der Wahl. Hier sei aber nochmals darauf hingewiesen, dass ein einzelnes Gen sicherlich einfacher zu handhaben und billiger ist, dass aber die Zuverlässigkeit der Aussage durch die Verwendung von zwei oder drei Referenzgenen verbessert werden kann. Dies gilt auch für die Harnblase, da hier generell nicht so stabil exprimierte Gene gefunden werden konnten wie für die Prostata.

#### **4.5 Normalisierung von Zielgenen am Beispiel der Gene *RECK* und *PCA3* beim Prostatakarzinom**

Am Beispiel der Normalisierung der Genexpression von *RECK* und *PCA3* beim Prostatakarzinom habe ich die Bedeutung der Verwendung geeigneter Referenzgene dargelegt (Abbildung 22, Seite 82 und Abbildung 23, Seite 83).

Die eigentliche Normalisierung der Zielgene kann mit Hilfe der Faktoren, die in den benutzten Programmen errechnet wurden, danach über Quotientenbildungen in einem Excel-Kalkulationsblatt vorgenommen werden. Pfaffl et al. [106] haben kürzlich dafür das neue Programm „REST-384“ vorgestellt. Die Berechnungen mit dem REST-384-Programm sind zeitsparend und seine Anwendung kann sehr empfohlen werden.

Mit dem Beispiel der relativen Quantifizierung der *RECK*-mRNA-Expression wollte ich verdeutlichen, welchen Einfluss die Wahl von Referenzgenen auf die Genexpressionsergebnisse ausüben kann. *RECK* ist ein in der Plasmamembran verankerter Regulator der Matrix-Metalloproteinasen, die bei der Tumordinvasion und Metastasierung eine wichtige Rolle spielen [121]. Ohne hierbei weiter auf die Bedeutung des *RECKs* für das Prostatakarzinom einzugehen, zeigt die auf das Einzelgen *ACTB* relativierte Genexpression eindeutige Unterschiede zur Normalisierung mit den in den Programmen als geeignet verifizierten Referenzgenen. Dies unterstreicht noch einmal, dass der Wahl geeigneter Referenzgene eine besondere Bedeutung zukommt, um Fehlinterpretationen von Genexpressionsdaten zu vermeiden. So wurde auch von anderen Autoren bei Untersuchungen z. B. am Mammakarzinom oder an Zelllinien darauf hingewiesen, dass fehlerhafte Normalisierungen durch ungeeignete Referenzgene oder Normalisierungsstrategien verursacht wurden [45,50,119].

Mit einem Bezugsgen, das im nichtmalignen Gewebe stärker exprimiert wird als im malignen Gewebe, wird die relative Expression eines Zielgens im gesunden Gewebe unterschätzt und im Tumorgewebe überschätzt. Diese fehlerhafte Normalisierung wird am Beispiel der Normalisierung mit dem Gen *ACTB* verglichen zum Normalisierungsfaktor *geNorm3* deutlich (Abbildung 22, Seite 82). Ist dagegen die Expression des gewählten Referenzgens im malignen Gewebe höher als im gesunden Gewebe, wie dies beim Bezug der *RECK*-Expression auf *GAPD* oder *RPL13A* geschieht, so führt das ebenfalls zu einer falschen Normierung mit einer Genexpressionsüberschätzung im gesunden Gewebe.

Eine verminderte Expression von *RECK* im Tumorgewebe, wie ich sie mit den Normalisierungsfaktoren *geNorm3*, *geNorm2* und dem Bezugsgen *HPRT1* beim Prostatakarzinom errechnet habe, konnte auch in anderen humanen Geweben bzw. kürzlich auch bestätigend für die Prostata nachgewiesen werden [122-124]. Eine inzwischen eingereichte Arbeit, in der ich Koautor bin, bestätigt die verminderte Proteinexpression von *RECK* im Prostatakarzinomgewebe anhand der *RECK*-Immunhistochemie an 248 Prostatakarzinompatienten und 24 BPH-Patienten [125].

Als ein weiteres Gen habe ich das als prostatatumor-spezifisch anerkannte Gen *PCA3* gewählt [7]. Die hier gezeigte relative Expression für *PCA3* zeigt eine 12- bis 28-fache Überexpression im Prostatatumorgewebe. Dies steht in Übereinstimmung mit einer 10- bis 100-fachen Erhöhung, die im Prostatatumorgewebe

verglichen zu nichtmalignen Gewebe mit Hilfe von Northern-Blot-Analysen von anderen Autoren nachgewiesen wurde [7]. Alle hier zur Normalisierung der *PCA3*-Expression verwendeten Faktoren und Einzelgene weisen eine Überexpression von *PCA3* nach. Sie unterscheiden sich lediglich im Ausmaß der angezeigten Überexpression. Aufgrund des hohen Unterschieds der *PCA3*-Expression zwischen malignem und nichtmalignem Prostatagewebe verlieren dazu relativ geringe Schwankungen zwischen den Referenzgenen und Normalisierungsfaktoren an Einfluss auf das Ergebnis. Obwohl bei sehr starken Überexpressionen (aber auch Unterexpressionen) die Zielgenexpression grundsätzlich nicht falsch bewertet wird, sind die Unterschiede zwischen den Ergebnissen mit geeigneten Referenzgenen bzw. Normalisierungsfaktoren und einzelnen nicht geeigneten Referenzgenen deutlich erkennbar. Da solch große Expressionsunterschiede eher selten sind, sollten zur relativen Quantifizierung ausschließlich, und entsprechend der jeweiligen Fragestellung, geeignete Referenzgene oder Normalisierungsfaktoren verwendet werden.

Genexpressionsstudien an Prostata- und Harnblasenkarzinomen verfolgen das Ziel, die Diagnostik und Therapie der Erkrankung zu optimieren. Die genaue Kenntnis von Expressionsunterschieden auf mRNA-Niveau hilft dabei, eventuell neue Marker zur Diagnostik und Prognose zu entwickeln. In den letzten Jahren wurde aufgrund der enormen Vielfalt potentieller Biomarker, die oftmals zahlreiche Signalwege charakterisieren offensichtlich, dass einzelne Biomarker nicht die ganze Informationsvielfalt von Diagnose, Verlauf und Behandlungsentwicklung einer Erkrankung widerspiegeln können. Die gleichzeitige Berücksichtigung und Bewertung mehrerer Marker ist hierfür notwendig. Dies hat die Anwendung artifizieller neuronaler Netzwerke bereits gezeigt [126].

Expressionsstudien sind der erste Schritt, um potentielle neue Biomarker im Gewebe aber auch in Körperflüssigkeiten zu erkennen. Am Beispiel des *PCA3*-Nachweises im Harn zur Erkennung eines Prostatakarzinoms wird dies deutlich [9]. Die stark erhöhte Expression dieses Gens im Prostatakarzinomgewebe, wie ich sie vorhergehend beschrieben habe, war der Anlass, dieses Gen im Harn nach der digital-rektalen Palpation von Patienten zu untersuchen [9]. Erste Daten dazu sind offensichtlich ermutigend, so dass bereits an einem kommerziellen Test gearbeitet wird [11].

Weiterhin sind diese Expressionsstudien vor allem auch dazu geeignet, Zielstrukturen im jeweiligen Organ zu erkennen, die als mögliche „Angriffsziele“ von Medikamenten in Frage kommen [10].

#### 4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Als Schlussfolgerung der hier vorgestellten Untersuchungen gilt für Expressionsstudien beim Prostatakarzinom, dass die drei beständigsten Gene *HPRT1*, *ALAS1* und *K-ALPHA-1* für relative Quantifizierungen von Zielgenen verwendet werden können. Um eine verbesserte Zuverlässigkeit der Normalisierung zu erreichen, sollte mit zwei Genen (*HPRT1* und *ALAS1*) oder mit drei Genen (*HPRT1*, *ALAS1* und *K-ALPHA-1*) eine relative Quantifizierung durchgeführt werden. Nur in Ausnahmefällen (z. B. begrenztes Probenmaterial) sollte die Normalisierung nur mit einem Gen, mit der *HPRT1*, durchgeführt werden. Für Harnblasenstudien sollten die Gene *SDHA* und *TBP*, die auch unterschiedliche Genexpressionsniveaus aufweisen, verwendet werden. Mit den hier empfohlenen Referenzgenen können relative Quantifizierungen an Zielgenen im Prostata- und Harnblasengewebe mit größerer Zuverlässigkeit durchgeführt werden als bisher.

Darüber hinaus kann die in dieser Arbeit vorgestellte Methodik zur Identifizierung von Referenzgenen, von der Gewebegewinnung bis zur Eignungsbeurteilung der Kandidatengene mit vorangestelltem t-Test und nachfolgend durchgeführten Evaluierungsprogrammen, auch für andere Organsysteme angewendet werden.

Die Betrachtungen zur Validierung der Referenzgene im Prostata- und Harnblasengewebe haben wichtige neue Erkenntnisse gebracht, zumal in der Literatur praktisch wenig zuverlässige Angaben und auch Arbeiten über die Verwendung von Referenzgenen für Expressionsstudien bei beiden Karzinomen vorhanden waren. Die gegebenen Empfehlungen zum Gebrauch der Referenzgene werden in Forschung und Diagnostik bei Genexpressionsstudien des Prostata- und Harnblasenkarzinoms Anwendung finden.

Ich hoffe, mit meinen Untersuchungen dazu beigetragen zu haben, zahlreiche offene Fragen nach geeigneten Referenzgenen für Genexpressionsstudien beim Prostata- und Harnblasenkarzinom beantwortet zu haben.