



**Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**  
**Medizinische Fakultät Mannheim**  
**Dissertations-Kurzfassung**

**Evaluierung und Validierung geeigneter Referenzgene für  
Genexpressionsanalysen im Urothelkarzinom der Harnblase in  
archivierten Gewebeproben**

Autor: David Jurgowski  
Institut / Klinik: Klinik für Urologie und Urochirurgie  
Doktorvater: Prof. Dr. P. Erben

Das Harnblasenkarzinom (BC) gehört in Deutschland zu den häufigsten Krebserkrankungen und verursacht neben individuellem Leid hohe Kosten für das Gesundheitssystem. Um Diagnostik, Prognoseabschätzung und Therapie zu verbessern, besteht Forschungsbedarf hinsichtlich standardisierter molekularer Marker und Genexpressionsprofilen. Hierbei ist die RT-qPCR eine etablierte Methode für die Analyse von Genexpressionen. Um den Einfluss nicht-biologischer Variation zu berücksichtigen, müssen die erhobenen Daten normalisiert werden. Hierzu kann der Vergleich der Zielgenexpression mit sogenannten Referenzgenen (RG) oder auch *Housekeeping Genes* erfolgen. Diese sollten über verschiedene Tumorstadien hinweg unverändert exprimiert werden. So kann das aus qualitativen Methoden übernommene RG *Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase* (GAPDH) bei Verwendung als RG zu falschen Schlussfolgerungen führen. Für die molekulare Forschung im BC sind Formalin-fixierte in Paraffin-eingebettete (FFPE) Patientenproben als pathologisches Routinegewebe von Interesse, wobei die RNA einer Degradation unterworfen ist. Bisherige RG-Evaluationen zum BC wurden vor allem mit frisch gewonnenen Patientenproben durchgeführt. Zur Ermittlung der Genexpressionsstabilität von RG wurden häufig die Algorithmen geNorm, NormFinder und BestKeeper zitiert und daher in der vorliegenden Arbeit angewendet. BestKeeper konnte wegen der heterogenen Datenlage nicht für die Analyse verwendet werden.

Nach pathologischer Referenzbeurteilung und Makrodissektion wurde RNA aus 43 FFPE-Patientenproben isoliert, darunter 9 Harnblasennormalgewebe, 14 nicht-muskelinvasive BC und 20 muskel-invasive BC. Die RNA wurde mit zwei unterschiedlichen Protokollen (M-MLV und SuperScriptIII) in komplementäre DNA umgeschrieben und anschließend die Expression von RG und Zielgenen mittels Hydrolyse-Sonden in der quantitativen PCR gemessen. Das SuperScriptIII-Protokoll ergab eine höhere Signalausbeute als M-MLV. Mit einer zugegebenen *Spike* Fremd-RNA wurde auf Enzyminhibition kontrolliert. Die Analyse zeigte einen Einfluss des Probenalters auf die Expressionsmessung. Die Normalisierung auf eine identische RNA-Eingabemenge war damit ungenau und unterstrich die Bedeutung der relativen Quantifizierung mittels stabil exprimierter RG. Die Evaluation von 10 publizierten RG (*Actin*, *cytoplasmic 1*, ACTB, *Beta-2-microglobulin*, B2M, *Calmodulin-2*, CALM2, GAPDH, *Beta-glucuronidase*, GUSB, *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase*, HPRT1, *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A*, PPIA, *60S ribosomal protein L37a*, RPL37A, *Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial*, SDHA, *TATA-box-binding protein*, TBP) ergab, dass GUSB, CALM2 und RPL37A die drei stabilsten in der untersuchten Kohorte waren. Diese können für die Normalisierung von künftigen RT-qPCR-Experimenten in FFPE-Proben des BC vorgeschlagen werden. Der Vergleich der in dieser Arbeit als stabil ermittelten RG mit bereits publizierten Evaluationen zum BC ergab zum Teil Überschneidungen aber auch Unterschiede, weshalb RG-Evaluationen experimentell bezogen durchgeführt werden sollten. Übereinstimmend mit der Literatur war GAPDH ein instabiles RG und kann nicht für die Normalisierung im BC empfohlen werden. Die Verwendung aus einer Kombination mehrerer RG als Normalisierungsfaktor reduzierte die Streuung und wird von Leitlinien angeraten. Die normalisierte Genexpression der Zielgene *Proliferationsmarker Ki-67* (MKI67), *Keratin 5* (KRT5) und *Keratin 20* (KRT20) unterschied sich in den Patientenproben deutlich je nach verwendetem RG beziehungsweise Normalisierungsfaktor. Rückschlüsse auf Proliferationsaktivität sowie eine mögliche Zuordnung zu basalen oder luminalen Genexpressionsprofilen waren somit abhängig von der Verwendung stabil ermittelter RG. Um diese Ergebnisse zu validieren sind weitere Untersuchungen in größeren Patientenkohorten notwendig.