

Diss. ETH No. 17159

Tight junctions as a target for permeation enhancement

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

JIŘÍ HOFMANN

Pharmacist, Charles University in Prague

born September 22, 1978

citizen of Czech Republic

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Heidi Wunderli-Allenspach, examiner
Prof. Dr. Dario Neri, co-examiner
PD Dr. Stefanie D. Krämer, co-examiner

2007

Summary

Tight junctions (TJs) form a seal between adjacent cells, regulating the free diffusion of solutes and ions. A controlled and reversible opening of TJs would improve the permeation of hydrophilic drugs across tight epithelial and endothelial cell sheets. A number of paracellular permeation enhancers have been published, however, their effect is generally mediated by an activation of signalling pathways, which leads to an uncontrolled opening of TJs and in consequence to cellular toxicity.

In order to learn more about the behavior of single TJ proteins upon the TJ modulation, we applied the calcium chelation method in a cell culture of epithelial phenotype (MDCK, Madin Darby canine kidney). We have chosen cingulin and claudin-1 as the representatives for the plaque and transmembrane proteins of TJs, respectively, and investigated their co-localization and dynamic behavior in combination with other proteins of TJs. According to the morphology of the cells after the TJ opening, we defined two regions of interest for the co-localization analysis, the membrane areas and the filaments remaining between the cells. Statistical analysis of the CLSM data revealed one major peak of co-localization for cingulin with zonula occludens-1 protein (ZO-1), occludin (OCLN) and F-actin, respectively, under normal calcium conditions. After calcium depletion, this pattern was not significantly changed in the membrane regions. The maximum of co-localization shifted to a more basal position for the protein pair cingulin with ZO-1 and F-actin, respectively, due to the changed geometry of cells (rounding up). In the filaments remaining between the cells, the co-localization was slightly reduced for the protein pairs of cingulin with OCLN and F-actin. In contrast, the co-localization of cingulin with ZO-1 was significantly reduced. To explore the kinetics of the TJ re-assembly, MDCK cells were transfected with green fluorescent protein-tagged claudin-1 (GFP-CLD1). Unfortunately, the live-imaging of the GFP-CLD1 dynamics failed due to a photoinstability of the fusion protein, and thus fixed samples were used to describe the kinetics of re-sealing of GFP-CLD1 in combination with ZO-1, claudin-4 (CLD4) and F-actin, respectively. We observed no significant differences between the kinetics of the respective proteins upon the TJ re-formation. The studies on the localization and co-localization of TJ proteins provide us with important information about the behavior of different proteins in the state of disassembly and re-assembly of TJs and contribute to evaluate the safety of new paracellular permeation enhancers.

The current model of TJs suggests that the extracellular domains of CLDs interact homotypically or heterotypically to bridge the paracellular space. Therefore, we used a recently developed strategy to modulate TJs that is based on the use of peptides containing sequences of the extracellular loops of transmembrane TJ proteins. These homologous peptides should compete for the seal between adjacent cells and induce a transient loosening of TJs, without complete disruption of the complexes and without inducing unwanted cell reactions. The modulation of TJs was monitored with transepithelial electrical resistance measurements (TEER) and

the mannitol permeability assay. We tested a set of peptide homologues to the loop sequences of human CLD1, CLD2 and CLD4 for their ability to modulate TJs in MDCK cells. To find optimal conditions for a TJ-modulating activity, we varied several critical factors in the assays, such as the concentration of foetal calf serum (FCS) in cell cultures, the oxidation-reduction state of peptides, the seeding density of the cultured cells and the peptide concentration for incubation. From the 14 tested CLD peptide homologues, two sequences (CLD1 49-60 and CLD2 31-49) decreased the TEER and increased the paracellular flux of mannitol. However, a closer inspection of the effect by CLSM revealed alterations in the immunostaining for ZO-1 and OCLN as well as massive changes in the cell morphology. These morphology changes were due to an unspecific influence of the peptide aggregates on the cell layer, as we confirmed in re-designed assays with fully solubilized peptides. We also included two peptide homologues to OCLN that had been described to modulate TJs in epithelial cells as a positive control for our assays. Contrary to what has previously been reported, none of the peptides increased the paracellular mannitol flux in MDCK and Caco-2 cells, respectively. A fluorescent analogue of an OCLN peptide was endocytosed by the MDCK cells and no binding to TJ structures was observed. In Caco-2 cells, only a non-specific binding to the cell layer occurred. We demonstrated that the approach to modulate TJs with peptides emulating the sequences of the extracellular loops of CLDs and OCLN is inefficient and associated with non-specific effects of peptides.

A simple *in-vitro* assay based on interactions between the extracellular loop of claudins allows to screen for novel permeation enhancers. In this assay, purified transmembrane claudins are reconstituted into the liposomes. The reconstituted proteins display their hydrophobic extracellular domains and should interact together to mediate an aggregation of the liposomes. Because the claudin-1 is expressed in most mammalian epithelia and studies with knock-out mice confirmed the crucial role of this protein for the formation of TJs, we have chosen this protein as a suitable candidate to establish the proteoliposomal assay. His-tagged claudin-1 (His-CLD1) was expressed in the baculovirus system, purified and reconstituted by detergent dialysis into phosphatidyl choline liposomes. In this pilot study, we showed a successful reconstitution of the His-CLD1 into the phosphatidyl liposomes. Characterization of the proteoliposomes by dynamic laser scattering revealed no differences between the size of the proteoliposomes and control liposomes (prepared without the protein), and we did not observe an interaction between the reconstituted proteins, i.e. no significant aggregation of liposomes. The low yield of His-CLD1 in the purification represented a major problem, and can be attributed to the low expression level of His-CLD1 in the baculovirus system. An increase in the protein concentration should be the next step to investigate the His-CLD1 proteoliposomal system. Thus, the protocols regarding the expression and purification must be further optimized to obtain a high yield of purified protein to achieve this goal.

Zusammenfassung

Die 'Tight Junctions' (TJs) bilden eine Barriere zwischen benachbarten Zellen. Diese Barriere reguliert die Diffusion von Molekülen und Ionen. Eine kontrollierte und reversible Öffnung von TJs könnte die Permeation von vielen hydrophilen Arzneistoffen durch Epithelien und Endothelien verbessern. Eine Reihe von sogenannten 'parazellulären Permeationsverstärkern' ist bereits veröffentlicht worden. Ihr Effekt wird jedoch im Allgemeinen durch eine Aktivierung von Signalkaskaden vermittelt, die oft zu einer irreversiblen TJ-Öffnung und somit zu Zelltoxizität führt.

Um mehr über das Verhalten der einzelnen TJ-Proteine bei einer TJ-Modulation zu erfahren, wurde eine epitheliale Zelllinie (MDCK-Zellen) kurzfristig mit einem Calcium-Chelator (EGTA) behandelt. Dies bewirkte eine reversible Öffnung der TJs. Als Repräsentanten für die Plaque- und Transmembranproteine der TJs wählten wir Claudin-1 und Cingulin, deren Colokalisierung und dynamisches Verhalten im Bezug auf andere TJ-Proteine wir mittels 'Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie' (CLSM) untersuchten. Aufgrund unterschiedlicher Zellmorphologie nach einer Öffnung der TJs haben wir zwei Interessensregionen für die Colokalisierungsanalyse definiert: einerseits die Membranbereiche und andererseits die Filamente, die nach der Öffnung der TJs zwischen benachbarten Zellen sichtbar waren. Unter normalen Calcium-Bedingungen zeigten statistische Analysen eine hauptsächlich Colokalisierung von Cingulin mit Zonula occludens-1 Protein (ZO-1), Occludin (OCLN), als auch mit F-Actin. Dieses Muster veränderte sich nach dem Entzug von Calcium in den Membranregionen nur unwesentlich. Jedoch verschoben sich die Colokalisierungen von Cingulin mit ZO-1 und F-Actin in basaler Richtung. Dieser Effekt liess sich mit dem Abrunden der Zellen, also einer Veränderung der Zellgeometrie erklären. In der Filamentenregion nahm die Colokalisierung der Proteinpaaare Cingulin/OCLN und Cingulin/F-Actin etwas ab. Für Cingulin und ZO-1 wurde hingegen eine markante Reduktion der Colokalisierung festgestellt. Um die Kinetik des TJ-Wiederaufbaus zu studieren, wurde ein Fusionsprotein mit Claudin-1 und dem grün fluoreszierenden Protein (GFP-CLD1) hergestellt. Dieses wurde in MDCK Zellen exprimiert. Unglücklicherweise verhinderte eine Photoinstabilität des Fusionsproteines eine Lebendaufnahme der GFP-CLD1 Dynamik. Stattdessen wurden fixierte Proben verwendet, um die Kinetik von GFP-CLD1 mit ZO-1, Claudin-4 (CLD4) und F-Actin zu studieren. Wir konnten jedoch keine wesentlichen Unterschiede im Verhalten der entsprechenden Proteine bei der Neubildung der TJs feststellen. Die Studien der Verteilung und Colokalisierung der TJ-Proteine liefern uns viele Informationen über das Verhalten der Proteine in verschiedenen TJ-Zuständen. Ausserdem helfen solche Studien, die Sicherheit neuer parazellulären Permeationsverstärker besser zu evaluieren.

Das aktuelle TJ-Modell nimmt an, dass die extrazellulären Domänen der verschiedenen CLDs homo- und heterotypisch miteinander interagieren und so den parazellulären Raum schliessen. Wir benutzten eine vor kurzem entwickelte Strategie, die auf diesem Modell auf-

baut: freie Peptide bestehend aus Sequenzen aus den extrazellulären Domänen von TJ-Proteinen könnten kompetitiv die Interaktionen zwischen benachbarten Zellen konkurrenzieren. Dies sollte zu einer vorübergehenden Öffnung der TJ führen, ohne die involvierten Komplexe zu zerstören und ohne unerwünschte Nebenwirkungen auszulösen. Wir testeten einen Satz Peptide mit homologen Sequenzen zu den extrazellulären Domänen von humanen CLD1, CLD2 und CLD4 auf die Fähigkeit, TJs in MDCK Zellen zu beeinflussen. Der Einfluss auf TJs wurde mittels Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) und Permeationsuntersuchungen mit Mannitol überprüft. Wir veränderten verschiedene Faktoren, um die optimalen Bedingungen für eine modulierende Aktivität zu finden. Dazu gehörten unter anderem die Konzentration von foetalem Kalbserum (FCS) in der Zellkultur, der Redox-Zustand der Peptide, die Zelldichte und die Peptidkonzentration. Von 14 getesteten Sequenzen führten zwei (CLD1 49-60 und CLD2 31-49) zu einer Abnahme des TEERs bei gleichzeitiger Zunahme der Mannitol Permeabilität. Leider zeigten genauere Untersuchungen mit CLSM eine starke Veränderung der Zellmorphologie und veränderte Immunfärbungen von ZO-1 und OCLN, die auf den Einfluss von Peptidaggregaten zurückzuführen sind. Als Positivkontrolle testeten wir auch zwei Peptide mit homologen Sequenzen zu der ersten extrazellulären Domäne von Occludin, von welchen vorher gezeigt wurde, dass sie TJs in Zellen beeinflussen können. Im Gegensatz dazu fanden wir aber bei keinem der beiden Peptide einen Anstieg der Mannitol Permeation, weder in MDCK noch in Caco-2 Zellen. Ein fluoreszierendes Peptid mit homologer Sequenz zu Occludin wurde im Versuch mit MDCK Zellen endozytiert, ohne dass eine Bindung an TJ-Strukturen beobachtet werden konnte. In Versuchen mit Caco-2 Zellen fanden wir nur eine unspezifische Bindung an die Zellschicht. Wir konnten also zeigen, dass die Methode, TJs mit homologen Sequenzen zu den extrazellulären Domänen von CLDs and OCLN zu beeinflussen, uneffizient ist und die teilweise Modulation der TJs durch unspezifische Effekte der Peptide hervorgerufen wird.

Ein einfacher *in-vitro* Assay, welcher auf die Wechselwirkungen zwischen den extrazellulären Domänen von Claudinen aufbaut, wäre nützlich, neue Permeationsverstärker zu finden. In diesem Assay werden aufgereinigte Claudin-Proteine in Liposomen eingebaut. Die eingebauten Proteine könnten über die exponierten extrazellulären Domänen interagieren und so ein Aggregieren der Liposomen verursachen. Für einen Pilotversuch entschieden wir uns, mit CLD1 zu arbeiten, weil CLD1 in den meisten Epithelien von Säugetieren exprimiert wird und weil knock-out Studien in Mäusen die äusserst wichtige Rolle von CLD1 für den TJ-Aufbau gezeigt haben. Wir exprimierten His-tagged Claudin-1 (His-CLD1) in einem Baculovirus System, reicherten es an und bauten es mit Hilfe von Detergendsialyse in Phosphatidylcholin-Liposomen ein. In einer Pilotstudie konnten wir einen erfolgreichen Einbau von His-CLD1 in die Liposomen zeigen. Die Charakterisierung der Proteoliposomen durch 'dynamische Lichtstreuung' zeigte keinen Grössenunterschied zwischen Proteoliposomen und Kontrollliposomen (ohne Protein). Wir konnten auch keine Interaktion zwischen den Proteinen feststellen, d.h. keine signifikante Aggregation von Liposomen. Das Hauptproblem war die geringe Ausbeute an His-CLD1 nach der Aufreinigung, welche wohl auf den schlechten Expressionsgrad im Baculovirus zurückzuführen ist. Um diesen Assay weiter zu entwickeln, werden sowohl Expression als auch Reinigung verbessert werden müssen, um genügend CLD1 für den Einbau in Proteoliposomen zu produzieren.