

DISS ETH No
14157

Influence of tyrosine phosphorylation and ischemia on paracellular permeability in endothelial cells

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

Marco Wachtel

Dipl. Natw. ETH

Born 20.3.1972
from Zurich

Prof. Dr. K.H. Winterhalter, examiner
Prof. Dr. C. Bauer, co-examiner
PD Dr. S.M. Gloor, co-examiner

2001

2. Zusammenfassung

Eine Voraussetzung für die Kompartimentalisierung des Organismus sind zelluläre Barrieren zwischen den verschiedenen Kompartimenten. Endothelzellen kleiden die Blut- und Lymphgefäße aus und sind u.a. für die Barriere zwischen Blut und Gewebe verantwortlich. Eine Reihe von Krankheiten wie Infektionen, Entzündungsreaktionen, und allergische Reaktionen können zum Zusammenbruch dieser Barriere führen und damit die Funktion der betroffenen Organe stören.

Der Transport von Molekülen durch die endotheliale Barriere kann prinzipiell auf zwei Arten erfolgen: (1) Durch die Zelle, den transzellulären Weg, und (2) zwischen den Zellen, den parazellulären Weg. In Endothelien ist der parazelluläre Weg durch sog. Schlussleisten (tight junctions), Zell-Zellverbindungen, die in der apikalen Region die Zelle vollständig umschliessen, abgedichtet. Die Barriereigenschaften der Schlussleisten kann durch verschiedene pathologische Signale signifikant verändert werden. Zu diesen Signalen gehören u.a. Sauerstoffmangel (Hypoxie) resp. Mangel an Sauerstoff und Nährstoffen (ischaemische Bedingungen). Unter hypoxischen resp. ischaemischen Bedingungen nimmt die normalerweise sehr geringe und selektive Durchlässigkeit der parazellulären Schranke zu, was zu Ödemen führen kann.

Signalübertragungswege, die wahrscheinlich an der Ischaemie-induzierten Änderung der endothelialen Permeabilität beteiligt sind, sind die "mitogen-activated protein kinase (MAPK)" -Wege, unter anderem der "extracellular signal-regulated kinase (ERK)"-Weg. Ausserdem gibt es Hinweise, dass Tyrosinphosphorylierung an der Kontrolle der Durchlässigkeit der Schlussleisten beteiligt ist. Die genauen Mechanismen der Durchlässigkeitskontrolle sind aber noch weitgehend unbekannt. Wir haben daher ein geeignetes endotheliales *in vitro* Barrieremodell etabliert und damit zuerst den Einfluss der Tyrosinphosphorylierung auf die Integrität und die funktionellen Charakteristika der Schlussleisten mittels Protein Tyrosin Phosphatase (PTP)-Hemmern getestet. Darauf basierend haben wir die Rolle von ERK beim Zusammenbruch der endothelialen Barriere während Ischaemie untersucht.

Wir fanden heraus, dass die Hemmung von PTP zum Verschwinden des transmembranen Schlussleistenproteins Occludin von der Zellperipherie führt. Gleichzeitig steigt die parazelluläre Durchlässigkeit an. Andere Proteine der Schlussleisten und der Adhäsionsverbindungen hingegen verbleiben an ihrer Position. Weitere Untersuchungen dieses Prozesses zeigten, dass PTP-Hemmung zur Proteolyse von Occludin durch eine Metalloproteinase führt. Sowohl die Spaltung von Occludin, als auch die Umverteilung und die Erhöhung der Permeabilität konnten durch den Metalloproteinase-Inhibitor 1,10-Phenanthrolin gehemmt werden. Diese Resultate

Summary

zeigen, dass die durch PTP-Hemmung selektive induzierte Proteolyse von Occludin zu einer Erhöhung der parazellulären Durchlässigkeit in Endothelzellen führt.

Ischaemische Bedingungen führten ebenfalls zu Erhöhung der parazellulären Durchlässigkeit im endothelialen *in vitro* Barrieremodell, allerdings ohne die Verteilung von Occludin stark zu beeinflussen. Dafür kam es zu einer ausgeprägten Umverteilung des Aktin-Zytoskelettes, die durch vollständiges Verschwinden der Stressfasern und Verlagerung des verbleibenden F-Aktins an die Zellperipherie charakterisiert war. Alle diese Effekte waren bei Reoxygenierung reversibel. Der ERK-Signalweg wurde unter ischaemischen Bedingungen zuerst rasch aktiviert, gefolgt von einer beinahe vollständigen Inaktivierung. Bei Reoxygenierung wurde ERK reaktiviert. Die Hemmung der ERK Aktivierung mit Hilfe des selektiven Inhibitors U0126 verhinderte die Wiederherstellung der ursprünglichen Zytoskelettstruktur und Durchlässigkeit während der Reoxygenierung. Diese Resultate zeigen, dass die Aktivität von ERK für die Organisation des Aktin-Zytoskelettes wichtig ist. Darüberhinaus deuten sie an, dass die Aktivierung von ERK eine Schutzreaktion beim Zusammenbruch der endothelialen Schranke während Ischaemie darstellt.

3. Summary

Compartmentalisation of the organism necessitates cellular linings, which function as building barriers between compartments. Endothelial cells between blood and lymph vessels and tissue constitute such a lining, whose failure is conditioned by numerous pathological processes such as inflammatory and allergic reactions, often as a consequence of infections, leading to edemas and haemorrhages. This is apt to compromise organ function.

The movement of molecules across the endothelial lining can principally occur by two routes: (1) through the cell, the transcellular pathway, and (2) between adjacent cells, the paracellular pathway. In endothelia, the paracellular route is obstructed by tight junctions (TJs), which are cell-cell junctional complexes arranged in a belt-like structure in the apical region of plasma membranes. In response to pathological signals the usually effective paracellular barrier can undergo significant alterations of its barrier characteristics. Such signals are e.g. the lack of oxygen (hypoxia), or the lack of oxygen and nutrients (ischemia). Under hypoxic/ischemic conditions, the endothelial paracellular permeability increases, resulting in tissue edema.

Signal transduction pathways responsible for ischemia-induced endothelial permeability changes include the mitogen-activated protein kinase (MAPK), especially the extracellular, signal-regulated, kinase (ERK). In addition, there is evidence that tyrosine phosphorylation participates in the control of TJ function. However, a general understanding of endothelial barrier control is still elusive. Therefore, we developed a suitable endothelial *in vitro* barrier model and directly examined the influence of tyrosine phosphorylation on the integrity and functional characteristics of the TJs with the help of protein tyrosine phosphatase (PTP) inhibitors and analyzed the role of ERK in endothelial barrier dysfunction during ischemia.

We found that inhibition of PTPs leads to progressive disappearance of the transmembrane TJ protein occludin from the cell periphery concomitant to a rise in paracellular permeability. Other junctional marker proteins remained at their junctional localisation. Further characterisation of this process demonstrated that PTP inhibition induces occludin proteolysis by a metalloproteinase. PTP-inhibitor-induced occludin proteolysis and the accompanying rise in permeability and occludin redistribution was abolished by the metalloproteinase inhibitor 1,10-phenanthroline. These results indicate that selective proteolysis of occludin by inhibition of PTP activity results in paracellular permeability increase.

Ischemic conditions also elevated paracellular permeability in endothelial monolayers without, however, significantly disrupting TJ. Instead, a major redistribution of the actin cytoskeleton was found, characterised by nearly complete loss of stress fibres and

Summary

increased circumcellular localisation of the F-actin. All these effects were reversed after reoxygenation. During ischemia ERK first was rapidly activated, followed by nearly complete inactivation under ischemic conditions. After reoxygenation ERK was reactivated. Inhibition of the ERK-pathway by the selective inhibitor U0126 during reoxygenation prevented reestablishment of the actin cytoskeleton and also the decrease of permeability. These results show that ERK is necessary for proper (re)organisation of the actin cytoskeleton and suggests that reactivation of ERK might protect against ischemia-induced barrier breakdown.