

Rahel Thangam Hoene
Dr. med.

The Function of Colorectal Cancer Stem Cell Marker Claudin-7 in Epithelial-Mesenchymal Transition

Fach/Einrichtung: Chirurgie
Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. Thilo Hackert

Das Überleben von Patienten, die an fortgeschrittenem kolorektalen Karzinom (KRK) leiden wird überwiegend durch Tumorrezidive und Metastasierung bestimmt. Eine wichtige Rolle wird hierbei Tumorstammzellen (TSZ) zugeschrieben. TSZ sind essentiell für Tumorinitiation, -progression sowie Resistenz gegenüber Chemo- und Strahlentherapie. Darüber hinaus werden sie für den Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) verantwortlich gemacht. Die EMT erlaubt epithelialen Tumorzellen einen mesenchymalen, migratorischen Phänotyp zu etablieren, der für Metastasierung essentiell ist. Untersuchungen zur phänotypischen und funktionellen Charakterisierung von TSZ ist daher ein zentrales Anliegen der Tumorzellbiologie. Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (*epithelial cell adhesion molecule*, EpCAM) ist ein Transmembranprotein zur Zell-Zell-Adhäsion welches wiederholt mit der Progression von Krebs in Verbindung gebracht wird und häufig als TSZ-Marker für das KRK gilt. Verschiedene Studien in denen Patienten mit KRK mit einem Antikörper gegen EpCAM behandelt wurden zeigen eine verlängerte, krankheitsfreie Überlebenszeit. Meine und weitere Arbeitsgruppen lieferten Hinweise, dass EpCAM möglicherweise nur im Zusammenspiel mit Claudin-7 Stammzeleigenschaften fördert.

Claudin-7 gehört zu einer Familie von vier Transmembranproteinen, die bei epithelialen Zellen in der apikalen Region *tight junctions* (TJ) bilden und sowohl Zellpolarität als auch Permeabilität beeinflussen. Aufgrund dieser funktionellen Charakterisierung wurde viele Claudine, so auch Claudin-7, als Tumor- und Metastasierungssuppressorgene beschrieben. Allerdings ergaben sich beim Pankreaskarzinom der Ratte Hinweise, dass diese Eigenschaften nicht auf maligne Zellen zutreffen, zudem ist Claudin-7 in KRK und KRK-Metastasen überexprimiert. Beim Pankreaskarzinom bildet Claudin-7 mit EpCAM und Tetraspanin-8 einen Komplex welcher in glykolipidreichen Membranmikrodomänen (GEMs) lokalisiert ist. GEMs dienen der Assoziation verschiedener Membranproteine sowie der Rekrutierung und Aktivierung von Signaltransduktionsmolekülen. Ziel meiner Dissertation war die im Rattenmodell des Pankreaskarzinoms erhobenen Befunde für das humane KRK zu überprüfen. Zudem sollten die zugrunde liegenden Mechanismen weiter geklärt werden.

Durch stabile Expression von shRNA gegen Claudin-7 generierte ich Claudin-7 knockdown Klone der KRK-Zelllinien HT29 und SW948 (cld7^{kd}). *In vitro* wurde dann der Einfluss von Claudin-7 auf SZ-Eigenschaften, Migrationsaktivität und EMT von HT29 und SW948 untersucht. Die Rolle von Claudin-7 auf Tumorwachstum und Metastasierung wurde in *non-obese diabetic/severe combined immunodeficient* (NOD/SCID) Mäusen *in vivo* untersucht.

Die erhobenen Daten belegen die essentielle Rolle von Claudin-7 bei der Bildung von Spheroiden und Holoklonen sowie der Klonogenität. Claudin-7 unterstützte die Quieszenz von Stammzellen und Resistenz gegen durch Chemotherapie ausgelöste Apoptose. Zudem zeigte sich Claudin-7 wichtig für die Lokalisierung von EpCAM in GEMs. Gleichzeitig zeigten sich cld7^{kd} Zellen durch die verminderte Expression der antiapoptotischen Proteine Bcl-2, phosphoryliertem Bad und *multidrug resistance protein*, weniger apoptoseresistent. Claudin-7 unterstützte die EMT und Tumorzellmotilität. Cld7^{kd} Zellen exprimierten mehr E-Cadherin und weniger N-Cadherin, Slug, Twist, *Zinc finger E-box-binding protein* und *Transcription Factor 4*. Claudin-7 unterstützte durch Regulation der Interaktion mit den Integrinen $\beta 4$ und $\alpha 3$ die Zellmigration. Zudem konnte phosphoryliertes (p)-Claudin-7 im Zytoplasma nachgewiesen werden, ein Phänomen das nicht für epitheliales, in TJ-eingebundenes Claudin-7 beschrieben wurde. Dies wurde als ein erster Hinweis auf TJ-unabhängige Funktionen von Claudinen gewertet. Die *in vivo* Experimente bestätigen die Rolle von Claudin-7 bei Tumorwachstum und Metastasierung von KRK-Zellen. Mäuse die mit cld7^{kd} Zellen injiziert wurden entwickelten kleinere Primärtumore und präferentielle Metastasenorgane enthielten seltener Tumorzellen als Mäuse die mit Wildtypzellen injiziert wurden.

Diese Befunde belegen, dass Claudin-7 ein TSZ-Marker des kolorektalen Karzinoms darstellt, der zur Aufrechterhaltung des TSZ-Phänotyps beiträgt. Zusätzlich fördert Claudin-7 die für die Metastasierung wichtigen Vorgänge der EMT und Zellmigration und trägt zu den tumorigenen Aktivitäten von EpCAM bei.