

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 eoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure) |
| DNase | D eoxyribonuklease |
| 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 |