

**Frühe molekularbiologische Alterationen des Magenkarzinoms:
Expression von Carboanhydrase 9 und Metallothionein 2A**

Der Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.),

am 23.02.2004

eingereichte Dissertation,

vorgelegt von Diplom-Biochemikerin Juliane Hoffmann, geb. Most

Zusammenfassung

Frühe molekulare Veränderungen, die zur Entwicklung eines Magenkarzinoms führen, sind für die Erforschung der noch weitgehend ungeklärten Pathomechanismen des Magenkarzinoms von besonderem Interesse, da sie zur rechtzeitigen Diagnostik eines Magenkarzinoms beitragen können. Zu diesen frühen molekularen Veränderungen scheint die reduzierte Expression von Carboanhydrase IX (MN/CA9) zu gehören, worauf erste immunhistochemische Untersuchungen bereits hindeuten (Pastorekova *et al.* 1997). Die umfangreichen immunhistochemischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit belegen den Verlust der Expression von MN/CA9 in 35 von 57 Magenkarzinomen, wogegen die Expression von MN/CA9 an der Invasionsfront einiger Magenkarzinome mit einer schlechteren Prognose einhergeht. Der allgemeine Verlust der Expression war sowohl auf Proteinebene als auch auf Transkriptionsebene nachweisbar. Wie durch Demethylierung von AGS- Magenkarzinomzellen gezeigt werden konnte, beruht die reduzierte Expression von MN/CA9 zumindest teilweise auf der Promotormethylierung des MN/CA9-Gens. Ein höheres invasives Potential von MN/CA9-exprimierenden AGS-Zellen im Vergleich zu unbehandelten AGS-Zellen konnte sowohl durch Demethylierung als auch durch Transfektion der Zellen mit MN/CA9-cDNA nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass der Verlust von MN/CA9, ein früher Schritt in der Karzinogenese des Magenkarzinoms, mit erhöhter Promotormethylierung von *MN/CA9* assoziiert ist. Im Verlauf fortschreitender Progression kann es an der Invasionsfront zur Induktion der MN/CA9 Expression kommen und diesen Tumorzellen damit einen zusätzlichen Vorteil durch verstärkte Proliferation und Invasion verschaffen.

Auf der Suche nach weiteren Genen, die an der Karzinogenese des Magens beteiligt sind, verwendeten wir die DDRT-PCR-Technik, um die Expressionsmuster von Magenmukosa und Magenkarzinom auf mRNA-Ebene miteinander zu vergleichen. Auf diese Weise konnten wir ein cDNA-Fragment von 99bp mit starker Homologie zur mRNA des humanen Metallothionein Isoform 2A (MT2A) identifizieren, welches im Magenkarzinom überexprimiert vorlag. Die verstärkte Expression von MT2A im Magenkarzinom konnte durch quantitative *realtime* PCR-Analyse bestätigt werden.

Anschließende immunhistochemische Analysen von 34 Magenkarzinomresektaten wiesen die Expression von Metallothionein in allen Magenkarzinomen des diffusen Typs, in 90% der intestinalen Magenkarzinome sowie allen Magenkarzinomen des gemischten Typs im Zytoplasma und an der Zelloberfläche der Tumorzellen nach. Ein Zusammenhang zwischen Metallothioneinexpression und Tumorstadium nach TNM-Klassifikation ließ sich nicht ableiten. Desweiteren belegen die Ergebnisse unserer immunhistochemischen Untersuchungen eine Metallothioneinexpression in Bereichen intestinaler Metaplasie sowohl bei Magenkarzinompatienten als auch bei *H. pylori* infizierten Patienten ohne Magenkarzinom. Das Oberflächenepithel der Magenschleimhaut gesunder Probanden und karzinomfreier Patienten zeigte unabhängig von einer *H. pylori* Infektion keine Metallothioneinexpression. Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen die Hypothese, dass Veränderungen der Metallothioneinexpression ebenfalls ein frühes Ereignis in der Entwicklung eines Magenkarzinoms darstellen.