frontiers in Physiology

PERSPECTIVE
published: 24 May 2017
doi: 10.3389/fphys.2017.00326

La pérdida de función de la claudina altera las uniones estrechas y afecta al deterioro de la amelogénesis

Claire Bardet[1], Sandy Ribes[1], Yong Wu[1, 2], Mamadou Tidiane Diallo[1], Benjamin Salmon[1, 3], Tilman Breiderhoff[4], Pascal Houillier[5], Dominik Müller[4] and Catherine Chaussain[1, 3]*

[1] Laboratorio de Patologías Orofaciales, Imagen y Bioterapias, Facultad de Odontología, Universidad París Descartes, Sorbona París Cité, París, Francia, 2 Laboratorio Clave de Estomatología de Shanghai, Departamento de Ciencias Orales y Craneo-maxilofaciales, Noveno Hospital Popular, Facultad de Medicina de la Universidad Jiao Tong de Shanghai, Shanghai, China, 3 Departamento de Odontología, AP-HP, y Centro de Referencia para Enfermedades Raras del Metabolismo del Calcio y el Fósforo, Hospital Nord Val de Seine (Bretonneau), París, Francia, 4 Departamento de Nefrología Pediátrica, Facultad de Medicina de la Universidad Charité, Berlín, Alemania,
5 Centro de Investigación Cordeliers, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMRS 1138, Universidades Paris-Diderot, Pierre et Marie Curie y Paris Descartes, ERL, París, Francia.

Las claudinas son una familia de proteínas que forman barreras y poros paracelulares que determinan la permeabilidad de las uniones estrechas (TJ). Las Claudinas-16 y -19 son proteínas TJ formadoras de poros que permiten la reabsorción de calcio y magnesio en el asa gruesa ascendente del asa de Henle (TAL). Recientemente se ha demostrado que las mutaciones de pérdida de función en los genes que las codifican, identificadas inicialmente como causantes de la Hipomagnesemia Familiar con Hipercalciuria y Nefrocalcinosis (FHHNC), también están implicadas en la *Amelogénesis Imperfecta* (AI). Además, ambas claudinas se expresaban en el germen dental murino y los ratones *Claudin-16* "KnockOut" (KO) mostraban una formación anormal del esmalte. La claudina-3, una claudina ubicua que se expresa en epitelios como el riñón, actúa como proteína de unión estrecha formadora de barreras. Determinamos que, de forma similar a la claudina-16 y la claudina-19, la claudina-3 se expresaba en el germen dental, más concretamente en la TJ situada en el extremo apical de los ameloblastos secretores. La observación de dientes KO de *Claudina-3* reveló defectos en el esmalte asociados a una estructura de TJ deteriorada en los extremos secretores de los ameloblastos y a la acumulación de proteínas de matriz en el esmalte en formación. Así pues, la pérdida de función de la proteína claudina-3 perturba la amelogénesis de forma similar a la pérdida de función de la claudina-16, lo que pone de relieve la importancia de las proteínas claudina para la estructura de la TJ. Estos hallazgos desvelan que la pérdida de función de las proteínas TJ formadoras de poros o de barreras conduce a defectos en el esmalte. Por lo tanto, la principal función estructural de las proteínas claudina parece esencial para la amelogénesis.

Palabras clave: *Amelogénesis imperfecta*, esmalte, proteína de la unión impermeable formadora de barreras, proteína de la unión impermeable formadora de poros, claudinas

OPEN ACCESS

Edited by:
Alexandre Rezende Vieira,
University of Pittsburgh, United States

Reviewed by:
Yuqiao Zhou,
University of Pittsburgh, United States
Claudio Cantù,
University of Zurich, Switzerland
Jan Hu,
University of Michigan, United States

**Correspondence:*
Claire Bardet
claire.bardet@parisdescartes.fr

Specialty section:
This article was submitted to Craniofacial Biology and Dental Research, a section of the journal Frontiers in Physiology

Received: 27 March 2017
Accepted: 05 May 2017
Published: 24 May 2017

Citation:
Bardet C, Ribes S, Wu Y, Diallo MT, Salmon B, Breiderhoff T, Houillier P, Müller D and Chaussain C (2017) Claudin Loss-of-Function Disrupts Tight Junctions and Impairs Amelogenesis. Front. Physiol. 8:326. doi: 10.3389/fphys.2017.00326

Las células epiteliales están unidas entre sí en sus membranas laterales por un complejo de uniones intercelulares (Farquhar y Palade, 1963). El complejo más apical de las uniones intercelulares es la *zonula occludens*, también denominada uniones estrechas (TJ). Las TJ representan el componente principal de la barrera de difusión paracelular al determinar la permeabilidad epitelial de moléculas pequeñas y agua, y participan en el control de la difusión de componentes de membrana entre las regiones basolateral y apical.

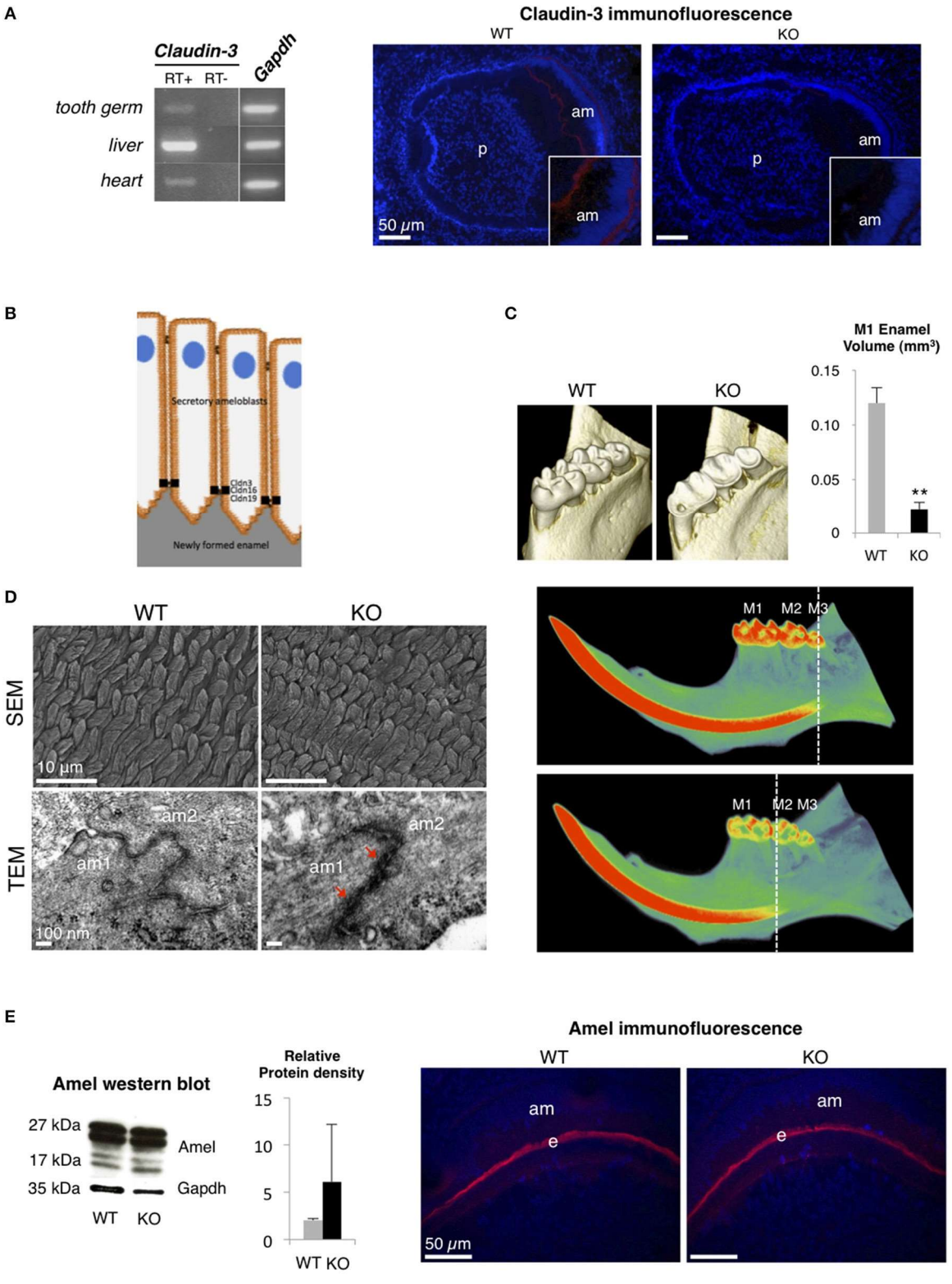

FIGURA 1 I Fenotipo dental de los ratones Claudin-3 KO. *(Continua)*

(A) Se analizó la expresión de ARNm de Claudina-3 en tejidos de ratón mediante RT-PCR utilizando el cebador directo 5 -ATG TGG CGC GTT TCG-3 y el cebador inverso 5 -GCG AGT CGT ACA TTT TGC-3 para Claudina-3 (124 pb), y el cebador directo 5 -TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA-3 y el cebador inverso 5 -TTG CTG TTG AAG TCG CAG GAG-3 para Gapdh (150 pb). Una imagen de gel representativa de los tejidos seleccionados mostró la expresión de claudina-3 en ratones en germen dentario, hígado y corazón del día 3 postnatal. La identificación de la claudina-3 en el incisivo en crecimiento continuo se realizó mediante inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo claudina-3 (#34-1700, Invitrogen) a una dilución de 1/100 y un anticuerpo anti-conejo de cabra (#R-6394, Invitrogen). La Claudina-3 se localizó en el extremo distal de los ameloblastos secretores (am). También se observó expresión proteica en el extremo basal de las células (n = 3 por grupo). **(B)** Esquema recapitulativo de la expresión de las proteínas claudina TJ en el extremo apical de los ameloblastos secretorios. Se demostró que la Claudina-3, -16 y -19 se expresan a nivel de la TJ de los extremos secretores de los ameloblastos durante la formación del esmalte en el ratón. **(C)** La representación de volumen 3D a partir de datos de Micro-CT mostró una pérdida severa de esmalte en las cúspides molares linguales en ratones Claudina-3 KO. El análisis cuantitativo confirmó un volumen de esmalte significativamente menor en los ratones KO Claudina-3 en comparación con los WT (0,022 frente a 0,120 mm3 respectivamente) (n = 8 por grupo). En los ratones WT, la mineralización incisiva se observa D bajo el tercer molar (M3) mientras que en los ratones Claudin-3 KO se detecta bajo el segundo molar (M2). **P < 0,00001 (M1) primer molar. **(D)** El análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM) mostró prismas de esmalte normalmente constituidos en el incisivo Claudina-3 KO en comparación con el WT (n = 3 por grupo). El análisis de microscopía electrónica de transmisión (MET) de los gérmenes dentales WT mostró TJ como membranas de ameloblastos adyacentes que convergían para formar una delgada línea intermedia en el extremo distal de las células. Por el contrario, la estructura de la TJ estaba alterada en los gérmenes dentales Claudina-3 KO, con estructuras más gruesas y empaquetadas (flechas rojas). (am) Ameloblasto. **(E)** Expresión de proteínas de la matriz del esmalte por ameloblastos secretores de ratones Claudina-3 KO (n = 3 por grupo). El análisis por "Western blot" de los extractos proteicos de la parte blanda del incisivo en crecimiento mostró niveles ligeramente superiores de amelogenina (amel). No se observaron diferencias por inmunotinción en cuanto a la expresión de amelogenina en la matriz del esmalte en formación (e) entre los incisivos Claudin-3 KO y WT.

La anulación de dicha función de barrera en los epitelios que interactúan con el medio ambiente se asocia a diversos trastornos gastrointestinales (Barmeyer et al., 2017), renales (Hou, 2014) y cutáneos (Basler y Brandner, 2017). Las TJ se componen de varias proteínas transmembrana y asociadas a membrana, entre ellas las proteínas claudina. Las claudinas forman barreras o poros paracelulares que determinan las propiedades de la TJ. Interactúan entre sí y con otras proteínas de membrana y no de membrana, como las *zonula occludens* intracelulares ZO-1 y ZO-2 y otras proteínas que contienen dominios PDZ. Las claudinas se consideran componentes centrales de los filamentos TJ y determinan la permeabilidad epitelial de moléculas pequeñas y agua (Gunzel y Yu, 2013). Sólo unas pocas claudinas están inequívocamente calificadas como proteínas formadoras de poros, incluyendo la claudina-2, -10b y -15 como poros catiónicos y la claudina-10a y -17 como poros aniónicos. Se ha informado de que otras claudinas solo forman poros cuando interactúan específicamente con otra claudina (Gunzel y Yu, 2013). Tal es el caso de la claudina-16 y la claudina-19, que forman un complejo TJ selectivo de cationes en la rama ascendente gruesa del asa de Henle (Hou et al., 2008).

El transporte de minerales implica la permeabilidad epitelial, que está estrechamente relacionada con el tipo y las propiedades de la TJ. Durante la amelogénesis, las TJ secretoras de los ameloblastos son responsables del acceso paracelular restringido al compartimento del esmalte. La permeabilidad paracelular (estanqueidad) de la capa de ameloblastos depende de la composición de la TJ que depende de las proteínas claudina. Por lo tanto, una combinación de diferentes claudinas puede permitir cierto paso paracelular de iones o restringir este paso (Denker y Sabath, 2011; Bronckers, 2017). Hasta la fecha, se han identificado 11 claudinas en el germen dentario en distintas fases de desarrollo (Ohazama y Sharpe, 2007; Bardet et al., 2016; Yamaguti et al., 2017). Recientemente hemos asociado la abrogación de la función de un poro y un trastorno dental. De hecho, demostramos que las mutaciones de pérdida de función en los genes C*laudina-16 y -19* (*CLDN16 y 19*), identificados inicialmente como causantes de la hipomagnesemia familiar con hipercalciuria y nefrocalcinosis (FHHNC), también daban lugar a la *Amelogénesis Imperfecta* (AI) (Bardet et al., 2016; Yamaguti et al., 2017). En el momento de este descubrimiento, se reconoció que la claudina-16 y -19 se expresaban principalmente en la rama ascendente gruesa del asa de Henle en el riñón, lo que sugería que la IA diagnosticada en pacientes con FHHNC era consecuencia de la homeostasis mineral alterada. No obstante, pudimos demostrar que la claudina-16 y la claudina-19 también se expresaban en la TJ de los ameloblastos, lo que indica que la AI diagnosticada en pacientes con FHHNC era una consecuencia intrínseca de la mutación de la claudina. Además, estudiando ratones *Claudin-16* "KnockOut" (KO), demostramos que la estructura de la TJ de los ameloblastos estaba alterada.

La Claudina-3, que se expresa en epitelios de una amplia variedad de órganos como intestino, riñón, hígado, piel y pulmón, actúa como una proteína TJ formadora de barreras (Milatz et al., 2010; Gunzel y Yu, 2013). Para analizar el papel sustancial de una proteína TJ formadora de barreras en la amelogénesis, exploramos el fenotipo dental de ratones *Claudin-3* KO utilizando los métodos descritos previamente en Bardet et al. (2016) (acuerdo ético D92-049- 01). Primero determinamos que, de forma similar a la claudina-16 y la claudina-19 (Bardet et al., 2016; Yamaguti et al., 2017), la claudina-3 se expresaba en el germen dental y se localizaba en la TJ en el extremo apical de los ameloblastos secretores (**Figuras 1A,B**). El examen dental de los ratones Claudin-3 KO adultos reveló un menor volumen de esmalte en los molares en comparación con los ratones WT y un retraso en la mineralización en el incisivo de crecimiento continuo (**Figura 1C**). A nivel estructural, al examinar el esmalte en formación en la parte intraósea del incisivo, observamos prismas formados normalmente mediante microscopía electrónica de barrido en los ratones Claudin-3 KO (**Figura 1D**). Sin embargo, el análisis por microscopía electrónica de transmisión (MET) de los gérmenes dentales mostró una estructura de TJ alterada en los ameloblastos Claudin-3 KO, que mostraban estructuras más gruesas y empaquetadas en comparación con la delgada línea intermedia observada en los ratones WT (**Figura 1D**). A nivel molecular, la formación de la matriz del esmalte se vio alterada por la deficiencia de claudina-3, manifestada por una acumulación de proteínas del esmalte confirmada además por el análisis "Western blot" de los extractos proteicos de la parte blanda del incisivo en crecimiento (**Figura 1E**). Así pues, la pérdida de función de la proteína

claudina-3 altera la amelogénesis de forma similar a la pérdida de función de claudina-16, en la que la acumulación de proteínas de la matriz del esmalte provocó amelogénesis imperfecta (Bardet et al., 2016).

Durante la amelogénesis, las TJ se componen de proteínas claudina formadoras de poros y de barreras. La deficiencia de ambos tipos de proteínas claudina en modelos murinos, así como en trastornos humanos como el FHHNC, provocó defectos en el esmalte. Hasta la fecha, ninguna enfermedad humana se había asociado a la mutación de *CLDN3*. Curiosamente, la microdeleción génica contigua hemizigótica en 7q11.23 en el síndrome de Williams-Beuren (WBS; OMIM 194050) incluye el gen *CLDN3* (Dutra et al., 2011) y se han descrito varias manifestaciones dentales en pacientes con WBS, incluyendo hipodoncia, forma dental anormal (microdoncia), pero también defectos hipoplásicos del esmalte y mayor susceptibilidad a la caries (Hertzberg et al., 1994; Axelsson et al., 2003).

Nuestras observaciones ponen de relieve la importancia de las proteínas claudinas para la estructura de la TJ. En efecto, las claudinas que forman una barrera o un poro se unen a proteínas adaptadoras como las proteínas ZO y otras proteínas de la familia PDZ de la placa TJ citosólica. Esta interacción permite la unión directa o indirecta a la actina, anclando la TJ dentro del citoesqueleto subyacente. Este andamiaje facilita el ensamblaje de estructuras altamente ordenadas, como los complejos de unión, que regulan la polaridad, la proliferación y la diferenciación de las células epiteliales (Sluysmans et al., 2017). Esto concuerda con nuestros datos que muestran una red de filamentos de actina alterada en el extremo apical de los ameloblastos y un etiquetado de ZO-1 más difuso en ratones *Claudin-16 KO* (Bardet et al., 2016). Las claudinas son necesarias para el proceso de ensamblaje de la TJ y su pérdida afecta a la organización de la TJ en los ameloblastos y, en consecuencia, altera la formación del esmalte.

En general, aunque la TJ asegura microambientes adecuados para la deposición del esmalte y la maduración temprana concomitante determinando la permeabilidad paracelular y la selectividad de solutos, el transporte de iones está estrechamente regulado durante la amelogénesis, implicando propiedades de barrera o canal de una determinada claudina. La alteración de la estructura de la TJ resultante de la pérdida de función de la claudina perturba la formación del esmalte. Por lo tanto, la principal función estructural de las proteínas claudinas parece esencial para la amelogénesis.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

CB y CC redactaron el manuscrito con aportaciones de todos los autores. CB, SR, YW y CC contribuyeron al diseño de los experimentos. experimentos. CB, SR, YW, MD, BS, TB, PH, DM y CC realizaron y analizaron los experimentos. CB y CC supervisaron el proyecto. Todos los autores revisaron y aprobaron la versión final del manuscrito.

FINANCIACIÓN

Este trabajo fue apoyado por becas de la Universidad Paris Descartes, de la Foundation pour la Recherche Médicale para EA2496 y Plateforme d'Imagerie du Vivant Paris Descartes (FRM DGE20111123012). DM recibió una beca CRG del Instituto de Salud de Berlín. YW (puesto posdoctoral) recibió el apoyo de la Fundación Francesa China para la Ciencia y las Aplicaciones (FFSCA), la Académie des Sciences y el China Scholars Council (CSC).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Stephane Le Goff (EA 4462, Universidad Paris Descartes, Francia) su ayuda en la producción de datos SEM, y a Jean-Marc Massé y Alain Schmitt (Instituto Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR8104, Universidad Paris Descartes, Francia) su ayuda en la producción de datos TEM.

REFERENCIAS

Axelsson, S., Bjornland, T., Kjaer, I., Heiberg, A., and Storhaug, K. (2003). Dental characteristics in Williams syndrome: a clinical and radiographic evaluation. *Acta Odontol. Scand.* 61, 129–136. doi: 10.1080/00016350310001451

Bardet, C., Courson, F., Wu, Y., Khaddam, M., Salmon, B., Ribes, S., et al. (2016). Claudin-16 deficiency impairs tight junction function in ameloblasts, leading to abnormal enamel formation. *J. Bone Miner. Res.* 31, 498–513. doi: 10.1002/jbmr.2726

Barmeyer, C., Fromm, M., and Schulzke, J. D. (2017). Active and passive involvement of claudins in the pathophysiology of intestinal inflammatory diseases. *Pflugers Arch.* 469, 15–26. doi: 10.1007/s00424-016-1914-6

Basler, K., and Brandner, J. M. (2017). Tight junctions in skin inflammation. *Pflugers Arch.* 469, 3–14. doi: 10.1007/s00424-016-1903-9

Bronckers, A. L. (2017). Ion transport by Ameloblasts during Amelogenesis. *J. Dent. Res.* 96, 243–253. doi: 10.1177/0022034516681768

Denker, B. M., and Sabath, E. (2011). The biology of epithelial cell tight junctions in the kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 22, 622–625. doi: 10.1681/ASN.2010090922

Dutra, R. L., Pieri Pde, C., Teixeira, A. C., Honjo, R. S., Bertola, D. R., and Kim, C. A. (2011). Detection of deletions at 7q11.23 in Williams-Beuren syndrome by polymorphic markers. *Clinics* 66, 959–964. doi: 10.1590/S1807-59322011000600007

Farquhar, M. G., and Palade, G. E. (1963). Junctional complexes in various epithelia. *J. Cell Biol.* 17, 375–412. doi: 10.1083/jcb.17.2.375

Gunzel, D., and Yu, A. S. (2013). Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol. Rev.* 93, 525–569. doi: 10.1152/physrev.00019.2012

Hertzberg, J., Nakisbendi, L., Needleman, H. L., and Pober, B. (1994). Williams syndrome–oral presentation of 45 cases. *Pediatr. Dent.* 16, 262–267.

Hou, J. (2014). The kidney tight junction (Review). *Int. J. Mol. Med.* 34, 1451–1457. doi: 10.3892/ijmm.2014.1955

Hou, J., Renigunta, A., Konrad, M., Gomes, A. S., Schneeberger, E. E., Paul, D. L., et al. (2008). Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *J. Clin. Invest.* 118, 619–628. doi: 10.1172/jci33970

Milatz, S., Krug, S. M., Rosenthal, R., Gunzel, D., Muller, D., Schulzke, J. D., et al. (2010). Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. *Biochim. Biophys. Acta* 1798, 2048–2057. doi: 10.1016/j.bbamem.2010. 07.014

Ohazama, A., and Sharpe, P. T. (2007). Expression of claudins in murine tooth development. *Dev. Dyn.* 236, 290–294. doi: 10.1002/dvdy. 21001

Sluysmans, S., Vasileva, E., Spadaro, D., Shah, J., Rouaud, F., and Citi, S. (2017). The role of apical cell-cell junctions and associated cytoskeleton in mechanotransduction. *Biol. Cell.* 109, 139–161. doi: 10.1111/boc.201600075

Yamaguti, P. M., Neves, F. A., Hotton, D., Bardet, C., De La Dure-Molla, M., Castro, L. C., et al. (2017). Amelogenesis imperfecta in familial hypomagnesaemia and hypercalciuria with nephrocalcinosis caused by CLDN19 gene mutations. *J. Med. Genet.* 54, 26–37. doi: 10.1136/jmedgenet-2016-103956

Declaración de conflicto de intereses: Los autores declaran que la investigación se llevó a cabo en ausencia de relaciones comerciales o financieras que pudieran interpretarse como un posible conflicto de intereses.

El revisor YZ y el editor encargado declararon compartir afiliación, y el editor encargado afirma que, a pesar de todo, el proceso cumplió las normas de una revisión justa y objetiva.

Copyright © 2017 Bardet, Ribes, Wu, Diallo, Salmon, Breiderhoff, Houillier, Müller and Chaussain. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.