

Aus der Klinik für Urologie, Charité Campus Mitte
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Identifikation und Validierung von endogenen
Referenzgenen für Genexpressionsanalysen des
Prostata- und Harnblasenkarzinoms mit Hilfe der
quantitativen Echtzeit-RT-PCR

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Falk Ohl

aus Berlin

Gutachter:

1. Prof. Dr. Klaus Jung
2. Prof. Dr. Ralf Lichtinghagen
3. PD. Dr. Frank König

Datum der Promotion: 23.06.2006

Meiner Familie

Teile dieser Dissertation wurden in folgenden Artikeln publiziert bzw. sind zur Publikation angenommen:

1. Geheeb M, Rabien A, Ohl F, Jung M, Jung K.
Misinterpretation of quantitative RT-PCR results: A comment on the article by Ohashi et al. "RNA degradation in human breast tissue after surgical removal: A time course study" [Letter to the Editor].
Exp Mol Pathol 2005;78:263-264
2. Jung M, Xu C, Ohl F, Mager AK, Jung K.
Transcriptor first strand cDNA synthesis Kit: efficient and fast - a comparison to other kits.
Biochemica (Roche Applied Science) 2005; 2:16-18
3. Ohl F, Jung M, Xu C, Stephan C, Rabien A, Burckhardt M, Nitsche A, Kristiansen G, Loening SA, Radonic A, Jung K.
Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization?
J Mol Med 2005;83:1014-24
4. Ohl F, Jung M, Radonic A, Sachs MD, Nitsche A, Loening SA, Jung K.
Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies in human bladder cancer.
J Urol 2005; akzeptiert im September 2005, erscheint im April 2006
5. Rabien A, Burkhardt M, Jung M, Fritzsche F, Ohl F, Ringsdorf M, Schick Tanz H, Loening SA, Kristiansen G, Jung K.
Decreased expression of the tumor suppressor RECK: a novel long-time prognosis factor for prostate cancer.
Prostate 2005; eingereicht im November 2005

Inhaltsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V

1 Einleitung 1

1.1	Allgemeine Einführung	1
1.2	Theoretischer Teil.....	2
1.2.1	Das Prostatakarzinom	2
1.2.2	Das Harnblasenkarzinom	4
1.2.3	Expressionsanalysen mit Hilfe der RT-PCR	5
1.3	Literaturrecherche zu Referenzgenen beim Prostata- und Harnblasenkarzinom.....	14
1.4	Problemstellung und Zielsetzungen der Arbeit.....	15

2 Material und Methoden..... 18

2.1	Patientenkollektiv und Probenmaterial	18
2.1.1	Patienten mit Prostatakarzinom: Probengewinnung.....	18
2.1.2	Patienten mit Harnblasenkarzinom: Probengewinnung.....	19
2.1.3	Zelllinien und Zellkultivierung	20
2.2	RNA-Isolierung.....	21
2.2.1	Quantitative Nukleinsäureanalyse	22
2.2.2	Qualitative RNA-Analytik	23
2.3	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	25
2.4	Quantitative Echtzeit-PCR.....	27
2.4.1	Geräte für die Echtzeit-PCR.....	27
2.4.2	Methoden der Echtzeit-PCR.....	28
2.4.3	Primer- und Sondenauswahl für die Echtzeit-PCR.....	31
2.4.4	Bestimmung der PCR-Effizienz	34
2.4.5	Bestimmung der Genexpressionen im Prostatagewebe.....	37
2.4.6	Bestimmung der Genexpressionen im Harnblasengewebe.....	39
2.4.7	Überprüfung der PCR-Produkte mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese ...	41
2.5	Datenverarbeitung und Statistik	42
2.5.1	Deskriptive Statistik	43
2.5.2	GeNorm.....	44
2.5.3	NormFinder	45
2.5.4	BestKeeper.....	46
2.5.5	Äquivalenztest.....	47
2.5.6	Relative Quantifizierung	48
2.6	Übersicht der Arbeitsmethoden	49

3	Ergebnisse	51
3.1	Qualitätssicherung der präanalytischen und analytischen Studienphasen	51
3.1.1	Charakterisierung der isolierten RNA-Proben	51
3.1.2	Quantifizierung der RNA.....	54
3.1.3	Nachweis der Spezifität der PCR-Amplifikate.....	56
3.1.4	Präzisionskontrolle der PCR-Messungen	61
3.2	Identifizierung von Referenzgenen für das Prostatagewebe	61
3.2.1	Quantifizierung der Genexpression der Housekeeping-Gene im malignen und nichtmalignen Prostatagewebe	61
3.2.2	Beurteilung der Genexpressionsstabilität der Housekeeping-Gene als Referenzgene für das Prostatagewebe	64
3.2.3	Referenzgene für das Prostatagewebe	70
3.3	Identifizierung von Referenzgenen für das Harnblasengewebe	72
3.3.1	Quantifizierung der Genexpression der Housekeeping-Gene im malignen und nichtmalignen Harnblasengewebe	72
3.3.2	Beurteilung der Genexpressionsstabilität der Housekeeping-Gene als Referenzgene für das Harnblasengewebe	74
3.3.3	Referenzgene für das Harnblasengewebe	79
3.4	Relative Quantifizierung von Zielgenen für das Prostatagewebe	81
4	Diskussion	84
4.1	Gewinnung des zu untersuchenden Gewebematerials	85
4.2	Qualitätskontrolle der isolierten RNA für Genexpressionsstudien	86
4.3	Echtzeit-RT-PCR.....	88
4.4	Auswertung der Housekeeping-Gen-Daten zur Auswahl geeigneter Referenzgene.....	89
4.5	Normalisierung von Zielgenen am Beispiel der Gene <i>RECK</i> und <i>PCA3</i> beim Prostatakarzinom.....	94
4.6	Schlussfolgerung und Ausblick.....	97
5	Zusammenfassung	98
6	Literaturverzeichnis	100
	Anhang	111
	Danksagungen.....	111
	Erklärung an Eides Statt	112
	Lebenslauf von Falk Ohl	113

Tabelle 1	Beispiel zur relativen Quantifizierung der Genexpression von Zielgenen mittels Referenzgenen.....	9
Tabelle 2	Funktionen von Housekeeping-Genen in eukaryontischen Zellen und deren Genlokalisierung.....	11
Tabelle 3	Medline-Recherche: Nutzung von Referenzgenen bei Genexpressionsstudien des Prostatakarzinoms.....	14
Tabelle 4	Medline-Recherche: Nutzung von Referenzgenen bei Genexpressionsstudien des Harnblasenkarzinoms.....	15
Tabelle 5	Pipettierschema und UNO-Thermoblock-Programmierung zur reversen Transkription der isolierten RNA aus dem Gewebe der Prostata	26
Tabelle 6	Pipettierschema und UNO-Thermoblock-Programmierung zur reversen Transkription der isolierten RNA aus dem Gewebe der Harnblase.....	27
Tabelle 7	Primer- und Sondenübersicht der Kandidaten-Referenzgene und Zielgene.....	33
Tabelle 8	PCR-Einstellungen für die Untersuchungen zu den Housekeeping- und Zielgenen der Prostata	38
Tabelle 9	Reagenzien für die PCR (LightCycler-FastStart-DNA-Master ^{Plus} Hybridization Probes)	40
Tabelle 10	Reagenzien für die PCR (QuantiTect TM -SYBR [®] Green).....	40
Tabelle 11	PCR-Einstellungen für die Untersuchungen zu den Housekeeping-Genen der Harnblase	41
Tabelle 12	Ermittlung der am besten geeigneten Referenzgene für Expressionsuntersuchungen beim Prostatakarzinom mit dem Programm NormFinder.....	67
Tabelle 13	Ermittlung der am besten geeigneten Referenzgene für Expressionsuntersuchungen beim Prostatakarzinom mit dem Programm BestKeeper.....	68
Tabelle 14	Ermittlung der am besten geeigneten Referenzgene für Expressionsuntersuchungen beim Harnblasenkarzinom mit dem Programm NormFinder.....	76
Tabelle 15	Ermittlung der am besten geeigneten Referenzgene für Expressionsuntersuchungen beim Harnblasenkarzinom mit dem Programm BestKeeper.....	77

Abbildung 1	RNA-Reinheits- und Konzentrationsbestimmung mit dem NanoDrop®-Spektrophotometer an einer isolierten RNA-Probe aus Harnblasengewebe....	23
Abbildung 2	Bildschirmansicht zur Auswertung der Daten des Agilent-2100-Bioanalyzers..	24
Abbildung 3	LightCycler®-Standardkurve zur Quantifizierung und PCR-Effizienzermittlung des Gens <i>K-ALPHA-1</i> berechnet über eine cDNA-Verdünnungsreihe einer RT4-Harnblasenkarzinomzelllinie	36
Abbildung 4	PCR-Reaktionsverläufe zur Quantifizierung des Gens <i>ACTB</i> im Gewebe der Harnblase (Proben 1 bis 26) mit Hilfe des LightCyclers®	37
Abbildung 5	Bildschirmansicht zum NormFinder-Programm	45
Abbildung 6	Flussdiagramm für Genexpressionsanalysen auf RNA-Ebene.....	50
Abbildung 7	Elektropherogramme zur RIN-Klassifikation	52
Abbildung 8	Gelähnliche Darstellung des Agilent-2100-Bioanalyzer	53
Abbildung 9	RNA integrity Number (RIN) für RNA-Proben der Prostata und Harnblase	54
Abbildung 10	Methodenvergleich der RNA-Bestimmungen an zwei Messgeräten.....	55
Abbildung 11	PCR-Produktkontrolle für das Gen <i>HMBS</i> mit dem LightCycler® durch eine Schmelztemperaturanalyse	57
Abbildung 12	Molekulargewichtsbestimmungen der PCR-Produkte an Proben der Harnblase mittels Agarose-Gelelektrophorese (2%iges Agarosegel)	59
Abbildung 13	Molekulargewichtsbestimmungen der PCR-Produkte für die <i>SDHA</i> an verschiedenen Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese (4%iges Agarosegel)	60
Abbildung 14	Expressionshöhen der Housekeeping-Gene im Gewebe der Prostata	63
Abbildung 15	Ermittlung der am besten geeigneten Referenzgene für Expressionsuntersuchungen beim Prostatakarzinom mit dem Programm geNorm.....	65
Abbildung 16	Ermittlung der am besten geeigneten Referenzgene für Expressionsuntersuchungen beim Prostatakarzinom mit dem Äquivalenztest.....	70
Abbildung 17	Schnittmengendiagramm der Evaluierungsprogramme für die Identifizierung von Referenzgenen für Expressionsstudien beim Prostatakarzinom	71
Abbildung 18	Expressionshöhen der Housekeeping-Gene im Gewebe der Harnblase	73
Abbildung 19	Ermittlung der am besten geeigneten Referenzgene für Expressionsuntersuchungen beim Harnblasenkarzinom mit dem Programm geNorm.....	75
Abbildung 20	Ermittlung der am besten geeigneten Referenzgene für Expressionsuntersuchungen beim Harnblasenkarzinom mit dem Äquivalenztest.....	79
Abbildung 21	Schnittmengendiagramm der Evaluierungsprogramme für die Identifizierung von Referenzgenen für Expressionsstudien beim Harnblasenkarzinom	80
Abbildung 22	Relative <i>RECK</i> -Expression in malignen und nichtmalignen Prostatagewebe in Abhängigkeit von Art der Normalisierung	82
Abbildung 23	Relative <i>PCA3</i> -Expression in malignen und nichtmalignen Prostatagewebe in Abhängigkeit von Art der Normalisierung	83

€	Element aus...
^	und
∩	und, Schnittmenge von...
28S/18S	S = S vedberg-Einheit
a	A denin
ATCC	A merican T ype C ulture C ollection
bp	B asenpaare
BPH	B enigne P rostata H yperplasie
BPH-1	Prostatazelllinie
BTA	B lasentumorantigen
c	C ytosin
cDNA	complementary D N A
C _T , C _P	threshold c ycle, c rossing p oint (Schwellenzyklus, Schnittpunkt)
CV	C oefficient of v ariation (Variationskoeffizient)
Cy5.5	Cy5.5 -Akzeptor-Fluorophor
Da	D alton
DEPC	D iethyl p yrocarbonat
dest.	destilliert
DNA	D esoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	D esoxyribonuklease
dNTP	D esoxnukleotid t riphosphat
DSMZ	D eutsche S ammlung von M ikroorganismen und Z ellkulturen GmbH
DU 145	Prostatakarzinomzelllinie
E.coli	E scherichia c oli
EDTA	E thylendiamintetraacetat
Fa.	F irma
FAM	6-Carboxy-fluoreszein
FKS	F etales K älberserum
FL	F luoreszein
FRET	F luoreszenz- R esonanz- E nergie- T ransfer
g	Erdbeschleunigung ($\approx 9,81 \text{ m/s}^2$)
g	1. G ramm; 2. G uanin
G	histopathologisches G radung
HCV29	Harnblasenzelllinie
HPLC	H igh P erformance L iquid C hromatography
J82	Harnblasenkarzinomzelllinie
kb	k ilo B asen
LNCaP	Prostatakarzinomzelllinie
M	Fern m etastasen, Bestandteil der TNM-Klassifikation
M	M -Wert, paarweise Variation im geNorm-Programm
M	m olar
min	M inute
mM	m illimolar

MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	Messenger-RNA
N	Nodulus , Lymphknotenmetastasen, Bestandteil der TNM-Klassifikation
OD _{nm}	Optische Dichte , Index nm gibt die Wellenlänge in Nanometer an
P	Irrtumswahrscheinlichkeit, Signifikanz
PBS	Phosphate Buffered Saline (Natriumphosphat-Puffer)
PC3	Prostatakarzinomzelllinie
PCA3	Prostate cancer antigen 3
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	potentia Hydrogenii ; negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionen-Konz.
PSA	Prostata spezifisches Antigen
R	Korrelationskoeffizient
R	Residualtumor
RIN	RNA integrity number (RNA-Integritätszahl)
RECK	Reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
RT	Reverse Transkriptase
RT112	Harnblasenkarzinomzelllinie
RT4	Harnblasenkarzinomzelllinie
RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
S.E.	Standard Error (Standardfehler)
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
ss	single stranded (einzelsträngig)
T	Tumor , Bestandteil der TNM-Klassifikation
t	Thymin
T	TAMRA markiertes Thymin
TAMRA	6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin
TBE	Tris-Borat-EDTA -Puffer
TCC	Transitional Cell Carcinom (Urothelkarzinom)
TF	Transkriptionsfaktor
TNM	TNM-Klassifikation , siehe T, N, M
Tris	Tris -(hydroxymethyl)-aminomethan
TURB	Transurethrale Resektion der Blase
u	Uracil
U	Unit (Enzymeinheit)
UICC	Union International contre le Cancer (International Union Against Cancer)
VBA	Visual Basic Application (Visual Basic Anwendung)
V _{NF}	Normalisierungsfaktor im geNorm-Programm
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Weight (Gewicht) pro Volumen