

7. Summary

7.1. SUMMARY

Human MN/CA IX protein localized on the surface of epithelial cells is a member of the carbonic anhydrase family isozymes. Its multidomain composition implies rather broad functionality. Under normal conditions MN/CA IX is expressed in several tissues of the alimentary tract, notably in the gastric mucosa. Furthermore, its aberrant expression has been connected to carcinogenesis. Recently MN/CA IX protein was linked to the regulation of cell proliferation and identified as a molecule involved in the cell adhesion. Despite the increasing knowledge about MN/CA IX protein, its physiological relevance in the gastrointestinal tract and its role in oncogenesis has not been understood.

In order to assess the function of the MN/CA IX protein *in vivo*, mice lacking the MN/CA IX protein were generated by gene targeting. In order to fulfil this approach, cDNA and genomic DNA, coding for the murine MN/CA IX protein, had to be identified, isolated and characterized. The murine counterpart of human MN/CA IX was identified on the basis of its sequence homology and expression pattern. The full length of the murine *MN/CA9* cDNA is 1982bp. The open reading frame of 1311bp has a coding capacity for a 437 amino acid protein with a theoretical molecular mass of 47,3kDa. The alignment of the predicted amino acid sequence of the murine and human *MN/CA9* cDNAs showed only 69,5% sequence identity. However, all the extracellular and intracellular domains were conserved in both. Expression of the murine *MN/CA9* mRNA is highest in mouse stomach, then in the proximal intestine and distal colon. The *MN/CA9* cDNA was also detected in several tumor cell lines (TS/A; GR/3; and MM5) and one tumor sample. This observation hints at a possible implication of the MN/CA IX protein in oncogenesis also in mouse.

For further investigation the murine MN/CA IX protein was isolated, purified, and the identity validated by MALDI-MS. Since the used purification method is applicable only for enzymatically active carbonic anhydrases, this result at the same time sustains the conservation of at least some carbonic anhydrase activity of the murine MN/CA IX protein. The apparent molecular mass of the murine MN/CA IX was estimated at 54kDa. This result was confirmed by Western blot analysis with prepared polyclonal rabbit antiserum which was raised against an oligopeptide from the proteoglycan-like domain.

The murine *MN/CA9* gene was isolated from a mouse genomic library. The gene is divided into 11 exons and 10 introns, spanning 6,7kb of the mouse genomic DNA. A comparison of exon/intron boundaries of the mouse and human genes showed identical gene structure suggesting their high evolutionary conservation.

A replacement type vector with a targeted interruption of the first exon of the murine *MN/CA9* gene was introduced into the mouse embryonic stem cells by homologous recombination. The mice, homozygous in the *MN/CA9* gene mutation, were normal in terms of size, activity, behavior, ability to reproduce and life span. The most remarkable changes were found in the gastric mucosa of *MN/CA9*^{-/-} mice. Severe hyperplasia in adult mutant mice concerned all major glandular and superficial epithelial cells. In addition to hyperplastic changes, large pathological cysts were observed. The first mild changes in the thickness of the gastric epithelium were detected already in newborn *MN/CA9*^{-/-} mice.

Immunohistochemical staining for PCNA indicated a massive enlargement and disorganization of the proliferative zone of the stomach epithelium. A similarly disorganized pattern was observed by E-cadherin immunostaining of the gastric mucosa of mutant mice. The ratio of the number of proliferative cells stained by PCNA and total number of cells in the proliferative area was approximately the same as in the *MN/CA9*^{+/+} mice. Since a defect in the cellular death was excluded, the alterations in the gastric epithelium are most likely caused by deregulated cell proliferation. Whether E-cadherin mediated cell adhesion is affected by the absence of MN/CA IX remains still to be determined.

Although the precise physiological role of the MN/CA IX protein in the gastrointestinal tract is still not clear, significant insight has been gained. We propose that the null mutation of MN/CA IX protein perturbs the process of proper mediation and/or processing of the extracellular signaling that normally defines the level of the proliferation and maintenance of the architecture of gastric epithelial cells.

Among the carbonic anhydrase isozymes *MN/CA9*^{-/-} mice are the first animal model for carbonic anhydrase deficiency constructed by gene targeting. Moreover, MN/CA IX is the first targeted adhesion-related molecule expressed in the gastrointestinal epithelium that revealed involvement in morphogenesis of the mucosa. The *MN/CA9*^{-/-} deficient mouse provide an excellent system to elucidate the role of this molecule in the morphogenesis of the gastric epithelium and its involvement in carcinogenesis.

7.2. ZUSAMMENFASSUNG

Das humane MN/CA IX Protein, welches sich auf der Oberfläche von Epithelzellen befindet, ist ein Mitglied der Familie der Carboanhydraseisozymen. Seine multidomäne Zusammensetzung deutet auf eine vielseitige Funktion. Unter normalen Bedingungen wird MN/CA IX in verschiedenen Geweben exprimiert, hauptsächlich in den Schleimhäuten des Gastrointestinaltrakts. Eine gestörte Expression ist mit Krebsentwicklung in Zusammenhang gebracht worden. MN/CA IX Protein beeinflusst auch die Regulation der Zellproliferation und der Zelladhäsion. Obwohl die Erkenntnis über *MN/CA9* zunimmt, bleibt seine physiologische Relevanz im Gastrointestinaltrakt und seine Rolle bei der Krebsentwicklung unverstanden.

Um Verständnis für die Funktion des MN/CA IX Proteins *in vivo* zu erlangen, wurden Mäuse mit einer Nullmutation im *MN/CA9* Gen durch gezielte Mutagenese hergestellt. Vorbereitend wurden die cDNA und die genomische DNA Sequenzen der Maus homologen isoliert und charakterisiert. Das maushomologe *MN/CA9* Gen wurde basierend auf DNA Sequenzhomologie und anhand von Expressionsmustern identifiziert. Die murine cDNA von *MN/CA9* ist 1982 Basenpaare lang. Das offene Leseraster besteht aus 1311 Basenpaaren kodiert ein Protein mit 437 Aminosäuren und einer theoretischen Masse von 47,3kDa. Die Sequenzhomologie der humanen und murinen cDNA Sequenz von *MN/CA9* ist nur 69,5%. Alle intra- und extrazellulären Domänen sind jedoch konserviert. Die Expression der murinen *MN/CA9* mRNA ist im Magen am höchsten, gefolgt vom proximalen und distalen Darm. *MN/CA9* cDNA konnte auch in einer Reihe von Tumorzelllinien (TS/A, GR/3 und MM5) und in einer Tumorprobe nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine mögliche Rolle von MN/CA IX Protein in der Krebsentstehung hin.

Zur weiteren Untersuchung wurde das murine MN/CA IX Protein isoliert, aufgereinigt und seine Identität mit MALDI-MS bestätigt. Die verwendete Aufreinigungsmethode ermöglicht lediglich die Isolation von enzymatisch aktiven Carboanhydrasen. Dies bezeugt eine mindestens teilweise Carboanhydrase-Aktivität der murinen MN/CA IX. Die Masse des isolierten Proteins wurde mit 54kDa abgeschätzt. Dieses Resultat wurde mit einer Westernblot Analyse mit polyklonalem Kaninchenantiserum, welches gegen Oligopeptide aus der proteoglykan-ähnlichen Domäne des murinen MN/CA IX Protein hergestellt wurde, bestätigt.

Das murine *MN/CA9* Gen wurde aus einer murinen genomischen Bibliothek isoliert. Es reicht über 6,7kBasen und ist aufgeteilt in 11 Exons und 10 Introns. Der Vergleich der

Exon/Intron Abgrenzung des humanen und murinen Gens zeigt die identische Genstruktur, was auf eine hohe evolutionäre Konservierung hindeutet.

Mittels homologer Rekombination wurde ein Ersatzvektor mit einer Unterbrechung im ersten Exon des murinen *MN/CA9* in embryonale Stammzellen eingeführt. *MN/CA9^{-/-}* Mäuse waren normal in Bezug auf Körpergrösse, Aktivität, Verhalten, Fortpflanzungsfähigkeit und Lebensspanne. Die bemerkenswertesten Unterschiede wurden in der Magenschleimhaut gefunden. Erwachsene *MN/CA9^{-/-}* Tiere zeigten eine ausgeprägte Hyperplasie in Drüsen- und oberflächlichen Epithelzellen. Grosse pathologische Zysten wurden auch beobachtet. Die ersten Anzeichen der Verdickung des gastrischen Epithels wurden bereits in Neugeborenen *MN/CA9^{-/-}* Mäusen gefunden.

Eine immunohistochemische Anfärbung für PNCA zeigte eine massive Expansion und Desorganisation in der proliferierenden Zone des Magenepithels. Ein ähnlich unorganisiertes Muster wurde mit E-Cadherin-Immunoanfärbung des gastrischen Epithels in den mutierten Mäusen gefunden. Das Verhältnis der Anzahl proliferierender und der Gesamtzahl der Zellen in der proliferierenden Zone blieb vergleichbar zu *MN/CA9^{+/+}* Tieren. Da eine Störung der Apoptose ausgeschlossen werden konnte, sind die Unterschiede wahrscheinlich auf eine Störung in der Zellproliferation zurückzuführen. Ob eine durch E-Cadherin vermittelte Zelladhäsion durch die Abwesenheit von MN/CA IX beeinflusst wird, muss noch ermittelt werden.

Obwohl die genaue physiologische Rolle von MN/CA IX Protein im Gastrointestinaltrakt immer noch nicht klar ist, sind wesentliche Fortschritte erzielt worden. Wir vermuten, dass die Nullmutation von MN/CA IX Protein den Prozess der Übermittlung und Verarbeitung der extrazellulären Signale, der normalerweise den Grad der Zellproliferation und der Integrität des gastrischen Epithelzellen regelt, stört.

Diese *MN/CA9^{-/-}* Mäuse sind das erste Tiermodell für ein Carboanhydrase, das mit gezielter Mutagenese erstellt wurde. MN/CA IX ist das erste adhäsionsvermittelnde Molekül, welches im Gastrointestinaltrakt exprimiert wird und eine Rolle in der Morphogenese der Magenschleimhaut zeigt. *MN/CA9^{-/-}* Mäuse sind ein ausgezeichnetes Tiermodell um die Rolle von MN/CA IX in der Morphogenese des gastrischen Epithels und seinen Zusammenhang mit der Krebsentwicklung zu untersuchen.