

5 Zusammenfassung

Für Genexpressionsstudien, die mittels der RT-PCR durchgeführt werden, werden geeignete Referenzgene zur relativen Quantifizierung von Zielgenen benötigt.

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde der Eignung von Housekeeping-Genen für Expressionsstudien im Prostata- und Harnblasenkrebsgewebe nur unzureichend Rechnung getragen. Die Zielsetzung dieser Arbeit war es deshalb, geeignete Referenzgene aus einer Auswahl von 16 Kandidatengen für die relative Quantifizierung bei Genexpressionsstudien auszuwählen. In gepaarten mikrodisssezierten malignen und nichtmalignen Prostataprobe, die von 17 unbehandelten Patienten mit einem Prostatakarzinom nach radikaler Prostatektomie gewonnen wurden, wurde mittels RT-PCR die mRNA-Expression der Gene *ACTB*, *ALAS1*, *ALB*, *B2M*, *G6PD*, *GAPD*, *HMBS*, *HPRT1*, *K-ALPHA-1*, *POLR2A*, *PPIA*, *RPL13A*, *SDHA*, *TBP*, *UBC* und *YWHAZ* untersucht. Für die Suche nach geeigneten Referenzgenen beim Harnblasenkarzinom wurden an gepaarten malignen und nichtmalignen Gewebeprobe, die von 14 Patienten mit einem Harnblasenkarzinom stammten, die Genexpression der neun Gene *ACTB*, *ALAS1*, *G6PD*, *GAPD*, *HMBS*, *HPRT1*, *K-ALPHA-1*, *SDHA* und *TBP* ermittelt.

Nach der RNA-Isolierung und der RNA-Integritätskontrolle mit dem Agilent-2100-Bioanalyser, wurden die Echtzeit-RT-PCRs mit dem ABI-Prism-7700 Sequence-Detection-System bzw. dem Roche-LightCycler[®]-Instrument durchgeführt.

Es wurden nur solche RNA-Proben verwendet, die einen hohen Reinheitsgrad und eine hohe Integrität besaßen. Die untersuchten Gene lagen in einem breiten Expressionsbereich mit PCR-Zyklen zwischen 16 und 37 für die Prostata bzw. 20 und 34 Zyklen für die Harnblase. Bei der Prostata unterschieden sich die Expressionshöhen nicht signifikant ($P > 0,05$) von pT2- und pT3-Tumorproben bzw. von Proben mit einem Gleason-Grad ≤ 3 und ≥ 4 und von Proben mit Gleason-Scores (Gleason-Gesamtpunktzahl) < 7 und ≥ 7 . Für die Harnblase konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Geschlecht und Tumorstadium festgestellt werden.

Zwischen den gepaarten malignen und nichtmalignen Prostatagewebeproben zeigten die Gene *ACTB*, *RPL13A* und *HMBS* signifikante Unterschiede (t-Test, $P < 0,02$) in ihren Expressionshöhen. Für Harnblasengewebeproben betraf

dies die Gene *GAPD*, *G6PD* und *HMBS* ($P < 0,04$). Bei den anderen untersuchten Genen bestanden keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Computerprogramme geNorm, NormFinder und BestKeeper sowie der Äquivalenztest wurden verwendet, um die am besten geeigneten Bezugsgene zu identifizieren.

Für die Prostata errechneten alle Computermethoden *HPRT1*, *ALAS1*, *SDHA* und *K-ALPHA-1* als die stabilsten Gene. Diese Gene umfassen einen ausgedehnten Expressionsbereich. Als Quantifizierungsbeispiel wurde die Expression der Zielgene *RECK* und *PCA3*, normalisiert mit der *HPRT1* als Einzelgen und mit den Normalisierungsfaktoren aus der Kombination von zwei oder drei Referenzgenen sowie mit den regulierten, instabilen Genen *ACTB* und *RPL13A*, dargestellt. Bei der relativen Quantifizierung der Gene *RECK* und *PCA3* wurde verdeutlicht, wie wichtig der Gebrauch geeigneter Referenzgene ist, um fehlerhafte Normalisierungen an Zielgenen in Prostata-Genexpressionsstudien zu vermeiden. In der hier vorliegenden Studie genügte für eine korrekte Normalisierung der Gebrauch des Einzelgens *HPRT1*. Jedoch sind Normalisierungen mit zwei Genen (*HPRT1* und *ALAS1*) oder allen drei Genen (*HPRT1*, *ALAS1* und *K-ALPHA-1*) zu empfehlen, um eine höhere Zuverlässigkeit der Daten zu erreichen.

Im Harnblasengewebe wurden die Gene *SDHA*, *TBP* und *ACTB* als die stabilsten Gene für eine relative Quantifizierung ermittelt. Sie repräsentieren höhere und niedrigere Expressionsniveaus. Für eine praktische und zuverlässige Normalisierung von Zielgenen sollte in Harnblasenkarzinomstudien ein Normalisierungsfaktor, der aus den Referenzgenen *SDHA* und *TBP* besteht, verwendet werden.