

Received: 2007.07.03
Accepted: 2007.09.14
Published: 2007.09.28

Geny metabolizmu podstawowego jako geny referencyjne w ilościowym oznaczaniu ekspresji genów metodą real-time PCR*

Housekeeping genes as a reference in quantitative real-time RT-PCR

**Tomasz Romanowski, Aleksandra Markiewicz, Natalia Bednarz,
Krzysztof Piotr Bielawski**

Pracownia Diagnostyki Molekularnej, Katedra Biotechnologii Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku

Streszczenie

Określenie podstawowego poziomu ekspresji genów w zdrowych tkankach jest niezbędne w analizie i interpretacji wyników pozyskanych z tkanek patologicznych. Zastosowanie metody real-time RT-PCR, pozwalającej na obserwację procesu powielania materiału genetycznego w czasie rzeczywistym, umożliwia szybkie i dokładne wykonanie pomiaru ilości materiału genetycznego obecnego w próbce. Podczas kolejnych etapów przygotowywania próby w celu oznaczenia liczby transkryptów badanych genów, może jednak dochodzić do zmian ilości materiału genetycznego, których najczęstszą przyczyną jest różna wydajność izolacji mRNA oraz odwrotnej transkrypcji w poszczególnych próbach. Stąd potrzeba normalizacji wyników między analizowanymi próbkami, poprzez wykorzystanie genu referencyjnego (normalizującego). Oznaczenie ilościowe, najczęściej w odrębnych reakcjach, genu badanego i normalizującego w danej próbce daje pewność, że wszelkie zmiany w ilości materiału genetycznego podczas badania dotyczą w takim samym stopniu obydwu genów. Aby gen referencyjny był dogodnym wzorcem, w stosunku do którego można oznaczać ilości mRNA innych genów, musi charakteryzować się stałym, nieregulowanym poziomem ekspresji w danej tkance. Geny metabolizmu podstawowego, uznawane za spełniające ten warunek, są powszechnie stosowane jako geny normalizujące. Badania ich ekspresji wykazały jednak istniejące różnice w liczbie transkryptów w tkankach zdrowych i zmienionych chorobowo, oraz zmiany ekspresji genów metabolizmu podstawowego w tkankach pod wpływem podawanych leków i innych substancji chemicznych. Celem pracy jest ukazanie różnic oraz wskazanie czynników, które wpływają na ekspresję genów metabolizmu podstawowego.

Słowa kluczowe:

geny metabolizmu podstawowego • geny referencyjne • PCR w czasie rzeczywistym • ekspresja genów

Summary

The determination of gene expression levels in normal tissue is necessary for the analysis and interpretation of results of gene profiling studies in pathological samples. With the real-time reverse transcription-PCR technique, which enables one to detect the amplification rate during

* Praca sfinansowana ze środków Europejskiej Sieci Doskonałości VIRGIL wspieranej grantem 6. Programu Ramowego UE (LSHM-CT-2004-503359).

the process, assessment of the amount of gene transcript is fast and accurate. The most important problem in this type of analysis is the variability in the amount of genetic material between samples, caused mostly by changes in the efficiency of mRNA isolation and reverse transcription. Therefore, a reference gene to normalize sample variations is required. Quantification of the mRNA of the target and the reference gene in the sample ensures that the changes in transcript levels will influence both genes equally. To be used as a reference, a gene should show stable, unregulated expression in the analyzed sample type. Housekeeping genes (HKGs) fulfill this criterion and they are used for normalization purposes in most expression studies. However, transcript levels of HKGs can vary between different types of tissue (normal and pathological samples) and under different treatment conditions (drugs and chemicals). The aim of this study was to show the differences and the factors which can influence housekeeping gene expressions.

Key words: housekeeping genes • reference genes • real-time PCR • gene expression

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/11284.pdf

Word count: 4137
Tables: 2
Figures: 3
References: 65

Adres autora: dr n. med. Krzysztof Piotr Bielawski, prof. UG, Pracownia Diagnostyki Molekularnej, Katedra Biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk; bielawski@biotech.ug.gda.pl

Wykaz skrótów: **B2M** – gen kodujący β_2 -mikroglobulinę (β_2 -microglobulin); **ACTB** – gen kodujący β -aktynę (β -actin); **Ct** – cykl graniczny (threshold cycle); **CYC** – gen kodujący cyklofilinę (cyclophilin); **E** – wydajność reakcji; **Real-time PCR** – łańcuchowa reakcja polimerazy z obrazowaniem w czasie rzeczywistym (real-time polymerase chain reaction); **GAPDH** – gen kodujący dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase); **GnRHa** – agonista hormonu uwalniającego gonadotropinę (gonadotropin releasing hormone agonist); **HKG** – geny metabolizmu podstawowego (housekeeping gene); **HPRT** – gen kodujący fosforybozylotransferazę hipoksantynową (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase); **MDR-1** – gen wielolekooporności 1 (multiple drug resistance-1); **RT** – odwrotna transkrypcja (reverse transcription).

WSTĘP

W ostatnich latach w badaniach molekularnych organizmów żywych bardzo popularna stała się analiza transkryptomu, która umożliwia poznanie profilu ekspresji genów w komórkach. Zgłębienie różnic między komórką zdrową i tą, w której ekspresja genów jest zaburzona, umożliwia ustalenie mechanizmów różnych chorób, w tym powszechnie dziś występujących nowotworów [51,52]. Technika stosowaną najczęściej w tego typu analizie jest odwrotna transkrypcja (reverse transcription – RT) poprzedzająca łańcuchową reakcją polimerazy z obrazowaniem w czasie rzeczywistym (real-time polymerase chain reaction), dalej zwana w skrócie metodą real-time RT-PCR. Metoda ta zrewolucjonizowała możliwość detekcji mRNA, pozwalając na wykrycie nawet jednej kopii transkryptu [36]. Jej użycie do ilościowego oznaczania ekspresji genów umożliwia diagnozowanie chorób nowotworowych, wybór odpowiedniej terapii i monitorowanie odpowiedzi organizmu na leczenie [8]. Sama technika real-time PCR w onkologii służy także do określania zmian na poziomie chromosomów (translokacje, powstawanie genów fuzyjnych) oraz szacowania zaawansowania choroby. Ponadto, znalazła zastosowanie przy identyfikacji bakterii, określania ilości ma-

teriału genetycznego wirusa w zakażeniach HIV-1, HBV, HCV, oraz wykrywania mutacji (single nucleotide polymorphism – SNP) [58].

Oznaczenie poziomu ekspresji genów wiąże się z izolacją mRNA, odwrotną transkrypcją i amplifikacją cDNA. Różne wydajności wymienionych procesów w poszczególnych próbkach oraz nieunikniona w ich trakcie utrata materiału genetycznego mogą następczość wiele trudności i prowadzić do błędnych wyników. Aby zapobiec tego typu błędom, stosuje się normalizację liczby transkryptów badanego genu w stosunku do liczby transkryptów genu metabolizmu podstawowego [1,28,41]. Najczęściej używanymi genami referencyjnymi są: gen dehydrogenazy aldehydu-3-fosfoglicerynowego (*GAPDH*), gen β -aktyny (*ACTB*), gen β_2 -mikroglobuliny (*B2M*) oraz geny 18S i 28S rybosomalnego RNA (rRNA) [23]. Wiele eksperymentów wykorzystujących normalizację liczby transkryptów w stosunku do genów metabolizmu podstawowego zakłada, że poziom ekspresji tych genów nie ulega zmianie [23,42]. Ze względu na dynamikę procesów zachodzących w organizmie i nieustanne interakcje komórki ze środowiskiem, pogląd ten jest jednak podważany [44,60].

OPIS METODY REAL-TIME RT-PCR

Reakcja PCR pozwala na logarytmiczne powielenie materiału genetycznego z wykorzystaniem starterów, zaprojektowanych tak, aby przyłączały się swoiście do danej sekwencji. Bufor reakcyjny zawiera 4 rodzaje deoksynukleotydów, zestaw starterów, termostabilną polimerazę (np. Taq), jony magnezu (kofaktor polimerazy) oraz matrycę, czyli kwas nukleinowy mający ulec powieleniu [31]. Powielanie DNA jest możliwe dzięki wielokrotnemu powtarzaniu trój etapowego cyklu, w skład którego wchodzi:

- (i) denaturacja dwuniciowego DNA;
- (ii) przyłączenie pary starterów, komplementarnych do danego fragmentu DNA;
- (iii) wydłużanie starterów i synteza nici DNA [4].

Przyjmując, że kolejne cykle zachodzą ze 100% wydajnością, liczba cząsteczek powielanego DNA powinna wzrastać logarytmicznie według wzoru

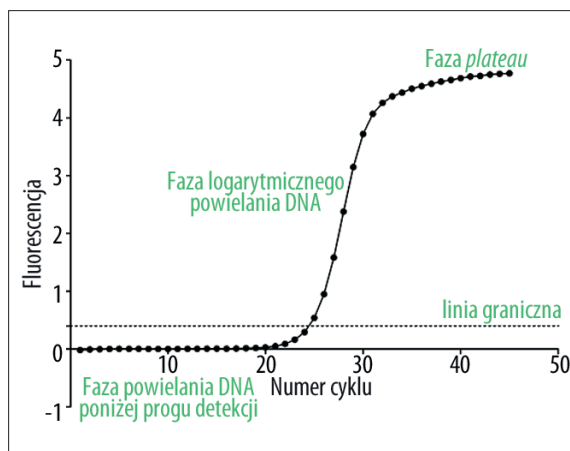
$$N_n = N_0 \times 2^n,$$

gdzie N_n – końcowa liczba cząsteczek, N_0 – wyjściowa liczba cząsteczek, n – liczba cykli. W praktyce, ze względu na niedoskonałości wynikające np. z obecności inhibitorów polimeraz, niewłaściwego doboru sekwencji starterów oraz nie do końca optymalnych stężeń reagentów i temperatury, może dochodzić do nieefektywnego powielania DNA. Przedstawiony wyżej wzór przybiera wówczas postać

$$N_n = N_0 \times E^n,$$

gdzie E to rzeczywista wydajność procesu powielania. Znając wydajność reakcji i ilość powstającego produktu, można więc obliczyć początkowe stężenie matrycy. Dzięki tym własnościom metoda PCR znalazła zastosowanie w analizie ilościowej, a po połączeniu z odwrotną transkrypcją i wykorzystaniu możliwości obrazowania reakcji w czasie rzeczywistym, stała się narzędziem pozwalającym na dokładne i szybkie zbadanie poziomu ekspresji genów. Oprócz metody real-time RT-PCR zmierzenie liczby transkryptów możliwe jest także z użyciem technik northern blotting, hybridyzacji *in situ*, testu ochrony przed działaniem rybonukleaz (RNase protection assay) czy też mikromacierzy cDNA [5]. Jednak to metoda real-time RT-PCR wyróżniająca się szybkością, czułością, swoistością, powtarzalnością i szerokim zakresem detekcji, jest techniką z wyboru do badań ekspresji genów w wielu laboratoriach diagnostycznych [6,21]. Główną wadą tej techniki jest to, iż zanieczyszczenie próbki nawet niewielką ilością materiału genetycznego przekłada się na błędny wynik [26].

Pomiar liczby transkryptów metodą real-time PCR jest procedurą składającą się zasadniczo z 3 etapów. Po przygotowaniu tkanki następuje kolejno: izolacja mRNA, odwrotna transkrypcja oraz amplifikacja cDNA przy jednoczesnej detekcji ilości powstającego produktu. Na rynku biotechnologicznym obecne są systemy do jedno- i dwustopniowej real-time RT-PCR. Jednostopniowa (one-step lub one-tube real-time PCR) umożliwia przeprowadzenie odwrotnej transkrypcji i amplifikacji w jednej próbce. Ze względu na zmniejszenie w tym przypadku liczby wykonywanych czynności, ryzyko zanieczyszczenia próbki lub utraty materiału jest mniejsze [5]. W dwustopniowej reakcji (two-step



Ryc. 1. Wykres fluorescencji w zależności od cyklu w real-time PCR z zaznaczonymi fazami reakcji i linią graniczną

lub two-tube real time PCR) najpierw jest przeprowadzana odwrotna transkrypcja, a otrzymana próba jest następnie przenoszona do kolejnych probówek w celu wykonania PCR. Odseparowanie tych dwóch procesów pozwala na łatwiejszą optymalizację reakcji i uzyskanie lepszych rezultatów w przypadku analizowania kilku różnych transkryptów dla jednej próbki. Ponadto, umożliwia wielokrotne wykonanie analiz poszczególnych transkryptów w tej samej próbce, po procesie odwrotnej transkrypcji.

Etapem charakterystycznym dla real-time RT-PCR jest stadium powielania badanego materiału genetycznego z obrazowaniem w czasie rzeczywistym. Proces ten jest możliwy dzięki zastosowaniu barwników fluorescencyjnych. Aparat przeprowadzający reakcję mierzy zmiany we fluorescencji badanej próbki i na tej podstawie wyznacza ilość powstającego produktu w kolejnych cyklach. Najpopularniejszym barwnikiem w reakcjach real-time jest SYBR Green I, który wiąże się do dwuniciowego DNA, przez co jego fluorescencja wzrasta prawie 1000-krotnie (im więcej powstanie produktu tym większa będzie fluorescencja próbki). Wadą tego układu jest, oprócz braku możliwości analizowania kilku genów w jednej mieszaninie reakcyjnej, nieswoistość wiązania, w wyniku czego wykrywane mogą być wszystkie sekwencje dwuniciowe (np. dimery starterów czy nieswoiste produkty amplifikacji). Dlatego, oprócz krzywej wzrostu fluorescencji, na końcu reakcji z SYBR Green I analizuje się krzywą topnienia, która pozwala określić czystość uzyskanego DNA [23]. Bardziej swoistą analizę przeprowadzić można z użyciem sond molekularnych, które przyłączają się do konkretnej sekwencji na matrycy [1]. Połączone z sondami barwniki emitują w procesie fluorescencji światło, którego ilość wzrasta proporcjonalnie do ilości produktu. Cykl reakcji, przy którym fluorescencja próbki przekracza linię graniczną (threshold), ustaloną automatycznie lub przez operatora, definiowany jest jako Ct (cycle threshold) lub odpowiednio Cp (crossing point, w przypadku urządzenia LightCycler firmy Roche) [8]. Ct mierzone jest w fazie logarytmicznego wzrostu ilości DNA i im jego wartość jest mniejsza tym większe było stężenie matrycy na początku reakcji. Przykład wykresu otrzymanego w real-time PCR przedstawia rycina 1.

Do określenia liczby transkryptów genów, stosuje się różne podejścia. Wśród nich wyróżnia się metody absolutne, do

Tabela 1. Charakterystyka wybranych genów metabolizmu podstawowego

Nazwa genu	Symbol	Funkcja
Enzymy		
Dehydrogenazy aldehydu-3-fosfoglicerynowego	<i>GADPH</i>	enzym glikolityczny przekształcający aldehyd-3-fosfoglicerynowy w 1,3-bisfosfoglicerynian
Cyklofilina C	<i>CYCC</i>	izomeraza białkowa biorąca udział w fałdowaniu białek i transporcie jądrowym
Aminotransferaza tyrozynowa	<i>TAT</i>	degradacja aminokwasów
β-glukuronidaza	<i>GUS</i>	degradacja siarczanu dermatanu i keratanu
Fosforybozylotransferaza hypoksantynowa	<i>HPRT</i>	bierze udział w metabolizmie nukleotydów, przekształcający hipoksantynę do monofosforanu inozyny
Deacetylaza histonów 1	<i>HD1</i>	deacetylacja histonów i kondensacja chromatyny
Białka strukturalne komórki		
β-aktyna	<i>ACTB</i>	składnik cytoskieletu, niezbędne w utrzymaniu kształtu komórki i segregacji chromosomów
Tubulina	–	białko budujące centriole, wici, rzęski
Geny rybosomalne		
18 S rRNA	–	rRNA budujące małą podjednostkę rybosomu
28S r RNA	–	rRNA budujące dużą podjednostkę rybosomu
Inne		
Katenina β-1	<i>CTNNB1</i>	pośredniczy w adhezji komórek, łącząc wewnątrzkomórkowe białka szkielet z transmembranowymi receptorami – kadherynami
β ₂ -mikroglobulina	<i>B2M</i>	białko głównego kompleksu zgodności tkankowej

wyznaczenia dokładnej liczby badanych transkryptów w próbach, oraz metody względne umożliwiające jedynie określenie stosunków ilościowych pomiędzy transkryptami w danej próbce i między próbkami. Najpopularniejszą jest względne oznaczenie z kalibratorem, w którym krzywą standardową wykorzystuje się tylko do wyznaczenia wydajności reakcji, a liczba transkryptów w badanej próbce wyrażona jest w stosunku do liczby transkryptów wybranego genu referencyjnego. W metodzie tej krzywe standardowe rysuje się dla genu badanego i referencyjnego na podstawie wyników real-time PCR dla kolejnych rozcieńczeń jednej z próbek (np. mieszaniny badanych próbek). Następnie oblicza się wydajność (E) obydwu reakcji PCR na podstawie wzoru

$$E = 10^{-1/\text{slope}}$$

gdzie slope oznacza współczynnik kierunkowy krzywej standardowej. Kolejnym etapem jest przeprowadzenie dla każdej z badanych próbek oraz kalibratora (próbka o stałym stosunku ilości transkryptów genu badanego i referencyjnego, najczęściej tkanka zdrowa) oddzielnych reakcji real-time PCR dla genu badanego i referencyjnego. Na podstawie wydajności reakcji określa się wtedy względną liczbę transkryptów analizowanych genów. Aby umożliwić porównanie ekspresji genu w poszczególnych próbkach wynik analizy przedstawia się jako stosunek liczby transkryptów genu badanego i referencyjnego w danej próbce dzielony

przez stosunek liczby transkryptów genu badanego i referencyjnego w próbce kalibratora.

Gen wykorzystywany do normalizacji powinien prezentować wiele właściwości, dzięki którym otrzymany wynik będzie dokładny. Te cechy to stały poziom ekspresji w danym rodzaju tkanki, niezależnie od warunków doświadczalnych i stanu chorobowego, oraz zbliżona liczba transkryptów w stosunku do liczby transkryptów genu badanego [28,46]. Jeżeli powyższe warunki są spełnione, ilość poddawanego badaniu mRNA nie stanowi najważniejszego problemu w analizie, a dokładność stosowanej metody zależy jedynie od zmian w wydajności amplifikacji obu genów. Warunkiem przeprowadzenia miarodajnego eksperymentu jest więc wybór odpowiedniego genu do normalizacji – najczęściej stosowanymi w tym celu genami są geny metabolizmu podstawowego [5].

GENY METABOLIZMU PODSTAWOWEGO

Definicja genów metabolizmu podstawowego (housekeeping gene – HKG) określa je jako geny zaangażowane w procesy najistotniejsze dla przeżycia komórki, które ulegają ekspresji na stosunkowo stałym, nieulegającym zmianom poziomie we wszystkich tkankach organizmu [9,22,23,54]. W tabeli 1 przedstawiono przykłady genów metabolizmu podstawowego.

Informacje na temat genów HKG zebrano w ogólnodostępnych bazach danych. Najobszerniejsza z nich – „The Friendly Alternative Splicing and Transcripts Data Base” (Fast DB) [10] zawiera obecnie informacje o 720 genach metabolizmu podstawowego. Zamieszczone zostały tam także dane dotyczące struktury i położenia genów na chromosomie, różne postacie transkryptów genów wynikające z alternatywnego składania (alternative splicing) oraz liczba ich transkryptów w poszczególnych tkankach. Kolejna baza danych – „Human Gene Expression Index” (Huge Index), stworzona została dzięki wynikom uzyskanym z analizy ekspresji genów z użyciem mikromacierzy [20]. W bazie tej opisano 452 geny metabolizmu podstawowego. Określono również ich średni poziom ekspresji, funkcja i umiejscowienie w genomie.

Dane zamieszczone w ww. źródłach, a także w licznych pracach badawczych [25,37,44,54], wskazują, że ekspresja określonych genów HKG nie jest stabilna we wszystkich typach tkanek. To wszystko oznacza, że identyfikację odpowiednich genów referencyjnych powinno przeprowadzać się dla każdego typu analizowanej tkanki, a czynników, które mogą wpłynąć na poziom ekspresji genów HKG jest bardzo dużo.

CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA ANALIZĘ POZIOMU EKSPRESJI GENÓW METABOLIZMU PODSTAWOWEGO

Lokalizacja genu referencyjnego

Aby znaleźć odpowiedni gen referencyjny należy przeanalizować czynniki, które w danej sytuacji mogą wpłynąć na wynik eksperymentu. Dotyczy to również struktury, jak i umiejscowienia genu w genomie. Zwłaszcza w przypadku pracy z materiałem, jakim są tkanki nowotworowe, w których częste są zmiany genetyczne na poziomie chromosomów, wskazane jest sprawdzenie genotypu tkanki. Wykonując taką analizę, można upewnić się, czy wybrany gen referencyjny nie znajduje się w obrębie chromosomu, który ulega delecji, amplifikacji lub innym zmianom mogącym wpływać na liczbę kopii genu w komórce. Badania przeprowadzone na komórkach nowotworowych okrężnicy udowodniły istnienie różnic w strukturze chromosomów i ekspresji genów [57]. Analiza zmienionych nowotworowo tkanek wykazała, że zwiększenie lub zmniejszenie ilości DNA chromosomalnego, korelowało odpowiednio z nadekspresją lub zmniejszoną ekspresją genów. Zjawisko to zaobserwowano w ponad 60% badanych nowotworów i dotyczyło ono głównie chromosomów: 7, 8q, 13 i 20 (dodatkowe kopie DNA) oraz chromosomów: 1p, 4, 5q, 8p, 14q, 15q, 17p, 18 (utrata DNA). Na podstawie prac opisujących te zagadnienia można określić, które miejsca są najbardziej podatne na zmiany w danym typie nowotworu, a zebrane dane mogą posłużyć do wytypowania najwłaściwszego pod tym kątem genu referencyjnego. Rycina 2, przygotowana na podstawie wybranych danych literaturowych [2,10,34,57], przedstawia zestawienie anomalii chromosomowych, występujących najczęściej w niektórych typach nowotworów. Uwidacznia ona jednocześnie problem wyboru odpowiedniego genu referencyjnego w przypadku analizy ekspresji genów w próbkach pobranych z nowotworów.

Budowa i sekwencja genu

Ważnym czynnikiem przy projektowaniu eksperymentu z użyciem metody real-time RT-PCR, jest także prześle-

czenie budowy genu referencyjnego. Geny eukariotyczne mają strukturę nieciągłą, dlatego trzeba wziąć pod uwagę możliwość alternatywnego ich składania (alternative splicing). Zjawisko to zachodzi np. w przypadku często wykorzystywanych do normalizacji genów metabolizmu podstawowego: *GADPH*, *HPRT*, β -glukuronidazy, ubikwityny C [3,10]. Należy zatem uważać na możliwość istnienia w komórce różnych transkryptów tego samego genu i używać starterów o sekwencji obecnej w każdej z możliwych postaci mRNA lub we wszystkich postaciach wykrytych w interesującej badacza tkance. Projektując startery unika się także odcinków, w których występują miejsca polimorficzne genu (z różną sekwencją nukleotydową w zależności od odmiany genu), gdyż istniejące różnice międzysobnicze mogłyby prowadzić do niewykrycia danej sekwencji [1,40].

Pseudogeny

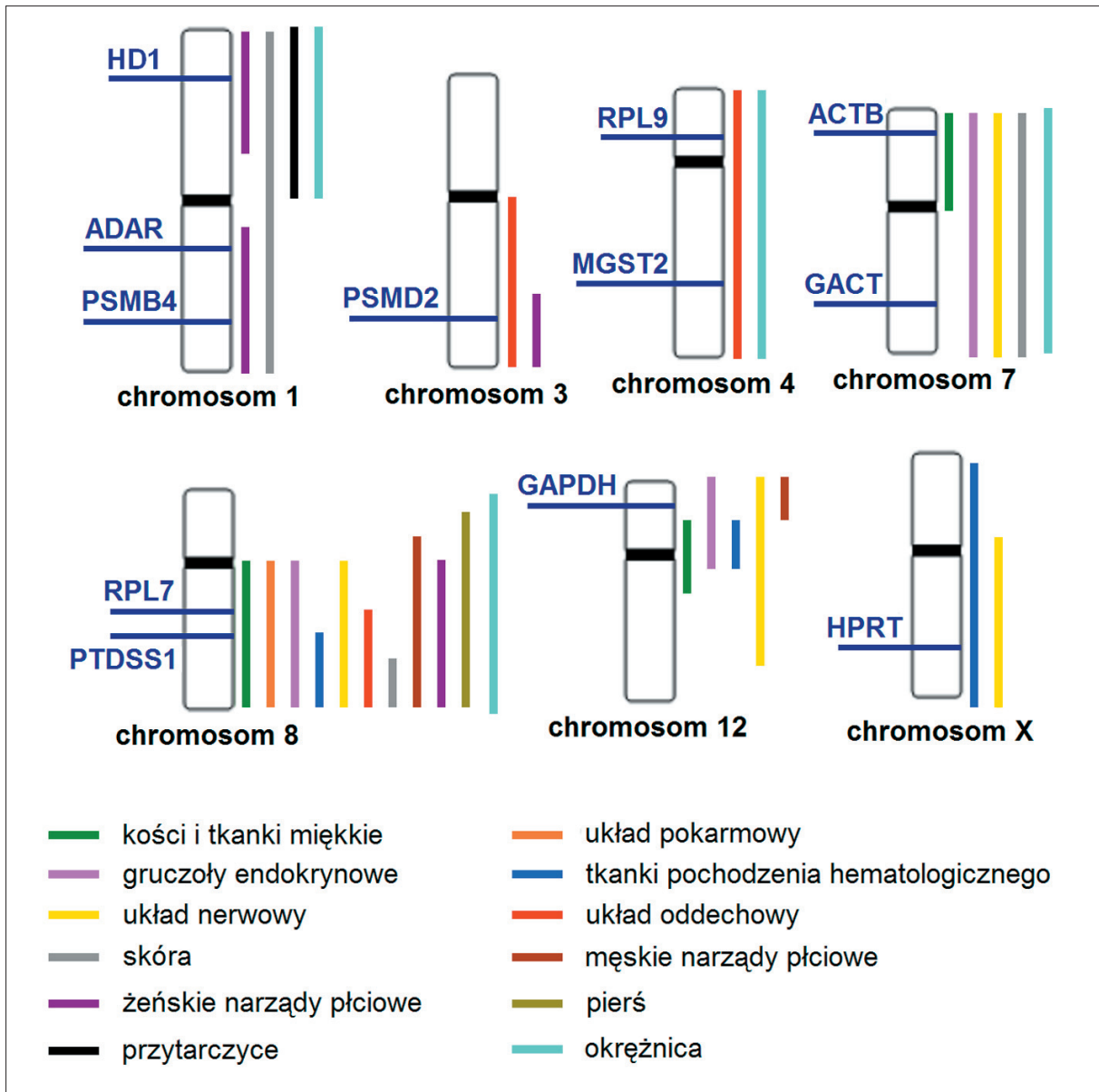
Pseudogeny definiowane są jako niefunkcjonalne kopie fragmentów genów, włączone do genomu przez retrotranspozycję mRNA lub duplikację genomowego DNA [24]. Ponieważ znaczna część pseudogenów (77%) może być transkrybowana, ilościowe oznaczanie metodą real-time RT-PCR poziomu transkryptów genów mających pseudogeny może prowadzić do błędnych wyników w postaci wyższej niż w rzeczywistości ekspresji analizowanego genu [40]. Jak wykazały badania, niektóre geny metabolizmu podstawowego mają wiele pseudogenów, np. *GAPDH* ma 52 pseudogeny, cyklofilina A – 63, *ACTB* – 15 [65]. Aby zwiększyć swoistość w stosunku do stosowanego HKG, stosuje się startery hybrydujące do miejsca, w którym wykorzystywany gen referencyjny różni się sekwencją w stosunku do swojego pseudogenu. Na rycinie 3 przedstawiono klasyfikację poznanych pseudogenów na podstawie funkcji genów mających z nimi sekwencje homologiczne.

Funkcja genu

Wyszukując odpowiednie geny do procesu normalizacji należy wybierać je tak, by należały one do grup pełniących funkcje inne niż te, w które zaangażowane są geny badane. Ma to na celu uniknięcie możliwej koregulacji genów, co może zaburzać wynik analizy [9,48]. Podczas badania ekspresji genów kodujących białka, dobrym rozwiązaniem wydaje się wykorzystanie genów rRNA jako genów referencyjnych. Związane jest to z ich transkrypcją z udziałem innej polimerazy, niezaangażowanej w transkrypcję genów kodujących białka [56]. W praktyce jednak, zaobserwowano znaczny wpływ czynników biologicznych i leków na poziom transkryptów rRNA, co często uniemożliwia użycie genów rRNA w normalizacji ekspresji innych genów [5].

Poziom ekspresji genu

Sugeruje się, aby do analizy wybierać takie geny metabolizmu podstawowego, których poziom ekspresji jest zbliżony do poziomu prezentowanego przez gen badany. Jeżeli liczba kopii genu referencyjnego (stanowiącego wewnętrzny standard) jest znacznie wyższa, podczas PCR startery będą przyłączane z większym prawdopodobieństwem do sekwencji występujących w większej liczbie kopii [5]. Skutkiem tego może być wynik fałszywie zaniżony [47,62].



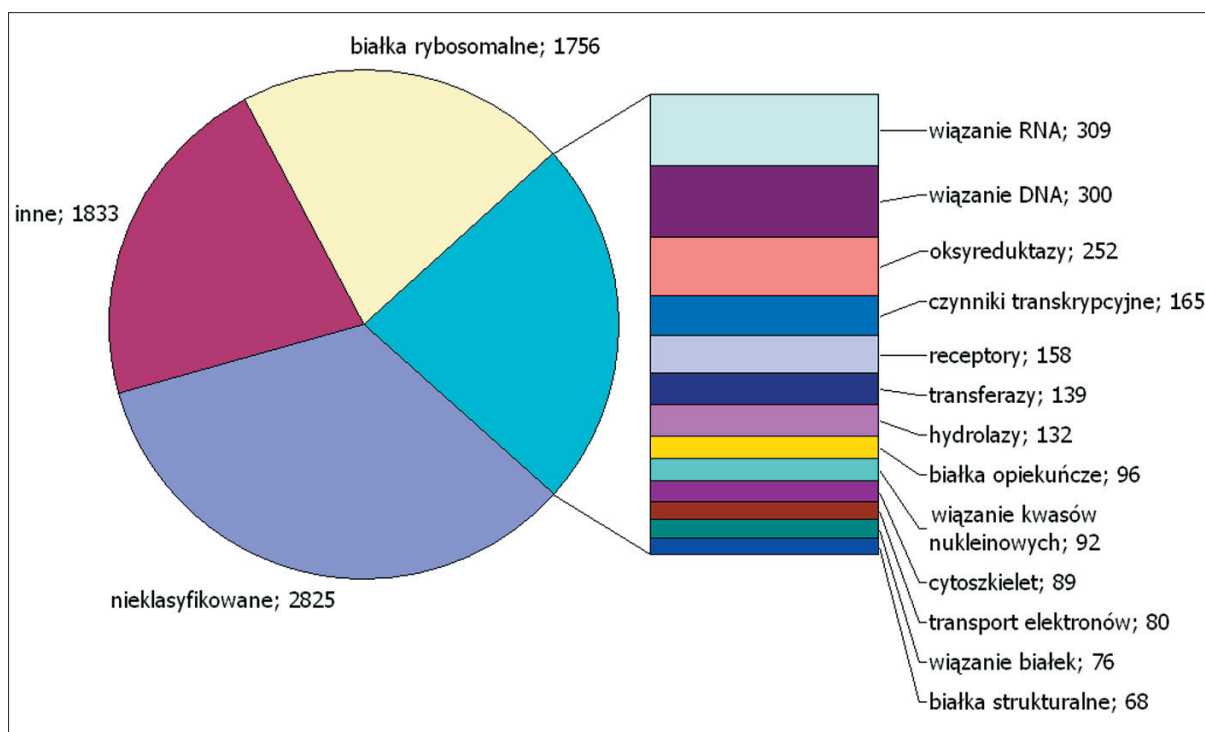
Ryc. 2. Zestawienie anomalii chromosomowych (amplifikacji i delecji) występujących w wybranych typach nowotworów z zaznaczeniem niektórych genów metabolizmu podstawowego znajdujących się w ich obrębie [2,10,34,57]. *MGST 2* – mikrosomalna transferaza S glutationu 2, *PSMB 4* – podjednostka β 4 proteasomu, *ADAR-RNA* swoista deaminaza adenozyiny, *RPL7* – rybosomalne białko L7, *GAPDH* – dehydrogenaza glicerolo-3-fosforanowa, *ACTB* – β -aktyna, *GACT* – γ -aktyna, *B2M* – β -2-mikroglobulina, *HD1* – deacetylaza 1 histonów, *RPL9* – rybosomalne białko L9, *HPRT* – fosforybozyl transferaza hipoksantynowa, *PTDSS1* – nie-ATP-azowa podjednostka 26S proteasomu 2

Idealna sytuacja jest wtedy, gdy stosunek genu badanego do referencyjnego jest zbliżony do jedności. W praktyce stan taki jest trudny do osiągnięcia, a oszacowanie poziomu ekspresji powinno być sprawdzone przed każdym wyborem genu referencyjnego.

Rodzaj tkanki

Nawet pomiędzy niezmiennymi chorobowo tkankami poziom ekspresji genów metabolizmu podstawowego może się znacznie różnić. Szczegółowa analiza (5154 pomiarów) 72 ludzkich tkanek ujawniła, jak w ich obrębie zmienia się poziom ekspresji genu *GAPDH* [3]. Okazało się, że liczba transkryptów *GAPDH* na 100 ng całkowite-

go komórkowego RNA waha się od ponad miliona w mięśniach szkieletowych do niecałych 70 tys. w komórkach z gruczołu piersiowego. Inne dane otrzymane w eksperymencie przeprowadzonym przez Warringtona i wsp. [63] wykazują, że ekspresja genu *GAPDH* w grupie siedmiu tkanek pochodzących od dorosłych ludzi różni się 7-krotnie. Wahania ekspresji genów HKG obserwować można także w obrębie tego samego rodzaju tkanki. W zaprojektowanym przez Jemiolo i Trappe doświadczeniu [23] badano zmianę ekspresji czterech genów metabolizmu podstawowego: *GAPDH*, *ACTB*, *B2M* i 18S rRNA, w mięśniach pod wpływem wysiłku fizycznego. Otrzymane w ten sposób wyniki pokazały, że rozbieżności w zmierzonej ilości transkryptów poszczególnych genów, przed rozpoczęciem



Ryc. 3. Klasyfikacja poznanych pseudogenów na podstawie funkcji genów mających z nimi sekwencje homologiczne [65]

ćwiczenia fizycznego, bezpośrednio po jego zakończeniu i 4 godziny później, mogą być nawet 52-krotne.

Źródło i sposób izolacji analizowanej próby

W literaturze spotkać się można z ilościowym oznaczeniem mRNA wykonanym na materiale świeżym (biopsje), mrożonym oraz utrwalonym w parafinie. Tkanka z natury jest tworem niejednorodnym, stąd wynik analizy jest uśrednieniem ekspresji genu z komórek pochodzących z różnych subpopulacji, znajdujących się na różnych etapach różnicowania. Uzyskany wynik, przedstawiający wzór ekspresji danego genu, może być obarczony błędem, co zostaje uwidocznione, porównując ekspresję międzyosobniczą [7]. Jak wykazały badania przeprowadzone przez Goidina i wsp., komórki w obrębie guza wyizolowanego od jednego pacjenta różnią się profilem ekspresji genów *GAPDH* i *ACTB* [15]. Może to nastręczać wiele trudności podczas interpretacji wyników, gdyż źródłem zmienności mogą być błędy w samej procedurze wykonywania eksperymentu. Mniejszą heterogenność próby można uzyskać izolując komórki z tkanki techniką LCM (Laser Capture Microdissection). W metodzie tej, dzięki zastosowaniu lasera oraz błon wychwytyjących materiał biologiczny, można wyizolować już nawet pojedynczą komórkę [49]. Mała początkowa ilość próby otrzymana tą metodą, może być jednak przyczyną błędnych wyników, gdyż nawet minimalne zanieczyszczenie obcym materiałem genetycznym może doprowadzić do dużych błędów w oznaczeniu ilościowym [26].

W pracowniach histopatologicznych pobrane od pacjentów tkanki są zwykle utrwalone w formalinie [26]. Mimo że zabieg ten prowadzi do degradacji mRNA, nie zawsze można go uniknąć. Niektóre tkanki mogą być przechowywane

tylko w tej postaci, ponieważ obróbka świeżych skrawków otrzymanych z biopsji nie pozwala na ocenę ich morfologii [29]. W badaniach przeprowadzonych przez Godfreya i wsp. udowodniono, że ilość mRNA wykrytego metodą real-time RT-PCR w utrwalonych w parafinie skrawkach, jest ponad 32-krotnie mniejsza niż w świeżych tkankach [14]. Różnica ta mogła być spowodowana nie tylko degradacją mRNA, ale także modyfikacjami chemicznymi kwasu nukleinowego, które uniemożliwiły jego powielenie. Mimo to, możliwe jest wykrycie zdegradowanych fragmentów mRNA, nawet jeżeli okres półtrwania danego transkryptu mieścił się w granicach 10 min [62]. Dzieje się tak dzięki czułości metody real-time PCR, która wykrywa fragmenty mRNA o małej długości. Zmiany w ilości transkryptów w tkankach archiwizowanych są różne dla różnych genów referencyjnych. Dobrze pokazuje to przykład genu *GAPDH*, którego liczba transkryptów zwiększa się w tkankach przygotowywanych do utrwalenia, jak i utrwalonych w parafinie. Przypuszcza się, że jest to spowodowane indukcją transkrypcji genu pod wpływem niedoxygenacji, które następuje po wycięciu tkanki z organizmu. Związane jest to ściśle z funkcją genu *GAPDH*, którego produktem jest enzym glikolityczny [14].

Degradacja mRNA może być czynnikiem ograniczającym, gdy ilościowemu oznaczeniu ma ulegać gen referencyjny o niskiej ekspresji. Badania na materiale archiwalnym (tzw. bloczki parafinowe) wykazały, że transkrypty genów o małej ekspresji mogą być niewykrywalne w utrwalonych tkankach [62]. Po 5 latach mRNA genu *HPRT* było niewykrywalne w części skrawków pochodzących z wątroby, po 10 latach w skrawkach uzyskanych z serca, z kolei detekcja transkryptów genu *MDR-1* (multiple drug resistance – 1) dała negatywne wyniki w skrawkach otrzymanych ze śledziony i przechowywanych przez okres 10 lat. Efekt

ten mógł być przyczyną degradacji mRNA pod wpływem działania na tkankę formaliną przed utworem w parafinie. Uzyskane wyniki sugerują, że po jednym dniu przechowywania wycinka z biopsji w 6% formalinie, ilość RNA, które mogło być wyekstrahowane z próby, obniżyła się o 51,4% w nerce, 45,9% w sercu, 28,4% w wątrobie, 19,2% w śledzionie.

Lepszym sposobem utrwalania w parafinie wydaje się przechowywanie tkanek w niskiej temperaturze. Mrożenie powoduje mniejszą degradację mRNA i umożliwia izolację większej ilości materiału o dużo lepszej jakości. Nie zaobserwowano także znaczącej dezintegracji RNA (18S rRNA i 28S rRNA) w tkankach inkubowanych przez 16 godzin w lodzie [29]. Fragmenty tkanek pochodzące z biopsji przetrzymywane w temperaturze pokojowej oraz w 0,9% roztworze chlorku sodu (sól fizjologiczna) wykazywały dużo większy stopień degradacji rRNA już począwszy od 6 godzin inkubacji. Zastosowanie komercyjnie dostępnego roztworu RNAlater® również bardzo dobrze chroni świeże tkanki przed degradacją RNA. Nawet po inkubacji przez 72 godziny w temperaturze pokojowej nie wykryto degradacji RNA w tkance zabezpieczonej w tym roztworze [18,33].

Wiele problemów pojawia się także w przypadku oznaczania liczby transkryptów w kulturach tkankowych. Należy tutaj wziąć pod uwagę to, że w hodowli, metabolizm komórek różni się od metabolizmu *in vivo*. Zmiana ta wynika, m.in. z braku interakcji z innymi komórkami i czynnikami przez nie wydzielanymi oraz zaburzeniami struktury trójwymiarowej obecnej w żywym organizmie. W czasie utrzymywania hodowli następuje spowolnienie metabolizmu, dochodzi do aneuploidii (zmiany ilości chromosomów), przez co hodowle stają się heterogenne [50]. W przypadku badań *in vitro* również skład podłoża, na którym prowadzona jest hodowla, może mieć wpływ na ekspresję genów. Na przykład, komórki mysich fibroblastów hodowanych na podłożu z Matrigelem™, prezentują zwiększoną ekspresję *ACTB* [46]. Natomiast komórki hodowane na pożywce bez surowicy wchodzi w fazę G0, a jej dodatek indukuje ekspresję wielu genów [44]. Wyniki badań z użyciem genów HKG wykazały, że ekspresja genu *GAPDH* i *ACTB* wzrasta po 8 godzinach stymulacji surowicą, podczas gdy poziom ekspresji *B2M* i 18S rRNA pozostaje prawie niezmienny. W innym przypadku, w badanej przez Soveneta i wsp. [42] pierwotnej kulturze komórkowej tyrocytów spostrzeżono, że po traktowaniu komórek różnymi mitogenami, poziom ekspresji genu *GAPDH* ulegał zwiększeniu 1,5-krotnie, 2-krotnie, 2,5-krotnie w zależności od stosowania mutagenów tyreotropiny (thyroid-stimulating hormone – TSH), nabłonkowego czynnika wzrostu (epidermal growth factor – EGF) i TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate).

Wiek pacjenta

Touchberry i wsp. opublikowali dane, dotyczące korelacji wieku pacjenta z ekspresją trzech genów metabolizmu podstawowego: *GAPDH*, *B2M* i polimerazy RNA 2a [55]. Po pobraniu próbek w grupie ludzi młodych (średnia wieku 22,7±3,4 lat) oraz starszych (średnia wieku 73±9,5 lat) i przeprowadzeniu ilościowego oznaczenia liczby transkryptów stwierdzono, że najmniejszą zmianą (stosunek liczby

transkryptów u ludzi młodych do liczby transkryptów u ludzi starszych) odznaczał się poziom ekspresji genu *GAPDH* (stosunek 0,9), następnie *B2M* (1,67) i genu polimerazy RNA 2a (2,41). Spośród badanych genów, tylko *GAPDH* został uznany za odpowiedni do ilościowego oznaczania ekspresji genów niezależnie od wieku. Dane te są zgodne z wynikami otrzymanymi przez Barbera i wsp., którzy badając ekspresję genu *GAPDH* w 72 zdrowych tkankach, nie zaobserwowali różnicy w ekspresji tego genu w różnych grupach wiekowych [3].

Płeć i poziom hormonów

W badaniach przeprowadzonych na wątrobach szczurów zdrowych oraz pozbawionych przysadki (co niwelowało różnice w poziomie hormonów płciowych), sprawdzano różnice w ekspresji genów metabolizmu podstawowego [61]. Zaobserwowano istotne różnice w liczbie transkryptów genu tubuliny, *CYC* i *TAT* – większa ich liczba znajdowała się w wątrobach zdrowych samców niż zdrowych samic. Transkrypty genu *GAPDH* i 18S rRNA były z kolei obecne w większej liczbie w wątrobach zdrowych samic niż samców. Mierzac ekspresję tych samych genów u szczurów z usuniętą przysadką, zaobserwowano, że liczba transkryptów genu aminotransferazy tyrozynowej, *GAPDH*, *ACTB* i 18S rRNA był jednakowy u samic i samców. Zmiany ekspresji genów metabolizmu podstawowego: *GAPDH* i γ -aktyny były badane także w grupie kobiet zdrowych i z włókniakomięśniakiem gładkim macicy [64]. Zmniejszenie liczby transkryptów γ -aktyny zaobserwowano u kobiet po menopauzie oraz tych, które przyjmowały analog hormonu uwalniającego gonadotropinę (gonadotropin releasing hormone analog – GnRH), zarówno w miometrium, jak i w guzach. U zdrowych kobiet ciężarnych wystąpił znaczący wzrost poziomu mRNA γ -aktyny w porównaniu do kobiet zdrowych, znajdujących się w prawidłowym cyklu. W przypadku genu *GAPDH* tkanki guza i miometrium wykazano zwiększoną liczbę jego transkryptów w porównaniu z tkanką zdrową.

Nowotwory

Duże różnice w ekspresji genów metabolizmu podstawowego obserwuje się porównując tkanki zdrowe i nowotworowe. Genem, który najczęściej wykazuje zmienność w tego typu analizach jest *GAPDH* (tab. 2). Potwierdzają to badania przeprowadzone przez Rubie i wsp. [39] wykazujące różnice w poziomach transkryptów 21 HKG w czterech typach nowotworów. W innej pracy [16] dotyczącej ekspresji genów *GAPDH* i 28S rRNA w nowotworowych komórkach wątroby wykazano 16-krotne zwiększenie poziomu mRNA genu *GAPDH* w guzach u osób z rakiem wątrobowo-komórkowym w porównaniu z osobami zdrowymi (kontrola), przy niezmiętej liczbie transkryptów genu 18S rRNA. Tricararico i wsp. [56] zbadali ekspresję 11 genów metabolizmu podstawowego, we fragmentach pobranych z ognisk nowotworowych tkanki piersi. W porównaniu z tkanką zdrową liczba transkryptów genu *GAPDH* była zanizona, prawie niezmienna lub zawyżona w zależności od badanej próby. Zmiany poziomu ekspresji w nowotworach dotyczą także innych genów. Interesujące studia prowadzone nad komórkami szpiczaka mnogiego wykazały, iż istnieje korelacja między ekspresją genu *B2M* u chorego i rokowaniem [17]. Poziom *B2M* w surowicy odzwier-

Tabela 2. Zmiany w ekspresji genów metabolizmu podstawowego w wybranych nowotworach w stosunku do tkanki zdrowej

Typ nowotworu	Gen z zaburzoną ekspresją	Poziom w komórce	Referencje
Nowotwór przełyku	<i>HPRT</i>	↑	[39]
Nowotwór trzustki	<i>GAPDH</i>	↑	[39]
Nowotwór żołądka	<i>GAPDH</i> <i>18 S rRNA</i>	↑	[39]
Nowotwór okrężnicy	<i>GAPDH</i> <i>HPRT</i>	↑	[39]
Nowotwór wątroby (przerzutujący)	<i>HPRT</i> <i>GAPDH</i> <i>ACTB</i>	↑	[39]
Nowotwór hepatokomórkowy	<i>GAPDH</i>	↑	[45]
Włóknakomięśniak macicy	<i>GAPDH</i>	↑	[64]
Szpiczak mnogi	<i>B2M</i>	↑	[30]
Nowotwór piersi	<i>GAPDH</i>	↓ lub ↑	[38,56]
Nowotwór płuc	<i>GAPDH</i>	↑	[41]
Nowotwór trzustki	<i>GAPDH</i>	↑	[43]

↑ Zwiększona ekspresja w stosunku do tkanki zdrowej.

↓ Zmniejszona ekspresja w stosunku do tkanki zdrowej.

ciadał czas przeżycia pacjenta. Wysoki poziom wskazywał na krótki, a obniżony na długi czas przeżycia. Wahania poziomu ekspresji tego genu sugerują, iż zmiany ekspresji genów występują nie tylko między tkanką zdrową i nowotworową, ale także w obrębie nowotworu.

Zespół Downa

U ludzi z trisomią 21 chromosomu obserwuje się zaburzenia w ośrodkowym układzie nerwowym objawiające się demencją, której jedną z przyczyn jest zaburzony metabolizm glukozy w mózgu. Przeprowadzając badania mające określić poziom ekspresji genu *GAPDH* w tkance mózgowej osób z zespołem Downa [27] stwierdzono, że w korze czołowej liczba transkryptów badanego genu była zawyżona we wszystkich badanych próbach, a najwyższy poziom był o 70% wyższy niż w mózgu osoby zdrowej. U około 50% pacjentów ekspresja genu *GAPDH* była zwiększona w pozostałych płatach mózgu, zmian nie zaobserwowano natomiast w mózdkach osób z zespołem Downa w porównaniu z grupą kontrolną (osoby zdrowe).

Podawane leki i substancje chemiczne

Każda wprowadzana do organizmu substancja chemiczna wywołuje pewną jego odpowiedź, co jest naturalnym skutkiem interakcji komórka-środowisko. Konsekwencją tego może być zmiana ekspresji genów, co dotyczy także genów metabolizmu podstawowego. Stosowanie diety wzbogaconej kreatyną może prowadzić do zmiany profilu ekspresji genów. Izolując RNA z tkanki mięśniowej osób wykonujących intensywne ćwiczenia fizyczne, zbadano ekspresję genów *ACTB*, *B2M*, *CYC* i *GAPDH* w czasie 0 (przed podaniem kreatyny), po jednym i pięciu dniach po poda-

niu substancji [32]. Normalizacja otrzymanych danych, prowadzona w stosunku do osób przyjmujących placebo pokazuje, że najbardziej wahał się poziom transkryptów genu *GAPDH*, podczas gdy zmiany poziomu pozostałych transkryptów badanych genów mieściły się w przedziale jednego *Ct*. Wykonane przez Valentiego i wsp. doświadczenia na hodowlach *in vitro* nowotworu prostaty (linia komórkowa PC-3) i nowotworu piersi (linia T-47D) miały na celu zbadanie ekspresji genu *GAPDH* po podaniu różnych aminobifosfonianów [59]. Związki te, stosowane *in vivo*, mają zdolność do inhibicji resorpcji kości, a *in vitro* uczestniczą w indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych. Trzy różne leki zawierające aminobifosfoniany (Alendronat, Pamidronat, Zoledronat), dodawane do hodowli *in vitro*, zmniejszały ekspresję genu *GAPDH* wraz ze zwiększaniem ich stężenia. W innym przypadku, w badaniach obejmującym 92 chorych cierpiących na astmę badano ekspresję genów *GAPDH* i *ACTB* [13]. W grupie tej znajdowali się pacjenci przyjmujący wziewnie kortykosteroidy, jak i osoby nieprzyjmujące żadnych leków. Rozpatrując poziom ekspresji genu *GAPDH* w pobranych fragmentach tkanek, zanotowano zmniejszoną liczbę transkryptów tego genu u osób cierpiących na astmę, ale nieprzyjmujących żadnych leków. Liczba transkryptów *ACTB* była podobna u wszystkich osób chorych na astmę i jednocześnie niższa niż w grupie kontrolnej.

PODSUMOWANIE

Jak wynika z przeglądu wielu prac, czynników, które mogą wpłynąć na poziom ekspresji genów metabolizmu podstawowego jest bardzo dużo. Istnieje więc poważne ryzyko błędnej interpretacji wyników przy zastosowaniu HKG w procesie normalizacji liczby transkryptów. Publikowane

są jednak prace wskazujące na przydatność dobrze dobranych, pojedynczych genów metabolizmu podstawowego do tego procesu [3,11,16,23,32]. Sugerują one, że wybór odpowiednich genów powinien być przeprowadzony, poprzez przesłedzenie ekspresji większej grupy HKG w badanej tkance, jeszcze przed rozpoczęciem właściwej analizy. Testując kilka różnych genów można odnaleźć te, których poziom ekspresji jest podobny w interesującej nas tkance zdrowej jak i zmienionej chorobowo np. w różnych typach nowotworów [7,12,15]. W literaturze znaleźć można wiele

cennych uwag i metod, które mogą być pomocne w doborze genu referencyjnego [1,19,35,53,60]. Większość z nich opiera się na wyliczeniach stopnia zmienności ekspresji genów w poszczególnych próbkach oraz pomiędzy badanymi genami HKG. W przeprowadzaniu tego typu badań dużym ułatwieniem byłoby stworzenie bazy danych, w której zastosowanie właściwego algorytmu, ułatwiłoby wybór genów do normalizacji. Analizę można by wtedy ograniczyć do kilku HKG i wśród nich eksperymentalnie wyznaczyć najwłaściwszy gen referencyjny w danym eksperymencie.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Andersen C.L., Jensen J.L., Orntoft T.F.: Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.*, 2004; 64: 5245–5250
- [2] Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. <http://AtlasGeneticsOncology.org> (14.09.2007)
- [3] Barber R.D., Harmer D.W., Coleman R.A., Clark B.J.: GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in panel of 72 human tissues. *Physiol. Genomics*, 2005; 21: 389–395
- [4] Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L.: *Biochemistry*. W.H. Freeman and Company, New York 2002
- [5] Bustin S.A.: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.*, 2000; 25: 169–193
- [6] Bustin S.A.: Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.*, 2002; 29: 23–39
- [7] Bustin S.A., Benes V., Nolan T., Pfaffl M.W.: Quantitative real-time RTPCR a perspective. *J. Mol. Endocrinol.*, 2005; 34: 597–601
- [8] Bustin S.A., Mueller R.: Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin. Sci. (Lond.)*, 2005; 109: 365–379
- [9] de Kok J.B., Roelofs R.W., Giesendorf B.A., Pennings J.L., Waas E.T., Feuth T., Swinkels D.W., Span P.N.: Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab. Invest.*, 2005; 85: 154–159
- [10] de la Grange P., Dutertre M., Martin N., Auboeuf D.: FAST DB: a website resource for the study of the expression regulation of human gene products. *Nucleic Acids Res.*, 2005; 33: 4276–4284
- [11] Dheda K., Huggett J.F., Bustin S.A., Johnson M.A., Rook G., Zumla A.: Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*, 2004; 37: 112–119
- [12] Ginzinger D.G.: Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Exp. Hematol.*, 2002; 30: 503–512
- [13] Glare E. M., Divjak M., Bailey M. J., Walters E. H.: β -Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalizing mRNA levels. *Thorax*, 2002; 57: 765–770
- [14] Godfrey T.E., Kim S.H., Chavira M., Ruff D.W., Warren R.S., Gray J.W., Jensen R.H.: Quantitative mRNA expression analysis from formalin-fixed, paraffinembedded tissues using 5' nuclease quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Mol. Diagn.*, 2000; 2: 84–91
- [15] Goidin D., Mamessier A., Staquet M.J., Schmitt D., Berthier-Vergnes O.: Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and β -actin genes as internal standard of quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell populations. *Anal. Biochem.*, 2001; 295: 17–21
- [16] Gong Y., Cui L., Minuk G.Y.: Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28S-ribosomal RNA gene expression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 1996; 23: 734–737
- [17] Greipp P.R., Lust J.A., O'Fallon W.M., Katzmann J.A., Witzig T.E., Kyle R.A.: Plasma cell labeling index and beta 2-microglobulin predict survival independent of thymidine kinase and C-reactive protein in multiple myeloma. *Blood*, 1993; 81: 3382–3387
- [18] Grotzer M.A., Patti R., Georger B., Eggert A., Chou T.T., Phillips P.C.: Biological stability of RNA isolated from RNALater-treated brain tumor and neuroblastoma xenografts. *Med. Pediatr. Oncol.*, 2000; 34: 438–442
- [19] Haller F., Kulle B., Schwager S., Gunawan B., von Heydebreck A., Sultmann H., Füzesi L.: Equivalence test in quantitative reverse transcription polymerase chain reaction: confirmation of reference genes suitable for normalization. *Anal. Biochem.*, 2004; 335: 1–9
- [20] Haverty P.M., Weng Z., Best N.L., Auerbach K.R., Hsiao L.L., Jensen R.V., Gullans S.R.: Huge Index: a database with visualization tools for high-density oligonucleotide array data from normal human tissues. *Nucleic Acids Res.*, 2002; 30: 214–217
- [21] Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M.: Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, 1996; 6: 986–994
- [22] Hendriks-Balk M.C., Michel M.C., Alewijnse A.E.: Pitfalls in the normalization of real-time polymerase chain reaction. *Basic Res. Cardiol.*, 2007; 102: 195–197
- [23] Jemiolo B., Trappe S.: Single muscle fiber gene expression in human skeletal muscle: validation of internal control with exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004; 320: 1043–1050
- [24] Karro J.E., Yan Y., Zheng D., Zhang Z., Carriero N., Cayting P., Harrision P., Gerstein M.: Pseudogene.org: a comprehensive database and comparison platform for pseudogene annotation. *Nucleic Acids Res.*, 2007; 35: D55–D60
- [25] Lee P.D., Sladek R., Greenwood C.M., Hudson T.J.: Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. *Genome Res.*, 2002; 12: 292–297
- [26] Lehmann U., Kreipe H.: Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods*, 2001; 25: 409–418
- [27] Lubec G., Labudova O., Cairns N., Fountoulakis M.: Increased glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase levels in the brain of patients with Down's syndrome. *Neurosci. Lett.*, 1999; 260: 141–145
- [28] Mahoney D.J., Carey K., Fu M.H., Snow R., Cameron-Smith D., Parise G., Tarnopolsky M.A.: Real-time RT-PCR analysis of housekeeping genes in human skeletal muscle following acute exercise. *Physiol. Genomics*, 2004; 18: 226–231
- [29] Micke P., Ohshima M., Tahmasebpour S., Ren Z.P., Ostman A., Pontén F., Bottling J.: Biobanking of fresh frozen tissue: RNA is stable in non-fixed surgical specimens. *Lab. Invest.*, 2006; 86: 202–211
- [30] Miguel-García A., Matutes E., Tarin F., García-Talavera J., Miguel-Sosa A., Carbonell F., Catovsky D.: Circulating Ki67 positive lymphocytes in multiple myeloma and benign monoclonal gammopathy. *J. Clin. Pathol.*, 1995; 48: 835–839
- [31] Mullis K. B.: Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, 1990; 48: 579–582
- [32] Murphy R.M., Watt K.K., Cameron-Smith D., Gibbons C.J., Snow R.J.: Effect of creatine supplementation on housekeeping genes in human skeletal muscle using real-time PCR. *Physiol. Genomics*, 2003; 12: 163–174
- [33] Mutter G.L., Zahrieh D., Liu C., Neuberger D., Finkelstein D., Baker H.E., Warrington J.A.: Comparison of frozen and RNALater solid tissue storage methods for use in RNA expression microarrays. *BMC Genomics*, 2004; 5: 88
- [34] Palanisamy N., Imanishi Y., Rao P.H., Tahara H., Chaganti R.S., Arnold A.: Novel chromosomal abnormalities identified by Comparative Genomic Hybridization in parathyroid adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1998; 83: 1766–1770

- [35] Pfaffl M.W., Tichopad A., Prgomet C., Neuvians T.P.: Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper—Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.*, 2004; 26: 509–515
- [36] Provenzano M., Rossi C. R., Mocellini S.: The Usefulness of Quantitative Real-Time PCR in Immunogenetics. *ASHI Quarterly*, 2001; 25: 89–91
- [37] Radonic A., Thulke S., Mackay I.M., Landt O., Siegert W., Nitsche A.: Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004; 313: 856–862
- [38] Révillion F., Pawlowski V., Hornez L., Peyrat J.P.: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human breast cancer. *Eur. J. Cancer*, 2000; 36: 1038–1042
- [39] Rubie C., Kempf K., Hans J., Su T., Tilton B., Georg T., Brittner B., Ludwig B., Schilling M.: Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues. *Mol. Cell. Probes*, 2005; 19: 101–109
- [40] Ruud P., Fodstad O., Hovig E.: Identification of novel cytokeratin 19 pseudogene that may interfere with reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay used to detect micrometastatic tumor cells. *Int. J. Cancer*, 1999; 80: 119–125
- [41] Saviozzi S., Cordero F., Lo Iacono M., Novello S., Scagliotti G.V., Calogero R.A.: Selection of suitable reference genes for accurate normalization of gene expression profile studies in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, 2006; 6: 200
- [42] Savonet V., Maenhaut C., Miot F., Pirson I.: Pitfalls in the use of several housekeeping genes as standards for quantitation of mRNA: the example of thyroid cells. *Anal. Biochem.*, 1997; 247: 165–167
- [43] Schek N., Hall B.L., Finn O.J.: Increased glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.*, 1988; 48: 6354–6359
- [44] Schmittgen T.D., Zakrajsek B.A.: Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2000; 46: 69–81
- [45] Seeff L.B., Hoofnagle J.H.: Epidemiology of hepatocellular carcinoma in areas of low hepatitis B and hepatitis C endemicity. *Oncogene*, 2006; 25: 3771–3777
- [46] Selvey S., Thompson E.W., Matthaehi K., Lea R.A., Irving M.G., Griffiths L.R.: β -actin – an unstable internal control for RT-PCR. *Mol. Cell. Probes*, 2001; 15: 307–311
- [47] Serazin-Leroy V., Denis-Henriot D., Morot M., de Mazancourt P., Giudicelli Y.: Semi-quantitative RT-PCR for comparison of mRNAs in cells with different amounts of housekeeping gene transcripts. *Mol. Cell. Probes*, 1998; 12: 283–291
- [48] Silver N., Best S., Jiang J., Thein S.L.: Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol. Biol.*, 2006; 7: 33
- [49] Simone N.L., Remaley A.T., Charboneau L., Petricoin E.F., Glickman J.W., Emmert-Buck M.R., Fleisher T.A., Liotta L.A.: Sensitive immunoassay of tissue cell proteins procured by laser capture microdissection. *Am. J. Pathol.*, 2000; 156: 445–452
- [50] Stokłosowa S.: *Biologia i charakterystyka hodowli. W: Hodowla komórek i tkanek*, red.: Stokłosowa S., Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2004; 45–50
- [51] Strausberg R.L., Riggins G.J.: Navigating the human transcriptome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 11837–11838
- [52] Su A.I., Cooke M.P., Ching K.A., Hakak Y., Walker J.R., Wiltshire T., Orth A.P., Vega R.G., Sapinoso L.M., Moqrich A., Patapoutian A., Hampton G.M., Schultz P.G., Hogenesch J.B.: Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 4465–4470
- [53] Szabo A., Perou C.M., Karaca M., Perreard L., Quackenbush J.F., Bernard P.S.: Statistical modeling for selecting housekeeper genes. *Genome Biol.*, 2004; 5: R59
- [54] Thellin O., Zorzi W., Lakaye B., De Borman B., Coumans B., Hennen G., Grisar T., Igout A., Heinen E.: Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J. Biotechnol.*, 1999; 75: 291–295
- [55] Touchberry C.D., Wacker M.J., Richmond S.R., Whitman S.A., Godard M.P.: Age-related changes in relative expression of real-time PCR housekeeping genes in human skeletal muscle. *J. Biomol. Tech.*, 2006; 17: 157–162
- [56] Tricarico C., Pinzani P., Bianchi S., Paglierani M., Distanti V., Pazzagli M., Bustin S.A., Orlando C.: Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping gene is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal. Biochem.*, 2002; 309: 293–300
- [57] Tsafirir D., Bacolod M., Selvanayagam Z., Tsafirir I., Shia J., Zeng Z., Liu H., Krier C., Stengel R.F., Barany F., Gerald W.L., Paty P.B., Domany E., Notterman D.A.: Relationship of gene expression and chromosomal abnormalities in colorectal cancer. *Cancer Res.*, 2006; 66: 2129–2137
- [58] Valasek M.A., Repa J.J.: The power of real-time PCR. *Adv. Physiol. Educ.*, 2005; 29: 151–159
- [59] Valenti M.T., Bertoldo F., Dalle Carbonare L., Azzarello G., Zenari S., Zanatta M., Balducci E., Vinante O., Lo Cascio V.: The effect of bisphosphonates on gene expression: GAPDH as a housekeeping or a new target gene? *BMC Cancer*, 2006; 6: 49
- [60] Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paep A., Speleman F.: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, 2002; 3: RESEARCH0034
- [61] Verma A.S., Shapiro B.H.: Sex-dependent expression of several housekeeping genes in rat liver. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2006; 21: 1004–1008
- [62] von Smolinski D., Leverkushoehe I., von Samson-Himmelstjerna G., Gruber A.D.: Impact of formalin-fixation and paraffin-embedding on the ratio between mRNA copy numbers of differently expressed genes. *Histochem. Cell Biol.*, 2005; 124: 177–188
- [63] Warrington J.A., Nair A., Mahadevappa M., Tsyganskaya M.: Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiol. Genomics*, 2000; 2: 143–147
- [64] Wu X., Englund K., Lindblom B., Blanck A.: mRNA-expression of often used house-keeping genes and the relation between RNA and DNA are sex steroiddependent parameters in human myometrium and fibroids. *Gynecol. Obstet. Invest.*, 2003; 55: 225–230
- [65] Zhang Z., Harrison P.M., Liu Y., Gerstein M.: Millions of years of evolution preserved: A comprehensive catalog of the processed pseudogenes in the human genom. *Genome Res.*, 2003; 13: 2541–2558