



**TESIS
DOCTORAL**

**NUEVOS MECANISMOS MOLECULARES ASOCIADOS A LA DIFERENCIACIÓN
DEL EPITELIO RESPIRATORIO**

CLARA MARÍA MATEOS QUIRÓS

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR,
BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA**

CONFORMIDAD DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL

José María Carvajal González

Esta tesis cuenta con la autorización del director de la misma y de la Comisión Académica del programa. Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Extremadura.

2024

FINANCIACIÓN

Tanto la realización del presente trabajo de Tesis Doctoral como la incorporación al grupo de Investigación “Configuración de Sistemas Moleculares y Celulares (COSMYC)” ha sido posible gracias a la ayuda para la financiación de contratos predoctorales para la formación de doctores en los centros públicos de I+D pertenecientes al Sistema Extremeño de Ciencia, Tecnología e Innovación en el ejercicio 2018, cofinanciada por la Consejería de Economía e Infraestructuras de la Junta de Extremadura y el Fondo Social Europeo (FSE). Decreto 116/2018, de 12 de abril. DOE 147 de 30 de julio de 2018. **PD18002**

La realización del presente trabajo de Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la financiación procedente de:

Proyecto de Investigación **BFU2014-54699-P**, obtenido en la convocatoria de 2014 dentro del plan de ayudas a proyectos de I+D, correspondiente al Programa Estatal de Fomento de la Investigación Científica y Técnica de Excelencia, Subprograma Estatal de Generación de Conocimiento, en el marco del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016. 8 de agosto de 2014 (BOE num.192). Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. Gobierno de España.

Proyecto de Investigación **BFU2017-85547-P** obtenido en la convocatoria de 2017 dentro del plan de ayudas a proyectos de I+D correspondientes al Programa Estatal de Fomento de la Investigación Científica y Técnica de Excelencia, Subprograma Estatal de Generación de Conocimiento, en el marco del Plan Estatal de I+D+I 2013-2016. 13 de junio de 2017 (BOE núm.140). Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. Gobierno de España.

Proyecto de Investigación **TED2021-130560B-I00** obtenido en la convocatoria de 2021 de proyectos Estratégicos orientados a la Transición Ecológica y a la Transición Digital, dentro del Plan Estatal de Investigación Científica, Técnica y de Innovación 2021-2023, en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia. 6 de diciembre de 2021 (BOE núm.291). Ministerio de Ciencia e Innovación. Gobierno de España.

Proyecto de Investigación **PID2021-126905NB-I00** obtenido en la convocatoria de 2021 de Proyectos de Generación de Conocimiento en el marco del Programa Estatal de Generación de Conocimiento y Fortalecimiento Científico y Tecnológico del sistema de I+D+i del Plan Estatal de Investigación Científico, Técnica y de Innovación 2017-2020. 21 de marzo de 2019 (BOE núm.69). Ministerio de Ciencia e Innovación.

Proyecto de Investigación **COV20_00429** obtenido en la convocatoria de 2020 del Instituto de Salud Carlos III, enmarcada dentro de Fondos COVID19 del Real

Decreto-Ley 8/2020, de 17 de marzo, de medidas urgentes extraordinarias para hacer frente al impacto económico y social del COVID-19. 18 de marzo de 2020 (BOE núm.73). Ministerio de Ciencia e Innovación. Gobierno de España.

Toda la financiación española está copatrocinada por el programa FEDER de la Unión Europea.

Proyecto de Investigación **IB18014** obtenido en la convocatoria de 2018 dentro del plan de ayudas destinadas a la realización de proyectos de investigación en los Centros Públicos de I+D+i de la Comunidad Autónoma de Extremadura. Cofinanciada por la Consejería de Economía, Competitividad e Innovación de la Junta de Extremadura y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Decreto de 20 de marzo de 2018 (DOE núm.86, de 4 de mayo de 2018).

Proyecto de Investigación **GR21140** obtenido en la convocatoria de 2021 dentro del plan de ayudas para la realización de actividades de investigación y desarrollo tecnológico, de divulgación y de transferencia del conocimiento por los Grupos de Investigación de Extremadura. Cofinanciada por la Consejería de Economía, Competitividad e Innovación de la Junta de Extremadura y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Decreto de 4 de junio de 2021 (DOE núm. 131, 9 de julio de 2021).

Conceder, además, una mención especial a los pacientes y al Biobanco del Área de Salud de Badajoz por su colaboración.



ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS	11
RESUMEN	13
INTRODUCCIÓN	17
1. Epitelio respiratorio	17
1.1. Biología del epitelio respiratorio.	17
1.2. Tipos celulares	17
2. Nuevos mecanismos moleculares implicados en la diferenciación del epitelio respiratorio.	20
2.1. Estudio de genes específicos implicados en la diferenciación del epitelio respiratorio.	20
2.1.1. Uniones estrechas	21
2.1.2. Moléculas de adhesión de la unión (JAM)	22
2.2. Modelos experimentales para el estudio del epitelio respiratorio.	25
2.2.1. Modelos In Vitro	25
Cultivo de células primarias.	26
Cultivo Interfaz Aire-Líquido (ALI)	26
Modelos 3D	27
Co-cultivo celular	28
Células madre pluripotentes inducidas (iPSCs)	28
2.2.2. Modelos de tejido pulmonar ex vivo.	29
2.2.3. Modelos animales	29
Modelos de animales pequeños	30
Modelos de animales grandes.	30
OBJETIVOS	33
OBJETIVOS	35
MATERIALES Y MÉTODOS	37
1. Modelo murino	39
1.1. Obtención de células madre de tráquea de ratón.	39
1.2. Cultivo primario de células de tráquea de ratón, crecimiento y diferenciación.	40
1.3. Cultivo de organoides 3D de tráquea de ratón	41
2. Modelo humano	42
2.1. Obtención de células madre de bronquio humano	42
2.2. Cultivo primario de células de bronquio humano, crecimiento y diferenciación.	43
3. Tratamientos en cultivos celulares	44
4. Silenciamiento de proteínas en células de cultivos primarios	45

4.1.	Clonación en vector lentiviral.	46
4.2.	Producción de lentivirus	49
4.3.	Transducción con lentivirus y selección de los cultivos de células.	50
5.	Sobreexpresión de proteínas en cultivos celulares	50
6.	Análisis de los niveles de expresión génica mediante PCR cuantitativa (qPCR)	51
6.1.	Extracción de ARN	52
6.2.	Retrotranscripción	52
6.3.	PCR cuantitativa	52
7.	Análisis de proteínas mediante Western Blot	54
7.1.	Preparación de los extractos proteicos a partir de lisados celulares	54
7.2.	Cuantificación de la concentración de proteínas por el método Bradford.	55
7.3.	Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	55
7.4.	Electrotransferencia en húmedo	56
7.5.	Marcaje de membranas con anticuerpos	56
7.6.	Revelado de membranas	57
8.	Inmunofluorescencia en células del epitelio respiratorio	57
9.	Adquisición y análisis de imágenes de microscopia confocal	58
10.	Microscopia electrónica de barrido (SEM)	59
11.	Ensayo de la integridad de la monocapa celular	59
12.	Resistencia eléctrica transepitelial (TEER)	60
13.	Medida de la batida de los cilios	60
14.	Inmunohistoquímica	61
15.	Análisis de distribución de los cuerpos basales.	61
16.	Análisis de datos de una única célula	62
17.	Análisis de las categorías de las células multiciliadas durante la diferenciación.	62
18.	Análisis estadístico	62
	CAPITULO I	65
	RESULTADOS CAPÍTULO I	67
1.1.	La expresión <i>in vivo</i> de Jam3 se restringe a células multiciliadas en el epitelio de las vías respiratorias del ratón.	67
1.2.	La expresión <i>in vitro</i> de Jam3 está limitada a células multiciliadas en el epitelio respiratorio del ratón.	69
1.3.	La localización subcelular de Jam3 se encuentra en los endosomas apicales de las células multiciliadas.	73
1.4.	La disminución de la expresión de Jam3 no alteró la morfología y función de los cilios.	76
1.5.	La disminución de la expresión de Jam3 en el epitelio de las vías respiratorias no afecta a la integridad del epitelio	81
1.6.	La expresión de Jam3 disminuye a lo largo de la diferenciación de las	

células epiteliales de las vías respiratorias.	84
1.7. El tratamiento con IL6 en MTECs aumenta la expresión de Jam3, pero no cambia su localización subcelular.	87
DISCUSION CAPITULO I	91
DISCUSIÓN CAPÍTULO I	93
CONCLUSIONES CAPITULO I	95
CONCLUSIONES CAPÍTULO I	97
CAPITULO II	99
RESULTADOS CAPITULO II	101
RESULTADOS CAPÍTULO II	103
2.1. Cambios en la morfología del epitelio de las vías respiratorias producidos por los fármacos relacionados con la biología de las células madre.	103
2.2. El fármaco I-BET 151 es capaz de revertir los fenotipos producidos por AM580, sobrecrecimientos celulares, y Chromans1, cistos.	108
2.3. Cambios en la morfología del epitelio de las vías respiratorias producidos por los fármacos de la librería epigenética.	110
2.4. Las proteínas con bromodominios regulan el proceso de diferenciación del epitelio de las vías respiratorias.	113
2.5. Las proteínas con bromodominios actúan en los primeros días del inicio del proceso de diferenciación.	116
2.6. BRD3 y BRD4 son las proteínas con bromodominios relevantes en el proceso de diferenciación del epitelio de las vías respiratorias.	117
DISCUSIÓN CAPITULO II	123
DISCUSIÓN CAPÍTULO II	125
CONCLUSIONES CAPITULO II	129
CONCLUSIONES CAPÍTULO II	131
BIBLIOGRAFÍA	133
BIBLIOGRAFÍA	135

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ALI	Interfaz Aire-Líquido
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BET	Bromodominio y dominio extraterminal
BSA	Albúmina de suero bobino
CFTR	Regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística
CLDN	Claudina
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNAsa	Desoxirribonucleasa
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EEA1	Antígeno 1 temprano del endosoma
EGTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
FBS	Suero fetal bobino
FOXJ1	Forkhead box J1
FQ	Fibrosis quística
HRP	Peroxidasa de rábano
hTERT	Telomerasa transcriptasa inversa humana
IFT81	Proteína de transporte Intraflagelar 81
IL	Interleuquina
INFγ	Interferón gamma
iPSC	Célula madre pluripotente inducida
JAM	Molécula de adhesión de la unión
KRT5	Queratina 5
LUSC	Carcinoma de células escamosas de pulmón
MOI	Multiplicidad de infección
MTECS	Células epiteliales de tráqueas de ratón
NSCLC	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
P/S	Penicilina/Estreptomicina
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida

PBS Tampón salino de fosfato
PBS-G-T PBS- gelatina-tritón
PBS-G-T-L PBS-gelatina-tritón-lisina
PBS-T PBS-tritón
PCP Polaridad celular planar
PCR Reacción en cadena de la polimerasa
PEI Polietilenimina
qPCR PCR cuantitativa
SCGB1A1 Secretoglobina 1A miembro 1
SCGB3A2 Secretoglobina 3a miembro 2
SCLC Cáncer de pulmón de células pequeñas
SDS Dodecil Sulfato Sódico
SEM Scanning Electron Microscopy
shRNA ARN de horquilla pequeña
TBS-T Tampón salino de Tris con Tween
TEER Resistencia Eléctrica Transepitelial
TEMED Tetrametiletilendiamina
TG Tampón Tris-Glicina
TGS Tampón Tris-Glicina-SDS
TJ Uniones estrechas
TNF α Factor de necrosis tumoral alfa
VEGF Factor de crecimiento endotelial vascular
WB Western-Blot
ZO-1 Zónula ocludens 1

RESUMEN

El epitelio de las vías respiratorias está en la primera línea entre el medio ambiente y nuestro cuerpo interno actuando como barrera. Entender esta función epitelial es fundamental para prevenir y combatir estados patológicos, incluyendo infecciones, reacciones alérgicas o desarrollo de cáncer. El epitelio tiene la capacidad de regenerar y reparar las células después de una enfermedad, pero las vías implicadas en este proceso no se conocen bien, siendo el objetivo de esta tesis estudiar las rutas que intervienen en la diferenciación mediante el uso de genes candidatos y de una línea celular inmortalizada como modelo experimental.

El estudio de genes candidatos se muestra como una buena opción para descubrir el papel de un gen en concreto relacionado con un determinado fenotipo en el que el epitelio respiratorio se encuentra alterado, como son los ocasionados por procesos patológicos. En esta tesis descubrimos que la molécula de adhesión de unión Jam3, dentro del epitelio respiratorio, se expresaba únicamente en los endosomas apicales de las células multiciliadas. Con estos resultados, quisimos caracterizar la función celular y molecular de Jam3 en el epitelio de las vías respiratorias.

Por otro lado, la utilización de modelos experimentales del epitelio respiratorio es esencial para conocer las rutas moleculares implicadas en la regeneración y reparación del epitelio después una enfermedad respiratoria. En esta tesis, utilizando un modelo de estudio basado en una línea celular inmortalizada BROCC2 que ha perdido la capacidad de diferenciación, mediante el uso de cribados farmacológicos intentamos promover la diferenciación del epitelio de esta línea, para conseguir desarrollar un modelo experimental útil para ampliar el conocimiento de la biología del epitelio de las vías respiratorias.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Epitelio respiratorio

1.1. Biología del epitelio respiratorio.

En el sistema respiratorio de vertebrados, el epitelio que tapiza las vías respiratorias superiores humanas es una barrera pseudoestratificada que protege los pulmones frente a patógenos como microorganismos y bacterias, así como de partículas inhaladas mediante la función mucociliar. En términos generales, esta función está respaldada por tres tipos de células principales: células secretoras, células multiciliadas y células basales que funcionan para regenerar las poblaciones celulares diferenciadas (Hogan et al., 2014). Para el mantenimiento de la homeostasis en las vías respiratorias es indispensable que el proceso de autorrenovación y diferenciación de células basales a células secretoras o multiciliadas ocurra de forma correcta, estableciéndose un balance entre los distintos tipos celulares del epitelio. La desregulación en la abundancia de algunos de estos tipos celulares provoca la aparición de numerosas enfermedades de las vías respiratorias como la fibrosis quística, el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y el cáncer de pulmón (Leeman et al., 2014). Sin embargo, a pesar de este papel esencial, aún son muchos los interrogantes acerca de las rutas moleculares que controlan la proliferación y diferenciación de estas células basales durante el desarrollo y regeneración de las vías respiratorias, sumado a la falta de modelos experimentales que estudien estos eventos celulares subyacen a la regeneración pulmonar y procesos patológicos asociados al epitelio respiratorio (Spella et al., 2017). En esta tesis, estudiaremos nuevos mecanismos moleculares para el estudio de la diferenciación del epitelio de las vías respiratorias, ya que un mayor conocimiento permitiría prevenir y combatir enfermedades pulmonares.

1.2. Tipos celulares

El epitelio que tapiza las vías respiratorias es una capa multicelular constituida por al menos 11 tipos celulares diferentes entre los que destacan las células basales, las células secretoras y las células multiciliadas.

Células basales. Estas células constituyen alrededor del 30% de la población celular del epitelio respiratorio, encontrándose en la proximidad de la lámina basal (Rock et al., 2010). Las células basales son la clave de la homeostasis respiratoria y de la regeneración epitelial después de una lesión, teniendo la capacidad de autorrenovarse después de la lesión y diferenciarse en la mayoría de los distintos tipos celulares de la tráquea. Tanto en el ratón como en el ser humano estas células están en contacto con la lámina basal del tejido conectivo circundante (Nakajima et al., 1998).

Basándonos en estudios inmunohistoquímicos y transcripcionales, las células

basales muestran altos niveles de expresión de la proteína p63 (codificada por el gen *Trp63* en ratón, *TP63* en humanos). La literatura demuestra que p63 es necesario para el desarrollo de las células basales y que ratones mutantes para esta proteína carecen de células basales en el epitelio pseudoestratificado de la tráquea (Danielly et al., 2004). Otra característica de estas células es la expresión de la proteína citoesquelética queratina 5 (KRT5) en las vías respiratorias (Hong et al., 2004).

Los mecanismos moleculares que regulan la diferenciación y regeneración del epitelio de las vías respiratorias no se conocen en gran detalle, pero múltiples estudios señalan que la ruta de Notch juega un papel importante en el equilibrio entre la población de células ciliadas y secretoras generadas a partir de la población de células progenitoras que expresan p63 y KRT5, promoviendo el destino secretor e inhibiendo la diferenciación de células ciliadas (Rock *et al.* 2009; Tsao et al., 2009).

Células secretoras. Estas células son las encargadas de secretar moco, compuesto fundamentalmente por glicoproteínas, lípidos, iones, glicosaminoglicanos y agua, actuando de barrera frente a patógenos, partículas en suspensión y sustancias contaminantes (Basbaum & Finkbeiner, 1988). Las células secretoras, además, poseen una alta plasticidad dando lugar a distintos tipos celulares una vez diferenciadas (Basbaum & Finkbeiner, 1988).

Basándonos en características morfológicas y la abundancia de las vesículas de secreción, las células secretoras se clasifican en tres grandes poblaciones. Las células club (también llamadas células Clara), que son células serosas localizadas en las glándulas de las vías respiratorias más proximales y células goblet o caliciformes (Basbaum & Finkbeiner, 1988).

El marcador más característico de estas células club es la proteína SGCB1A1 (Secretoglobina 1A miembro 1), que es una secretoglobina con funciones antiinflamatorias (Xu et al., 2020), junto la proteína SCGB3A2 (Secretoglobina 3A miembro 2). Se ha evidenciado que ambas proteínas están relacionadas con la ruta de Notch y que individuos defectivos para los ligandos de la ruta Jag1 y Jag2 muestran una reducción de más del 80% de la expresión de ambas proteínas (Stupnikov et al., 2019). Además de todo esto, diversos estudios demuestran que, a través de la ruta de Notch (Van Es et al., 2005), las células club presentan capacidad de auto-regeneración y pueden revertir su diferenciación hacia la producción tanto de células goblet como multiciliadas en un proceso denominado transdiferenciación en respuesta a un estrés agudo (Pinkerton et al., 1933; Tsao et al., 2009; Davis & Wypych., 2021).

Por otro lado, las células goblet o caliciformes presentan un alto nivel de polarización apical-basolateral, con el núcleo y los orgánulos situados en la zona basal mientras que las vesículas secretoras cargadas de mucinas, que son glicoproteínas de alto peso

molecular, se encuentran en la región apical (Sleigh et al., 1988). Las células caliciformes están enriquecidas en la mucina MUC5AC, empleado como marcador característico de este tipo celular utilizado en múltiples estudios (Hovenberg et al., 1996). Otro marcador utilizado también para las células goblet es la proteína SPDEF, un factor de transcripción que regula el programa de diferenciación de estas células, implicado en el proceso de transdiferenciación desde células club a células caliciformes (Chen et al., 2009).

Células multiciliadas. Estas células están formadas por centenares de cilios que baten de forma coordinada para desplazar partículas, patógenos y fluidos no deseados fuera del organismo. En las vías respiratorias, las células multiciliadas están implicadas en el movimiento del moco que recubre el epitelio, atrapando partículas y patógenos inhalados, por lo que la aparición de alteraciones en las células multiciliadas pueden dar lugar a infecciones respiratorias recurrentes (Wallmeier et al., 2014). Las células ciliadas también poseen una gran cantidad de mitocondrias, que se encuentran debajo de la superficie apical, encargadas de suministrar energía a los cilios para la eliminación del moco (Tan *et al.*, 2011).

Los marcadores específicos para las células multiciliadas son FOXJ1 (*Forkhead box J1*), un factor de transcripción perteneciente a la familia de FOX esencial en la extensión del axonema, la generación del movimiento del cilio y el anclaje de los cuerpos basales (Gomperts et al., 2004; Staubert et al., 2017) y IFT81, que junto con IFT74 forma un módulo de unión a tubulina del complejo de transporte intraflagelar B, encargado del transporte de tubulina dentro del cilio necesaria para la ciliogénesis (Bhogaraju et al., 2013).

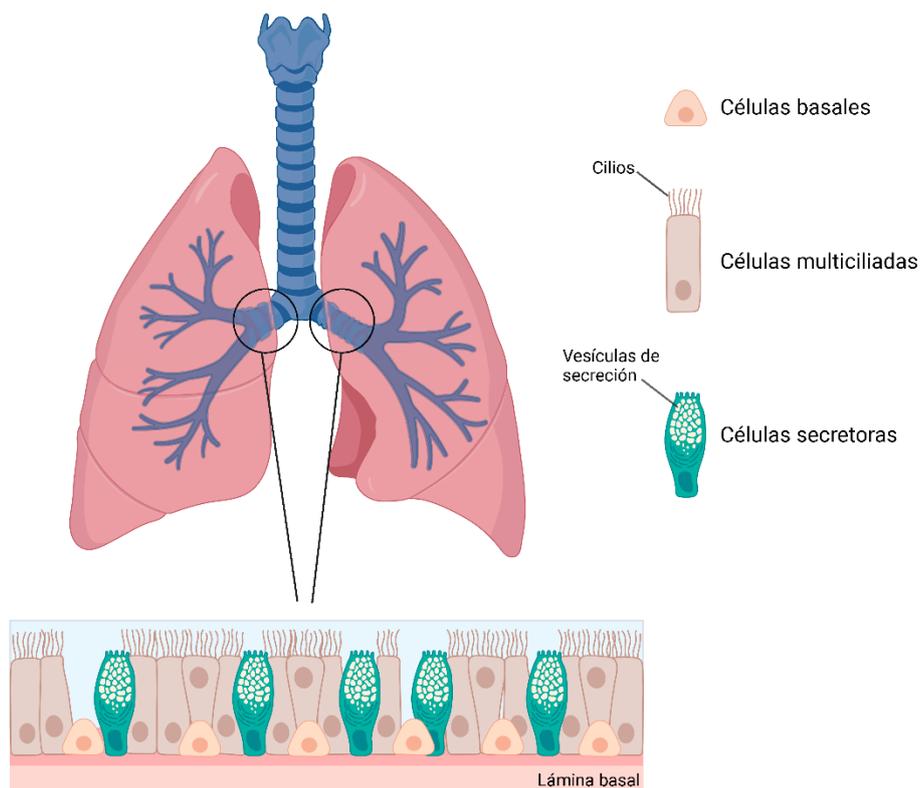


Figura I1: Esquema de las células que componen el epitelio de las vías respiratorias. El epitelio pseudoestratificado que recubre las vías respiratorias superiores humanas, con células basales, multiciliadas y secretoras principalmente. Imagen creada con BioRender.com.

2. Nuevos mecanismos moleculares implicados en la diferenciación del epitelio respiratorio.

Como hemos mencionado anteriormente, en esta tesis nos hemos propuesto estudiar el proceso de diferenciación del epitelio respiratorio de dos formas, bien mediante el uso de genes específicos implicados en ese proceso y mediante el desarrollo de cribados farmacológicos en modelos experimentales de este epitelio.

2.1. Estudio de genes específicos implicados en la diferenciación del epitelio respiratorio.

Los estudios de genes candidatos del epitelio respiratorio se centran en la elección de genes de una ruta molecular relacionado con un fenotipo en el que el epitelio de encuentra alterado (Alghamdi & Padmanabhan, 2014). En la tesis hemos utilizado estos estudios para un gen en específico que es Jam3, ya que diversos estudios demuestran que el 40% de los ratones *knockout* para Jam3 mueren debido a una disfunción pulmonar (Cunningham et al., 2000), y los ratones macho restantes eran infértiles debido a un defecto en el montaje del complejo de polaridad durante la diferenciación de espermátidas (Gliki et al., 2004). Nuestro objetivo era conocer cómo este fenotipo se relaciona con la localización celular y subcelular de Jam3 en las células epiteliales de

las vías respiratorias, ya que hasta ahora no hay nada descrito.

2.1.1. Uniones estrechas

Las células basales del epitelio de las vías respiratorias están unidas entre ellas y con la lámina basal mediante moléculas de adhesión entre las que se incluyen las uniones estrechas (Nakajima **et al.**, 1998). Las uniones estrechas (TJ) son uniones intercelulares fundamentales para construir la barrera epitelial y mantener la polaridad epitelial (Otani & Furuse, 2020 y están formadas por distintos miembros, entre las que destacan las claudinas, ocludinas y Jam (moléculas de adhesión de la unión). Las claudinas forman cadenas de uniones estrechas y desempeñan funciones fundamentales en la regulación de la permeabilidad paracelular (Zihni *et al.*, 2016) (Anderson & Van Itallie, 2009) (Shen *et al.*, 2011; Furuse *et al.*, 1998), además interactúan con la familia de proteínas de andamiaje zonula ocludens (ZO) a través de su región citoplasmática (Itoh *et al.*, 1999), esenciales para el ensamblaje de las uniones estrechas (Umeda *et al.*, 2006; Otani *et al.*, 2019). (Figura 1C) (Furuse *et al.*, 1993; Martín-Padura *et al.*, 1998; Steed *et al.*, 2009). Hallazgos recientes han sugerido que, además de las claudinas, las JAM también desempeñan funciones importantes en la estructura y función de las TJ (Otani *et al.*, 2019; Shigetomi *et al.*, 2018).

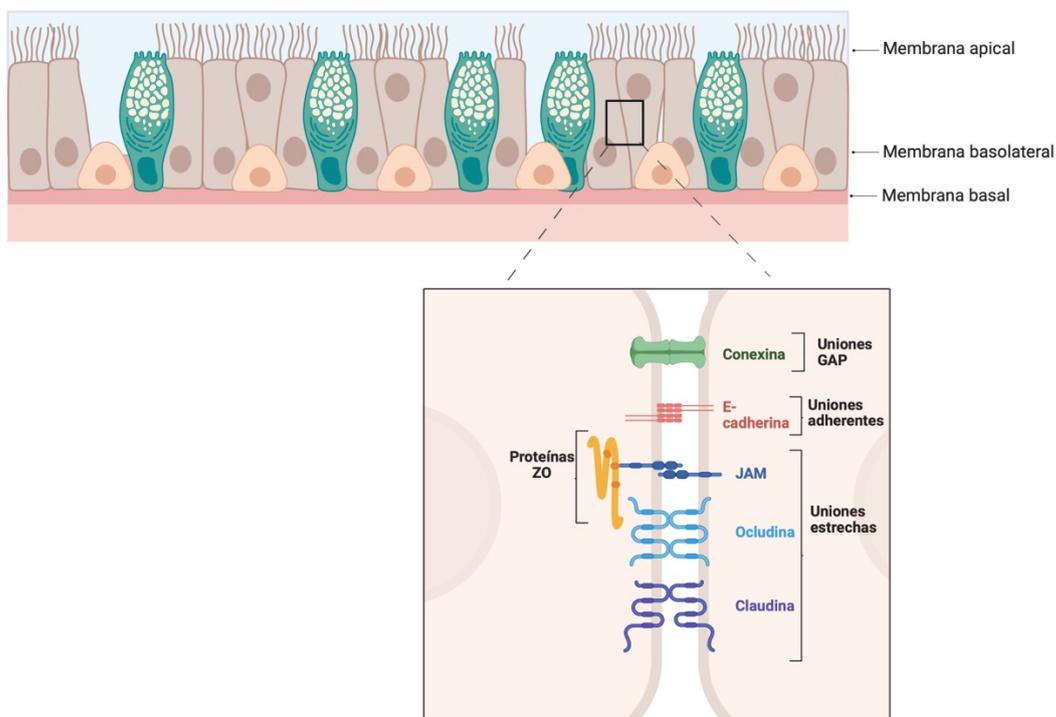


Figura I2: Organización molecular de las uniones estrechas. Las claudinas, ocludinas y JAM son las principales proteínas integrales de membrana de las uniones. Las proteínas de membrana asociadas a las uniones estrechas se localizan en las uniones apicales entre células al interactuar con la familia de proteínas de andamiaje ZO, que sirven como vínculos entre las uniones estrechas y el citoesqueleto de actina. (Abreviaturas: JAM, molécula de adhesión de unión; ZO, zonula ocludens). Imagen creada con

2.1.2. Moléculas de adhesión de la unión (JAM)

Las moléculas de adhesión de la unión (JAM) son miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF), una gran familia de proteínas solubles y de superficie celular que participan en el reconocimiento, unión o adhesión celular, funciones clave para el mantenimiento de la homeostasis en vertebrados (Greene et al., 2019; Ebnet et al., 2004), La familia de proteínas JAM comparten características estructurales comunes que son un solo dominio extracelular con un péptido señal en el extremo N-terminal, una región transmembrana y una cola citoplasmática que varía en longitud entre diferentes isoformas (Mandell y Parkos, 2005) con sitios de fosforilación consensuados y un motivo de unión al dominio PDZ en el extremo C-terminal (Wang & Cheng, 2022).

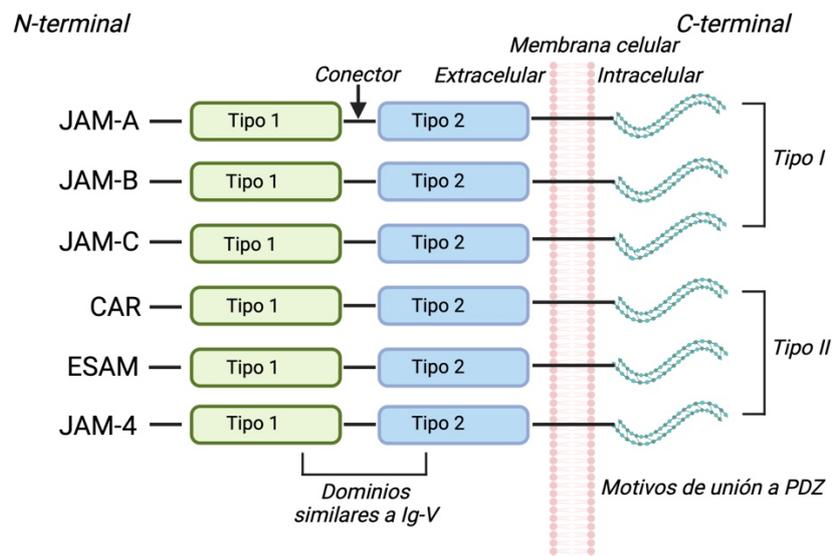


Figura I3: La estructura básica de JAM. Las proteínas de la familia JAM comparten características estructurales comunes: un péptido señal N-terminal corto, dos dominios extracelulares similares a Ig, un segmento transmembrana y una cola citoplasmática corta con sitios de fosforilación de consenso y un motivo de unión a PDZ C-terminal. Imagen creada con BioRender.com.

Las JAM ubicadas de la membrana se expresan en diversos tipos celulares como leucocitos, plaquetas, células epiteliales y endoteliales, que se localizan en los contactos entre células y se enriquecen específicamente en las uniones estrechas (Ebnet et al., 2004; Wang & Chen, 2022), dónde interactúan con proteínas de andamiaje que contienen dominios PDZ (Hartmann et al., 2020), asociándose con ZO-1, claudinas (Bazzoni et al., 2000) y afadina-6 (Bazzoni et al., 2000), jugando un papel importante en las primeras fases del contacto célula-célula y en la formación de uniones estrechas. Estas proteínas también co-localizan con E-cadherina de forma puntual que son indicativas de una etapa temprana de adhesión celular, cuando la ocludina y las

claudinas aún están ausentes (Keiper et al., 2005a; Hartmann et al., 2020).

La familia Jam se compone de dos subfamilias, una de ellas comprende tres miembros estrechamente relacionados como son JAM-A (JAM-1), JAM-B (JAM-2) y JAM-C (JAM-3), mientras que los miembros de la segunda subfamilia tienen una menor similitud de secuencia polipeptídica y contienen en su secuencia a CAR (receptor de coxsackie y adenovirus), y son JAM-D (JAM-4) y JAM-like (JAM-L). Las moléculas de adhesión de la unión, con un peso molecular de 40KDa, se identificaron por primera vez mediante el uso de anticuerpos monoclonales generados contra los antígenos del endotelio (Martin-Padura et al., 1998), aunque JAM también están ampliamente distribuidas en las células epiteliales. Martín-Padura et al. informaron por primera vez sobre JAM como un nuevo miembro de la familia de inmunoglobulinas que concentra uniones endoteliales y epiteliales e identificaron JAM1 (12). Posteriores estudios adicionales clonaron JAM2 y JAM3 y los identificaron como contrarreceptores (Arrate et al., 2001; Aurrand-Lions., 2000; Wang & Chen, 2022).

La participación de JAM en las uniones estrechas respalda una variedad de procesos biológicos durante el desarrollo y en el organismo adulto, incluidos procesos fisiológicos y de desarrollo como la diferenciación de células epiteliales, la hematopoyesis, el desarrollo de células germinales y el desarrollo del sistema nervioso, la formación de barreras epiteliales, la inflamación, angiogénesis y homeostasis (Kubber & Ebnet., 2018; Ebnet., 2017, Díaz-Coránguez et al., 2019; Wang & Cheng, 2022). Aún no se ha determinado el papel exacto de JAM, pero parece que están involucrados tanto en la generación de polaridad celular y en la regulación del sistema transendotelial (Mok et al., 2013).

Tradicionalmente, Jam3, en cultivos de células de vertebrados, ha estado involucrado en la función de barrera epitelial; sin embargo, varios estudios han señalado que ratones *knockout* para Jam3 muestran fenotipos adicionales relacionados con la migración celular del sistema inmunitario, ciliogénesis y/o polaridad en espermatidas, epitelio de las vías respiratorias y ventrículos cerebrales (Kummer y Ebnet, 2018; Hartmann et al., 2020). Estos estudios demuestran que el 40% de la letalidad observada en ratones Jam3-KO se debe a una disfunción pulmonar, pero cómo este fenotipo se relaciona con la localización celular y subcelular de Jam3 es completamente desconocida. Desde su descubrimiento en 2004 (Cunningham et al., 2000), varios estudios *in vitro* han sugerido que Jam3 tiene funciones importantes en el ensamblaje de uniones estrechas de células endoteliales y epiteliales, pero también en la migración transendotelial y transepitelial de células inmunitarias (Bazzoni, 2003; Ebnet, 2017; Hartmann et al., 2020). De hecho, se ha propuesto que Jam3 puede promover la migración del neutrófilo *in vivo* e *in vitro* en células endoteliales (Chavakis et al., 2004;

Woodfin et al., 2011). Este fenotipo de migración dependiente de Jam3 también se describió *in vitro* con células epiteliales, donde Jam3 es un componente de los desmosomas (Zen et al., 2004). Un estudio posterior en ratones Jam3-KO informó de una disfunción pulmonar donde el análisis histológico reveló grandes infiltrados de neutrófilos en los pulmones en todos los ratones Jam3-KO (Imhof et al., 2007). Además, el bloqueo de Jam3 mejoró la histología pulmonar y redujo los neutrófilos contenidos en pulmones de ratones sépticos (Hirano et al., 2018). Todo este trabajo apoya una función de Jam3 en los pulmones relacionados a la respuesta inflamatoria. Por otro lado, bajo ciertas condiciones patológicas como fibrosis quística (FQ) o infección, las uniones estrechas pueden alterarse debido a la respuesta inflamatoria (Coyne et al., 2002). El aumento de la secreción de factores proinflamatorios como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interferón gamma (IFN- γ) afecta a la estructura de las uniones estrechas y la expresión de proteínas (Coyne et al., 2002).

Como se ha mencionado anteriormente, en los estudios iniciales *in vivo* usando Jam3-KO los ratones mostraron que la eliminación de Jam3 es en gran medida letal, pero los ratones macho restantes eran ratones infértiles (Gliki et al., 2004). Un examen más detallado del fenotipo reveló que los ratones *knockout* para Jam3 tenían deficiencias en la diferenciación de espermátidas, cuando pasan de espermátidas redondas a espermatozoides, por defecto en el montaje del complejo de polaridad (Gliki et al., 2004). Esto podría considerarse como la primera conexión entre Jam3 y el cilio, teniendo en cuenta que frecuentemente mutaciones que generan defectos en los cilios móviles, como los que se encuentran en discinesia ciliar primaria (PCD), también tienen un efecto sobre la formación de la cola de los espermatozoides. Tanto la cola del espermatozoide como la estructura básica del cilio móvil de los espermatozoides comparten la misma disposición ultraestructural microtubular 9C+2 (Sironen et al., 2020). Más recientemente, Wyss et al. (2012) informó que los ratones Jam3 KO desarrollaron hidrocefalia, un fenotipo que también podría estar relacionado con el mal funcionamiento de los cilios. En el cerebro, el revestimiento de células endoteliales de los ventrículos cerebrales cubre su superficie apical por cilios que batían de manera coordinada para facilitar la circulación del líquido cefalorraquídeo (LCR). (Tissir et al., 2010; Boutin et al., 2014; Carvajal-González et al., 2016a). En la vía aérea pero también en otros tejidos, la señalización de polaridad celular planar dentro de las uniones célula-célula orientan correctamente los cilios en las células multiciliadas a lo largo del tejido (Carvajal-González et al., 2016a). Esta conexión entre el posicionamiento centríolo y la polaridad celular planar es una función conservada de moscas a humanos (Vladar et al., 2012, 2016; Carvajal-González et al., 2016a,b; Garrido-Jiménez et al., 2019).

En la literatura, hasta el momento no se ha descrito ninguna conexión entre Jam3

y PCP, por lo que en la presente tesis decidimos caracterizar la función molecular y celular de Jam3 en el epitelio de las vías respiratorias.

2.2. Modelos experimentales para el estudio del epitelio respiratorio.

Las enfermedades respiratorias crónicas de las vías respiratorias son enfermedades complejas que involucran múltiples influencias genéticas y ambientales cuyas interacciones multifactoriales pueden resultar en una variedad de fenotipos celulares, produciendo cambios estructurales en la monocapa del epitelio respiratorio. Dado que la comprensión de estas interacciones gen-gen y gen-ambiente es pobre, esto plantea un desafío importante para el desarrollo de modelos de estudio del epitelio respiratorio.

Los modelos actuales implican el uso de una gran cantidad de sistemas que van desde modelos muy simples que utilizan células humanas (por ejemplo, células epiteliales bronquiales y fibroblastos) en mono o co-cultivo, explantes de tejido completo (biopsias, tiras musculares, anillos bronquiales) hasta estudios *in vivo* en voluntarios humanos, pasando por modelos animales *in vivo*. La investigación de estas enfermedades se ha visto facilitada en gran medida por la introducción de la broncoscopia con fibra óptica, que ahora es una técnica comúnmente utilizada en el campo de la investigación de enfermedades respiratorias, que permite la recolección de muestras de biopsia, muestras de cepillado bronquial y líquido de lavado broncoalveolar, lo que permite el uso de células y tejidos derivados de la enfermedad en algunos de estos modelos (Blume & Davies., 2013).

A continuación, se exponen los modelos actuales tanto *in vivo* como *in vitro* para conocer mejor el epitelio respiratorio y así avanzar en la comprensión de las enfermedades respiratorias y su tratamiento.

2.2.1. Modelos In Vitro

Los modelos humanos más simples para el estudio de las respuestas de las vías respiratorias son líneas celulares derivadas del tejido pulmonar. Estos pueden establecerse a partir de cánceres, tejido pulmonar embrionario o mediante transformación viral de células del tejido pulmonar normal e incluyen células epiteliales bronquiales, células de músculo liso y fibroblastos. Los modelos basados en líneas celulares se utilizan ampliamente para analizar vías de señalización y respuestas celulares básicas en las vías respiratorias (Blume & Davies, 2013).

A lo largo de los años, se han propuesto numerosos tipos de células como modelos de estudio de la barrera epitelial de las vías respiratorias como son células recién aisladas en cultivo primario y células inmortalizadas en crecimiento continuo que se han utilizado en estudios biofarmacéuticos. En condiciones de cultivo apropiadas, las células se diferencian y mantienen su morfología, su capacidad para secretar moco, la

ciliogénesis y los patrones de expresión de transportadores de membrana y enzimas metabólicas (Endter et al., 2009; Sakamoto et al., 2013). Algunos de estos atributos se pierden con el tiempo en el cultivo, ya que las células tienden a transdiferenciarse o desdiferenciarse (Selo et al., 2021; DeMaio et al., 2009; Dobbs et al., 1997).

Cultivo de células primarias.

Las células epiteliales recién aisladas en condiciones de cultivo apropiadas se diferencian en monocapas pseudoestratificadas confluentes de células epiteliales mixtas y, por lo tanto, pueden considerarse la mejor representación *in vitro* posible del epitelio respiratorio (de Jong et al., 1994; Cao et al., 2021). Sin embargo, las células primarias sólo pueden mantenerse en cultivo durante períodos de tiempo limitados, ya que el subcultivo con un elevado número de pases se asocia con una pérdida del fenotipo celular y una desdiferenciación (Rayner et al., 2019).

Cultivo Interfaz Aire-Líquido (ALI)

Como una extensión del modelo anterior, las células del epitelio respiratorio se cultivan en una interfaz aire-líquido (ALI), diferenciándose en una monocapa pseudoestratificada con células basales que sostienen células ciliadas y caliciformes productoras de moco (Pezzulo et al., 2011), como ocurre *in vivo*. Las células epiteliales se siembran en una cámara de cultivo bifásica con un soporte permeable recubierto con un sustrato de gel de matriz extracelular. En el crecimiento en cultivo sumergido, la superficie apical de las células epiteliales queda expuesta al aire, mientras siguen recibiendo nutrientes basalmente, formándose un epitelio pseudoestratificado diferenciado (Gómez-López et al., 2021). Desde su desarrollo (Whitcutt et al., 1988) el sistema de cultivo ALI se ha utilizado ampliamente para análisis funcionales *in vitro* del epitelio bronquial (Gómez-López et al., 2021). Los cultivos ALI también son una herramienta útil para analizar la frecuencia del latido ciliar en respuesta a diversos estímulos (Devalia et al., 1992; Byran et al., 1998; Blume & Davies, 2017).

Si bien el cultivo de células primarias contribuye significativamente a nuestra comprensión de los mecanismos de las vías respiratorias son limitados, debido a la baja cantidad de células que se pueden obtener y cultivar de cada sujeto, con la posibilidad de que las células pierdan sus características después de un cultivo a largo plazo. Sin embargo, los avances recientes que involucran la expresión inducida de la transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTERT) para prevenir la senescencia replicativa y la expresión de la proteína del ciclo celular cdk4 (Ramírez et al., 2004) han permitido la inmortalización de células epiteliales en cultivo sin pérdida de su capacidad de diferenciarse cuando se llevan a un ALI (Vaughan et al., 2006). Este enfoque podría ser útil para generar líneas celulares a partir de células derivadas de pacientes con

enfermedades respiratorias, aunque dichas líneas necesitarían una caracterización fenotípica cuidadosa.

En nuestro laboratorio, Selene Díaz Chamorro (2023) caracterizó en su tesis una línea de células madre basales humanas aisladas de las vías respiratorias, a través de la expresión de hTERT. Esta línea celular inmortalizada, BROCC2, deriva de una sola célula parental y durante las condiciones de expansión y diferenciación del cultivo conserva el marcador p63, característico de este tipo celular del epitelio respiratorio y es capaz de formar un epitelio pseudoestratificado y diferenciado. Sin embargo, se vio que a medida que se va aumentando el número de subcultivos celulares, se va perdiendo el potencial de diferenciación de esta línea celular, aunque sigue manteniendo la capacidad proliferativa y de formar una monocapa continua.

Modelos 3D

Además de los modelos de cultivo ALI, la formación de esferoides 3D también se puede lograr utilizando células epiteliales primarias. Las células madre de las vías respiratorias adultas se incrustan en hidrogeles de matriz de membrana basal (por ejemplo, Matrigel) y se cultivan en condiciones no adherentes, dando lugar a estructuras huecas tridimensionales llamadas "organoides" (Wu et al., 2011; Blume y Davies, 2017). Se pueden establecer cultivos de organoides pulmonares a partir de células primarias murinas o humanas y fenocopiar aspectos celulares básicos del epitelio de las vías respiratorias, con células progenitoras polarizadas y su progenie diferenciada dispuestas alrededor de una luz (Barkauskas et al., 2017).

Estos modelos se han utilizado para estudiar los procesos involucrados en morfogénesis, ramificación y diferenciación del epitelio de las vías respiratorias (Yu et al., 2007; Franzdóttir et al., 2010) y es el más utilizado para el desarrollo de modelos de carcinoma de células escamosas *in vitro*. En los ensayos de detección de fármacos, la respuesta de los organoides individuales del cáncer de pulmón varió según su perfil mutacional, lo que destaca su potencial como herramientas para predecir respuestas terapéuticas específicas de los pacientes, así como para estudios de desarrollo de fármacos (Sachs et al., 2019; Kim et al., 2019).

Una limitación importante de este modelo de cultivo *in vitro* es que investigan las respuestas de un solo tipo de célula aislada, mientras que, *in vivo*, la interacción entre muchos tipos de células diferentes es crucial para la homeostasis celular.

Para abordar estas interacciones complejas en modelos experimentales, actualmente se está invirtiendo un esfuerzo considerable en el desarrollo de modelos de co-cultivo y construcciones de tejido en 3D que integren células y componentes de la matriz extracelular para imitar más fielmente el estado *in vivo* (Blume & Davies, 2017).

Co-cultivo celular

El epitelio respiratorio, sumado a la acción de las células inmunes, en particular los macrófagos alveolares, proporcionan una barrera adicional que elimina las partículas inhaladas mediante fagocitosis y modula la respuesta inflamatoria del pulmón (Müller et al., 2010; Kasper et al., 2017). Dado que las células inmunes pulmonares interactúan estrechamente con el epitelio *in situ*, el co-cultivo de estas dos poblaciones de células debería dar como resultado modelos *in vitro* más fisiológicamente relevantes (Wottrich et al., 2004; Loret et al., 2016). Los modelos de co-cultivo más simples utilizan células epiteliales de las vías respiratorias diferenciadas o indiferenciadas en el compartimento apical del soporte tipo *transwell* y otros tipos de células en el compartimento basal. Las células adherentes, como los fibroblastos o las células endoteliales, también se pueden cultivar en estrecho contacto con las células epiteliales en la superficie inferior del soporte (Pohl et al., 2010).

Estos modelos de co-cultivo representan una herramienta valiosa para analizar la señalización epitelio-mesénquima que se cree que desempeña un papel importante en la inflamación y remodelación de las vías respiratorias en el asma. Por ejemplo, se ha observado la activación de fibroblastos en respuesta a desafíos epiteliales, incluido daño físico (Thompson et al., 2006; Malavia et al., 2009), infección viral (Tomei et al., 2008) o tensión mecánica para simular el efecto de la broncoconstricción en el epitelio (Choe et al., 2003).

Células madre pluripotentes inducidas (IPs)

La derivación de células madre específicas de tejido humano a partir de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) tendría implicaciones de amplio alcance para la medicina regenerativa. Actualmente, Hawkins et al. (2021) han conseguido realizar la diferenciación dirigida de iPSC humanas en células basales de las vías respiratorias ("iBC"), una población que se asemeja a las células madre del epitelio de las vías respiratorias *in vivo*. En este estudio se comprobó, inicialmente, que los progenitores pulmonares identificados por la expresión de NKX2-1 producen niveles bajos de expresión de TP63 en una minoría de células. Posteriormente, se induce un programa de vías respiratorias en desarrollo caracterizado por la co-expresión de NKX2-1 y TP63, con la posterior maduración en células que expresan el fenotipo funcional y molecular de las células basales. Estas iBC están marcadas además con el marcador de superficie celular NGFR que permite su purificación mediante citometría de flujo para poder identificarlas y aislar estas células. Varios informes recientes también han demostrado la diferenciación dirigida exitosa de células madre pluripotentes inducidas por humanos

(iPSC) en tipos de células epiteliales de las vías respiratorias, incluidas aquellas que expresan el marcador canónico de células basales TP63 (Dye et al., 2015; Hawkins et al., 2017; Konishi et al., 2016; McCauley et al., 2017).

Las iBC y su progenie diferenciada modelan las perturbaciones que caracterizan las enfermedades genéticas y adquiridas de las vías respiratorias, incluida la metaplasia mucosa del asma, la disfunción del canal de cloro de la fibrosis quística y los defectos ciliares de la discinesia ciliar primaria. La capacidad de derivar células madre específicas de tejido, como las células basales de las vías respiratorias, a partir de iPSC, incluidas las capacidades para purificar, expandir, criopreservar y diferenciar estas células, supera muchos de los obstáculos clave que actualmente limitan la aplicación más generalizada de la tecnología iPSC y debería acelerar el estudio del ser humano enfermedad pulmonar (Hawkins et al., 2021).

2.2.2. Modelos de tejido pulmonar ex vivo.

Los modelos basados en tejido humano más simples para el estudio de las respuestas de las vías respiratorias son los explantes de tejido *ex vivo*. El tejido de los pulmones resecados se puede mantener en cultivo utilizando formulaciones de medios especiales durante un período de tiempo limitado y usarse para experimentos a corto plazo (Blume & Davies, 2017). Por ejemplo, se han utilizado cortes de pulmón cortados con precisión para investigar la respuesta inmune alérgica en la fase temprana en el pulmón (Wohlsen et al., 2003) y son una herramienta útil para analizar el efecto y el metabolismo de los fármacos (Switalla et al., 2010; Henjakovic et al., 2008).

Las muestras de biopsia obtenidas de individuos asmáticos o no asmáticos mediante broncoscopia son otra fuente de tejido pulmonar completamente diferenciado *in vivo*, que puede usarse *ex vivo* para experimentos a corto plazo para analizar los mecanismos del asma. Tomando biopsias bronquiales de individuos asmáticos y exponiéndolas a alérgenos en cultivo, se ha analizado la implicación de las células T en la inflamación alérgica y las vías de señalización que contribuyen a ella (Lordan et al., 2001; Vijayanand et al., 2010). Si bien estos modelos se benefician de la conservación de la arquitectura del tejido normal, están limitados por su viabilidad a corto plazo y las propiedades de barrera de la capa epitelial se ven comprometidas por la exposición de toda la muestra de tejido extirpado a agentes externos.

2.2.3. Modelos animales

Se han desarrollado diversos modelos animales (perros, conejos, ratas, ratones, etc.) con el fin de analizar el proceso de reparación del epitelio de las vías respiratorias tras lesiones de diferentes fuentes (oxidantes, infección bacteriana o vírica, lesiones

mecánicas, etc.). Los modelos animales se mantienen firmes como el puente traslacional entre los cultivos celulares *in vitro* y los ensayos clínicos a gran escala, lo que permite una investigación detallada y definitiva de las vías moleculares en un sistema inmunológico y respiratorio en funcionamiento. La capacidad de adaptarse a fenómenos emergentes *in vivo* como la homeostasis, la retroalimentación positiva/negativa y la redundancia de animales intactos permite una investigación exhaustiva de los hallazgos *in vitro* antes de que progresen a ensayos clínicos (Seok et al., 2013; Chapman et al., 2014).

Modelos de animales pequeños

Los animales pequeños como roedores o conejos son mucho más fáciles de obtener y manipular que los animales grandes, además de los menores costos asociados con la adquisición y el mantenimiento de las colonias (Selo et al., 2021). Desde una perspectiva económica, el equipo necesario y menores cantidades de consumibles y sustancias en investigación son claras ventajas de utilizar especies más pequeñas (Wang et al., 2020). Además, la disponibilidad de cepas *knockout* para ratas y ratones (Jiang, 2013) representa otra ventaja importante. Se han desarrollado modelos de ratones humanizados, como el modelo del síndrome de bronquiolitis obliterante (Xue et al., 2011), y se pueden generar implantes pulmonares vascularizados de origen pulmonar humano (Whal et al., 2019) injertando células madre y/o tejido de origen humano en ratones inmunodeficientes. Se ha descrito particularmente bien la regeneración del epitelio traqueal del hámster después de una lesión mecánica. McDowell et al. (1979) informaron de una rápida reepitelización de la membrana basal desnuda con un primer paso de migración epitelial antes de todos los procesos de proliferación. De hecho, las células epiteliales en el borde de la herida pueden desdiferenciarse, extenderse y luego migrar para cubrir completamente la lámina basal desnuda (Coraux et al., 2005). Los pulmones aislados y perfundidos derivados de estos modelos pueden ser herramientas prometedoras para estudiar enfermedades pulmonares humanas y probar nuevos objetivos terapéuticos.

Modelos de animales grandes.

Los modelos animales grandes han contribuido a nuestra comprensión actual de la fisiopatología respiratoria y los efectos de los fármacos modificadores de las enfermedades pulmonares. Para el desarrollo de fármacos, el beneficio de utilizar animales grandes sobre especies animales más pequeñas se debe principalmente a la mayor similitud entre los humanos y animales de tamaño equivalente en términos de anatomía general, morfometría, estructura y fisiología de sus sistemas respiratorios. El

animal grande más utilizado y mejor caracterizado ha sido el cerdo. Los pulmones de los cerdos son comparables en tamaño y características fisiológicas y anatómicas a los de sus homólogos humanos (Nelson et al., 2014; Hammer et al. 1999). De hecho, el número de generaciones bronquiales en el tracto respiratorio porcino y el patrón de disminución progresiva de la longitud y el diámetro dentro del árbol bronquial después de cada bifurcación son similares a los de los humanos (Maina & van Gils, 2001; Judge et al., 2014). Por tanto, el pulmón de cerdo podría ser un muy buen modelo para investigaciones biofarmacéuticas por inhalación. Sin embargo, el gran costo de investigar con animales grandes, así como la menor comprensión de los mecanismos de las enfermedades en estas especies en comparación con los roedores son limitaciones importantes. En este contexto, el uso de pulmones porcinos obtenidos de mataderos ofrece grandes ventajas éticas y económicas.

Las ovejas también han sido consideradas durante mucho tiempo una especie candidata del estudio de las enfermedades respiratorias (McCarron et al., 2021). Los pulmones de ovinos tienen características anatómicas, funcionales, histológicas y electrofisiológicas similares a las de los humanos (Harris, 1997). El tamaño y la estructura comparativos de los pulmones de ovejas con los de los humanos proporcionan una plataforma útil para realizar la administración de sustancias (p. ej., líquidos y aerosoles) y técnicas de muestreo como la biopsia de tejido pulmonar como métodos clínicos. Las ovejas se han utilizado para modelar una variedad de enfermedades respiratorias humanas como son la fibrosis quística y el asma, ya que CFTR está bien conservado entre ovejas y humanos y su patrón de expresión en el tejido es similar entre ovejas y humanos durante el desarrollo y después del nacimiento (Meeusen et al., 2009).

Un mejor conocimiento de los mecanismos implicados en la regeneración y diferenciación del epitelio de las vías respiratorias, así como la caracterización de las células madre epiteliales y progenitoras, puede allanar el camino hacia la terapéutica regenerativa, permitiendo la reconstitución de un epitelio de las vías respiratorias funcional en numerosas enfermedades respiratorias, como el asma, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, fibrosis quística y bronquiolitis. En esta tesis, hemos trabajado con el modelo *in vitro*, la línea celular BROCC2, desarrollado en nuestro laboratorio con el objetivo de promover la diferenciación del epitelio a pasos altos mediante la aplicación de cribados farmacológicos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El epitelio que recubre las vías respiratorias está compuesto por diversos tipos celulares, cuyas poblaciones se encuentran en una proporción equilibrada. Cuando estas células se dañan son reemplazadas a través del proceso de diferenciación de las células madre basales, que resulta fundamental para el mantenimiento de la integridad del tejido. El epitelio de las vías respiratorias constituye una barrera muy importante frente a la infección por patógenos y partículas contaminantes, y el desequilibrio en la proporción de los tipos celulares que lo constituyen conlleva a la aparición de enfermedades como son el asma, la fibrosis quística e incluso en peor escenario el cáncer. Sin embargo, las rutas moleculares implicadas en la proliferación y diferenciación de estas células madre basales durante la regeneración del epitelio siguen siendo poco conocidas.

El estudio de genes candidatos, así como el desarrollo de modelos experimentales del epitelio de las vías respiratorias son utilizados como métodos robustos para la investigación de alteraciones en el epitelio en las enfermedades respiratorias, así como de la capacidad de regeneración y diferenciación de las células basales en este tejido.

En base a esto, en esta tesis hemos querido profundizar en estos dos métodos para comprender mejor la biología de las vías respiratorias, ahondando en la capacidad de proliferación y diferenciación del epitelio respiratorio.

En el capítulo I nos propusimos estudiar el papel de Jam3 en la diferenciación del epitelio respiratorio de ratón como gen candidato. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Determinar el patrón de expresión de Jam3 en el epitelio respiratorio.
- Analizar el papel de Jam3 en la diferenciación del epitelio de las vías respiratorias a través de la modulación de sus niveles de expresión.

En el capítulo II, por otro lado, llevamos a cabo el estudio de las rutas moleculares implicadas en la diferenciación del epitelio respiratorio humano y de ratón mediante un cribado de fármacos en nuestro nuevo modelo experimental BROCC2. Los objetivos específicos que se persiguieron se presentan a continuación:

- Promover la diferenciación de la línea inmortalizada de células basales derivadas del epitelio de las vías respiratorias humanas (BROCC2) mediante el uso de fármacos que favorecen dicho proceso.
- Analizar el efecto de los fármacos en la diferenciación del epitelio de las vías respiratorias de ratón.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Modelo murino

En la presente tesis, tanto para la investigación del papel de Jam3 como de las rutas moleculares que promueven la diferenciación del epitelio respiratorio de los vertebrados se usaron cultivos de células progenitoras de tráqueas de ratones adultos *wild-type* C57BL/6J, proporcionados por el Centro Usuario de Animales de Experimentación de Cáceres. Todos los estudios en animales han sido realizados de acuerdo con la legislación nacional y europea (Real Decreto RD53/2013 y Directiva EU 86/609/CEE modificada por 2003/65/CE, respectivamente) y de acuerdo con el Instituto de Recursos de Animales de Laboratorio (ILAR) para la protección de los animales utilizados para la investigación. Los protocolos experimentales fueron aprobados por la Bioética Comité de Experimentación Animal de la Universidad de Extremadura (registrado el 7 de julio de 2017).

1.1. Obtención de células madre de tráquea de ratón.

La adquisición de las células madre de tráquea de ratón comienza con el sacrificio de los animales mediante dislocación cervical, con precaución de no dañar la tráquea. A continuación, los ratones se sujetan y se humedecen con etanol 70% (Panreac, #131086.1211), evitando así que haya contaminaciones. Tras esto, se procede a producir un pequeño corte en la piel por debajo del esternón para, así, con ayuda de las tijeras separarla del tejido conjuntivo y cortarla longitudinalmente, pudiendo observar la cavidad torácica con claridad. Una vez localizada la tráquea, efectuamos un corte en el tejido muscular que se encuentra alrededor de ésta, y procedemos a separar la tráquea cortando transversalmente por encima de la laringe y por encima de los pulmones. Llegados a este punto, cada tráquea se transfiere a un tubo que contiene medio Ham's F12 (Gibco, #11765-054) con penicilina/estreptomicina al 1% (P/S, Gibco, #15140-122) a 4°C. Inmediatamente después de diseccionar todas las tráqueas, éstas se transfieren a una placa Petri con el mismo medio y bajo la lupa se limpian los restos de tejido conectivo y vasos sanguíneos. Hecho lo anterior, la laringe se elimina y se corta cada tráquea longitudinalmente.

Una vez limpias las tráqueas, se traspasan a un tubo con pronasa (Roche, #10165921001) diluida en medio Ham's F12 con P/S 1% a una concentración de 1,5 mg/ml donde se incubarán toda la noche en agitación a 4°C para disgregar el tejido (se preparan 15 ml de medio para 20 tráqueas). Tras la digestión con pronasa, se añade al medio con las células suero fetal bovino al 10% (Fetal Bovine Serum, FBS. Gibco, #10500-064) con el fin de parar la digestión con pronasa. A continuación, el medio se traspasa a otro tubo y los restos de las tráqueas se lavan de nuevo con Ham's F12 para recuperar un mayor número de células, transfiriéndose de nuevo este sobrenadante al

mismo tubo, y centrifugándolo a 1000xg por 5 minutos. Seguido a esto, las células se resuspenden en Ham's F12 con DNAsa de páncreas bovino (Sigma, #DN25) a una concentración de 0,5 mg/ml, incubándose durante 10 minutos a temperatura ambiente eliminando así las hebras de ADN que pueden retener a las células (se preparan 10 ml por las células obtenidas de 20 tráqueas). Pasado este tiempo, se centrifuga de nuevo el tubo con las células en las mismas condiciones mencionadas anteriormente y se resuspenden las células en medio de expansión, Pneumacult ExPlus completo (StemCell, #05041), adicionando 3 ml por cada placa de cultivo que se va a usar. El medio de expansión se suplementa con el inhibidor de apoptosis Y-27632 10 μ M (StemCell #72304) y los inhibidores de la ruta TGF β /SMAD que inhiben la diferenciación de células basales y promueven la proliferación, DMH-1 1 μ M (Tocris, #4126) y A83-01 1 μ M (Tocris, #2939).

La suspensión celular se siembra en placas para cultivos primarios Primaria plates (Corning #353802) durante 4 horas, al 5% de CO₂ y a 37°C. Estas placas promueven una rápida adherencia de los fibroblastos, evitando así que permanezcan en la suspensión de células (se utilizan dos placas Primaria plates por las células obtenidas de 20 tráqueas). Tras este tiempo, las células no adheridas a las placas Primaria plates se pasan a 9 placas de 60 mm (Falcon, #353004) pretratadas con una solución de colágeno (Gibco #A10483-01) a 50 μ g/ml diluido en ácido acético 0,02 N (Fluka, #34254) mínimo 4 horas antes de su uso. A las células se les añade el medio de cultivo restante para poder sembrarlas en las 8 placas junto con los inhibidores de diferenciación y apoptosis, incubándolas toda la noche, al 5% de CO₂ y a 37°C. Tras este tiempo, se lavan las placas con PBS eliminando así las células muertas y se realiza un cambio de medio con *Pneumacult Explus* y los inhibidores Y-27632 10 μ M, DMH-1 1 μ M y A83-01 1 μ M. A partir de aquí las células progenitoras se encuentran en pase 0 y el medio debe de cambiarse cada dos días e incubarse al 5% de CO₂ y a 37°C

1.2. Cultivo primario de células de tráquea de ratón, crecimiento y diferenciación.

Una vez que las placas con el cultivo celular alcanzan el 70-80% de confluencia, se realizan dos lavados con PBS y las células se incuban con PBS-EDTA 0,02% (Fisher, #010700153) durante 20 minutos a 37°C para conseguir una correcta separación de las uniones célula-célula. Tras este tiempo, se aspira el PBS-EDTA de las placas y se añade acutasa (Corning, #25058051), incubándola durante 10 minutos a temperatura ambiente para lograr la disgregación de las células con la placa. Por último, se añade *Pneumacult Explus* completo y se obtiene una suspensión celular que se centrifuga 600xg durante 5 minutos. Finalmente, las células se resuspenden en *Pneumacult Explus* completo

dejando el cultivo celular listo para el desarrollo de los experimentos.

En cuanto al proceso de diferenciación del epitelio respiratorio pseudoestratificado a partir del cultivo primario de células progenitoras de tráqueas de ratón se lleva a cabo mediante la utilización del sistema de cultivo ALI (Air-Liquid Interface). En este sistema las células se siembran sobre membranas porosas de poliéster o *transwells*, (Corning, #3460) unidas a un soporte de plástico que tiene forma de cesta, el cual se introduce en los pocillos de una placa de cultivo de múltiples pocillos. Dichas membranas se tratan, mínimo 4 horas antes de su uso, con colágeno a una concentración de 50 µg/ml. Cuando se procedan a su utilización, las membranas se lavan con PBS y posteriormente se añaden las células suspensión en la cámara superior a una confluencia de 1×10^5 células/cm². En la cámara inferior solo se añade medio *Pneumacult ExPlus* hasta sumergir la base del soporte plástico. Las células serán incubadas toda la noche y posteriormente se sustituye el medio de la cámara superior para eliminar las células que no han adherido a la membrana. A partir de este punto, tanto el medio de la cámara superior como de la cámara inferior se irá cambiando cada dos días hasta que las células cubran la membrana por completo.

A continuación, el medio de la cámara inferior se reemplaza por medio de diferenciación ALI (Stemcell, #05002), dejando la cámara superior sin medio alguno simulando la organización del epitelio en las vías respiratorias, en el cual las células están en la región más apical en contacto con el aire, y en su parte basal en contacto con la lámina basal del epitelio. El cultivo con el medio de diferenciación ALI se mantiene 14 días, renovándose cada 2 días, desencadenando la diferenciación del epitelio respiratorio a partir de las células progenitoras de ratón.

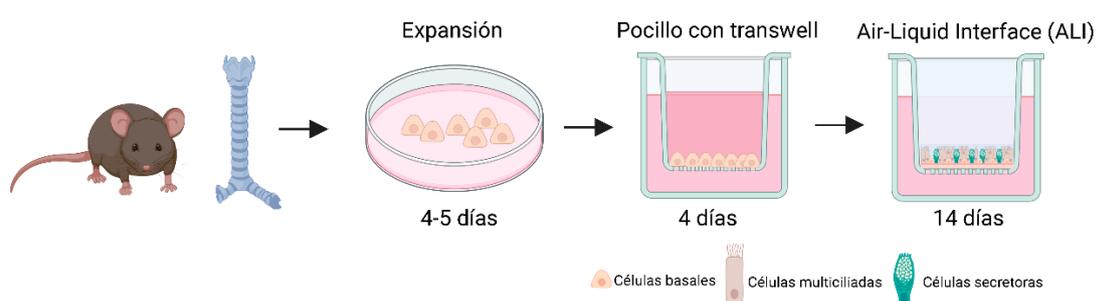


Figura M1: Representación esquemática sistema de cultivo y diferenciación de las células progenitoras de las vías respiratorias de ratón. Imagen creada con BioRender.com.

1.3. Cultivo de organoides 3D de tráquea de ratón

La generación de organoides a partir de las células progenitoras de tráqueas de ratón comienza con la expansión de dichas células en medio *Pneumacult ExPlus* adicionado con los inhibidores de apoptosis y diferenciación, ya especificado en el apartado anterior. Previamente a la producción del cultivo 3D, se debe enfriar la placa

de 96 pocillos donde se sembrarán las células, así como las puntas de pipeta y tubos Eppendorf, ya que la matriz de gel que se utiliza solidifica a temperatura ambiente. A continuación, se prepara la mezcla de matrigel reducido en factores de crecimiento (Corning, #354230) al 25% en medio *Pneumacult ExPlus* completo. La mezcla se distribuye en los pocillos designados en el experimento y se incuba la placa durante 30 minutos a 37°C para que solidifique el matrigel. Por cada pocillo de la placa de 96 pocillos el volumen a utilizar es de 100 µl (25 µl de matrigel y 75 µl de medio *Pneumacult ExPlus*).

Seguidamente, las células se despegan de la placa de expansión resuspendiéndose en medio *Pneumacult ExPlus* como se ha descrito anteriormente. Las células se cuentan y se prepara una solución de 500 células en medio *Pneumacult ExPlus* con matrigel al 2% adicionado con el inhibidor de apoptosis Y-27632 a 20 µM, para cada pocillo de la placa de 96 pocillos. Esta mezcla se añade sobre los pocillos con el matrigel al 25%. Pasadas 8-16 horas, las células se posicionan dentro de la fase más densa. Las células se cultivan cada 5 días, cambiándose el medio de la fase superior se reemplaza cada 2 días. Las imágenes para la cuantificación del crecimiento de los organoides se hacen a día 5 con el microscopio *EVOS Fluid Cell Imaging Station* (Invitrogen).

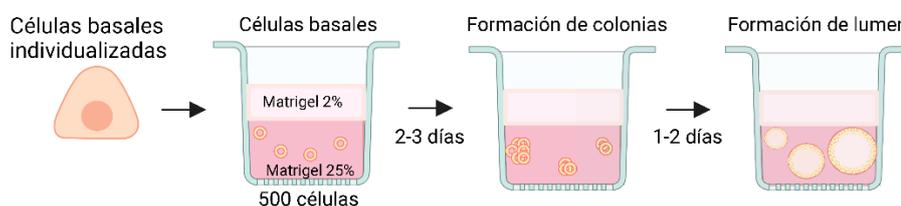


Figura M2: Representación esquemática del sistema de cultivo de organoides de las vías respiratorias de ratón. Imagen creada con BioRender.com.

2. Modelo humano

Las células humanas utilizadas en esta tesis se obtuvieron a partir de biopsias de bronquio de donantes sanos, y fueron adquiridas a través del Biobanco del Área de Salud de Badajoz (ref. B.0001437).

2.1. Obtención de células madre de bronquio humano

Las biopsias de bronquio humano se recogen en PBS y se lavan dos veces con el mismo tampón. Una vez retirado el PBS, a las muestras se les añade pronasa a 1mg/ml, diluida en medio Ham's F12 con P/S 1%, favoreciendo la disgregación del tejido y la liberación de las células progenitoras. Además, a las muestras se les incorpora DNAsa a 0,5mg/ml, eliminando así las hebras de ADN que se encuentran en las células

muertas. La mezcla se incuba toda la noche a 4°C en agitación y pasado este tiempo, se centrifugan 5 minutos a 1000xg. Tras esto, las células se resuspenden en medio *Pneumacult ExPlus* completo con los inhibidores de diferenciación y apoptosis A83-01 1µM, DMH-1 1µM e Y-27632 10µM y se siembran en dos placas de 60mm tratadas previamente con colágeno a una concentración de 50µg/ml. El medio se va cambiando cada 2 días hasta que las células alcancen una confluencia de 70-80%.

2.2. Cultivo primario de células de bronquio humano, crecimiento y diferenciación.

Una vez que las placas con el cultivo celular alcancen la confluencia adecuada, se realizan dos lavados con PBS y se resuspenden las células con PBS-EDTA y acutasa, de acuerdo con el protocolo anteriormente detallado para las células de ratón, quedando el cultivo celular preparado para llevar a cabo los experimentos.

Para llevar a cabo la diferenciación del epitelio pseudoestratificado a partir de células basales humanas se pone en funcionamiento la utilización del mismo sistema de cultivo ALI descrito previamente para las células progenitoras de tráqueas de ratón. En el sistema de cultivo ALI para células basales humanas se siembran $1,5 \times 10^5$ células/cm², renovando el medio de expansión *Pneumacult ExPlus* completo junto con los inhibidores de diferenciación y apoptosis en torno a 7 días, hasta que las células formen una monocapa y tapicen la membrana por completo. A partir de este momento, se elimina el medio de la cámara superior y el medio de la cámara inferior se reemplaza por medio de diferenciación ALI. El cultivo con el medio de diferenciación ALI se mantiene 21 días, reemplazándose cada 2 días, hasta conseguir la diferenciación del epitelio respiratorio. A medida que avanza la diferenciación del cultivo, se va produciendo mucho moco y para evitar su acumulación, cada 2 días se debe lavar la cámara superior del sistema con PBS durante 5 minutos y 37°C, siendo esta etapa importante para que los anticuerpos puedan internarse dentro de las células humanas en los ensayos de inmunofluorescencia.

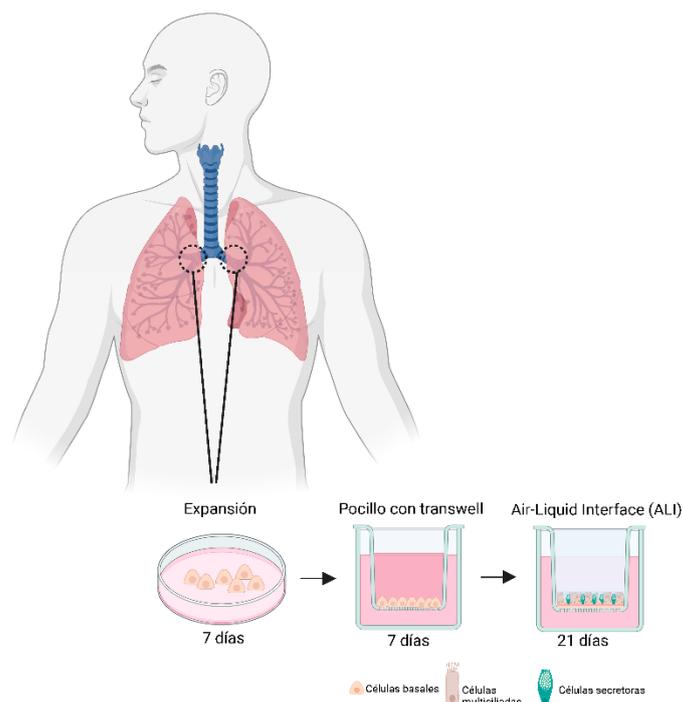


Figura M3: Representación esquemática del sistema de cultivo y diferenciación de las células basales procedentes de bronquio humano. Imagen creada con BioRender.com.

3. Tratamientos en cultivos celulares

Los compuestos utilizados en esta tesis se preparan según las directrices del fabricante. En cuanto a los cultivos empleados como control son tratados con los volúmenes adecuados del solvente. Los reactivos utilizados se especifican a continuación:

- **IL6** (*Gibco #PHC0065*). Se utilizó durante la diferenciación de los cultivos de células de bronquio humano, ya que en la tesis de Selene Díaz Chamorro se demostró que IL6 induce la expresión del factor de transcripción FOXJ1, así como de proteínas que forman parte de la estructura del cilio, tales como conexina, centriolina, γ -tubulina o tubulina acetilada; observándose además que IL6 promueve la pseudoestratificación de la monocapa de células madre basales durante su diferenciación. Disuelta en ácido acético 0,1 M se utilizó a una concentración de 10 ng/ml. Como control se utilizó DMSO.
- **DAPT** (*Tocris #2634*). Es un potente inhibidor de la ruta de señalización Notch y actúa a través del bloqueo de la γ -secretasa, que transduce la señal de esta ruta desde el receptor Notch I. Fue utilizado durante la diferenciación de cultivos de células de las vías respiratorias de ratón. Disuelto en DMSO a una concentración de 50 μ M.

- **Histamina** (*Acros Organics #10745842*). Para la movilización compartimental de Jam3, la histamina se disolvió en PBS y se añade al medio en dos concentraciones finales diferentes (50 y 100 μM) en MTECs en ALI14 durante 1 hora a 37°. Se usó PBS como control.
- **Cribado de compuestos farmacológicos.** Set de fármacos de factores de células madre (Stem Cell Library, Tocris #7340) y de factores epigenéticos (Epigenetics 3.0, Tocris #7578) utilizados para promover la diferenciación del epitelio de la línea celular BROCC2. Disueltos en DMSO, empleados a una concentración de 1 μM .
- **Inhibidores de Bromodominios BET.** Los fármacos empleados fueron IBET-151 Dihidroclorado (Tocris #4650), CPI 203 (Tocris #5331), +(-)JQ1 (Tocris #4499) y OTX015 (Tocris #6181). Se utilizó DMSO como control. -(-)JQ1 (Tocris #5603) e iBET-DB2 (Tocris 7458) son controles negativos del fenotipo obtenido por estos inhibidores de bromodominios BET. Todos los compuestos se utilizaron a una concentración de 1 μM disueltos en DMSO. Estos inhibidores se añadieron durante la diferenciación de los cultivos de la línea celular BROCC2 y de MTECS.
- **Inhibidores de la quinasa Rho.** Los inhibidores de la quinasa Rho son una serie de compuestos que se dirigen a la quinasa Rho e inhiben la vía ROCK. Los fármacos empleados fueron AM580 (Tocris #0760) y CD437 (Tocris #1549), disueltos en DMSO a una concentración de 1 μM . Como control se utilizó DMSO. Estos inhibidores se usaron durante la diferenciación de los cultivos de la línea celular BROCC2 y de MTECS.
- **Análogos de ácido retinoico.** Los compuestos utilizados fueron Chromans1 (Tocris #7163) y SR3677 (Tocris #3667), disueltos en DMSO a una concentración de 1 μM , usando DMSO como control. Estos compuestos se emplearon durante la diferenciación de los cultivos de la línea celular BROCC2 y de MTECS.

4. Silenciamiento de proteínas en células de cultivos primarios

Para el estudio de Jam3 en las células de las vías respiratorias de ratón y conocer las rutas moleculares implicadas en la diferenciación de las células de las vías respiratorias de humano se desarrollaron construcciones lentivirales que incluían secuencias de ARN de interferencia (*shRNA*, *short hairpin RNA*) que producen el silenciamiento de la expresión de estas proteínas mediante la degradación de su ARN mensajero. Accediendo a la secuencia de transcritos de los genes que queremos estudiar, se diseñó la secuencia de ARN de interferencia y se clonaron en un vector lentiviral para su posterior transfección complementado con dos vectores de empaquetamiento en la línea celular HEK293T para la producción de lentivirus. Estos lentivirus se concentraron y se utilizaron para la infección de cultivos primarios

produciendo el silenciamiento determinado de nuestras proteínas.

4.1. Clonación en vector lentiviral.

A partir de la herramienta de diseño de secuencias de RNA de interferencia del *GPP Web Portal (Broad Institute)* se utilizaron las secuencias de los transcritos de Jam3, Brd2, Brd3 y Brd4 tomadas de la base de datos del *NBCI (National Center for Biotechnology Information)* para la adquisición de tres secuencias candidatas para cada uno de los transcritos, seleccionándose en función del nivel de silenciamiento conseguido en la validación de éstas. *GPP Web Portal*, además, incluye las secuencias para el clonaje en el vector lentiviral comercial pLKO.1, que hibridan con los extremos que generan las enzimas de restricción EcoRI (New England Biolabs, #31015) y AgeI (New England Biolabs, #3552L) de nuestro protocolo de clonación. A continuación, se especifican las tres secuencias de ARN seleccionadas para cada gen:

RNA	Secuencia
mJam3_shRNA1_F	CCGGCTTATTGTTCTTGCTGTGATTCTCGAGAATCACAGCAAGAACAATAAGTTTTTG
mJam3_shRNA1_R	AATTCAAAAACTTATTGTTCTTGCTGTGATTCTCGAGAATCACAGCAAGAACAATAAG
mJam3_shRNA2_F	CCGGGCCAAACCACATATGTGTATTCTCGAGAATACACATATGTGGTTTGGCTTTTTG
mJam3_shRNA2_R	AATTCAAAAAGCCAAACCACATATGTGTATTCTCGAGAATACACATATGTGGTTTGGC
mJam2_shRNA1_F	CCGGCGTCAAGAAGTCACAGTAATACTCGAGTATTACTGTGACTTCTTGACGTTTTTG
mJam2_shRNA1_R	AATTCAAAAACGTCAAGAAGTCACAGTAATACTCGAGTATTACTGTGACTTCTTGACG
mJam2_shRNA2_F	CCGGGCAATTCAACATGATTTCCAACCTCGAGTTGGAAATCATGTTGAATTGCTTTTTG
mJam2_shRNA2_R	AATTCAAAAAGCAATTCAACATGATTTCCAACCTCGAGTTGGAAATCATGTTGAATTGC
hBRD2_shRNA1_F	CCGGCCTATGGACATGGGACTATTCTCGAGAATAGTACCCATGTCCATAGGTTTTTG
hBRD2_shRNA1_R	AATTCAAAAACCTATGGACATGGGACTATTCTCGAGAATAGTACCCATGTCCATAGG
hBRD2_shRNA2_F	CCGGGCCCTCTTTACGTGATTCAAACCTCGAGTTTGAATCACGTAAAGAGGGCTTTTTG
hBRD2_shRNA2_R	AATTCAAAAAGCCCTCTTTACGTGATTCAAACCTCGAGTTTGAATCACGTAAAGAGGGC
hBRD2_shRNA3_F	CCGGCCCTGCCTACAGGTTATGATTCTCGAGAATCATAACCTGTAGGCAGGGTTTTTG
hBRD2_shRNA3_R	AATTCAAAAACCTGCCTACAGGTTATGATTCTCGAGAATCATAACCTGTAGGCAGGG
hBRD3_shRNA1_F	CCGGCCAAGGAAATGTCTCGGATATCTCGAGATATCCGAGACATTTCTTGTTTTTG
hBRD3_shRNA1_R	AATTCAAAAACCAAGGAAATGTCTCGGATATCTCGAGATATCCGAGACATTTCTTG
hBRD3_shRNA2_F	CCGGGCTGATGTTCTCGAATTGCTACTCGAGTAGCAATTCGAGAACATCAGCTTTTTG
hBRD3_shRNA2_R	AATTCAAAAAGCTGATGTTCTCGAATTGCTACTCGAGTAGCAATTCGAGAACATCAGC
hBRD3_shRNA3_F	CCGGCCCAAGAGGAAGTTGAATTATCTCGAGATAATTCAACTTCTCTTGTTTTTG
hBRD3_shRNA3_R	AATTCAAAAACCAAGAGGAAGTTGAATTATCTCGAGATAATTCAACTTCTCTTG
hBRD4_shRNA1_F	CCGGCCTGGAGATGACATAGTCTTACTCGAGTAAGACTATGTATCTCCAGGTTTTTG
hBRD4_shRNA1_R	AATTCAAAAACCTGGAGATGACATAGTCTTACTCGAGTAAGACTATGTATCTCCAGG
hBRD4_shRNA2_F	CCGGCCAGAGTGATCTATTGTCAATCTCGAGATTGACAATAGATCACTCTGGTTTTTG

hBRD4_shRNA2_R	AATTCAAAAACCAGAGTGATCTATTGTCAATCTCGAGATTGACAATAGATCACTCTGG
hBRD4_shRNA3_F	CCGGCAGTGACAGTTCGACTGATGACTCGAGTCATCAGTCGAACTGTCACTGTTTTTG
hBRD4_shRNA3_R	AATTCAAAAACAGTGACAGTTCGACTGATGACTCGAGTCATCAGTCGAACTGTCACTG

TABLA M1: Secuencias para mJAM3 (NM_023277), hBRD2 (NM_001113182), hBRD3 (NM_007371) Y hBRD4 (NM_058243).

Cada pareja de oligonucleótidos se reconstituyó a 10 0µM y se anillaron según el protocolo *10878 pLKO.1 – TRC Cloning protocol (Addgene)*:

- 2 µl oligonucleótido F (IDT)
- 2 µl oligonucleótido R (IDT)
- 5 µl tampón 2 10X NEB (New England Biolabs, #E702S)
- Hasta 35µl con ddH2O

El programa de anillamiento en el termociclador se detalla a continuación:

1. 4 minutos a 95°C
2. Ramp down de -5°C cada 1 min hasta 20°C

El vector lentiviral utilizado para la clonación cedido por Miguel Fidalgo presenta una modificación con respecto al vector comercial, conteniendo una proteína fluorescente (mCherry) que evidencia la correcta transfección de las células para la producción de lentivirus y de la infección de las células de las vías respiratorias. Para la digestión del vector, se empleó 7,5µg de pLKO.1-mCherry y las enzimas AgeI y EcoRI, siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Posteriormente, la digestión se purificó con el kit Nucleospin (Macherey-Nagel, #740609.250).

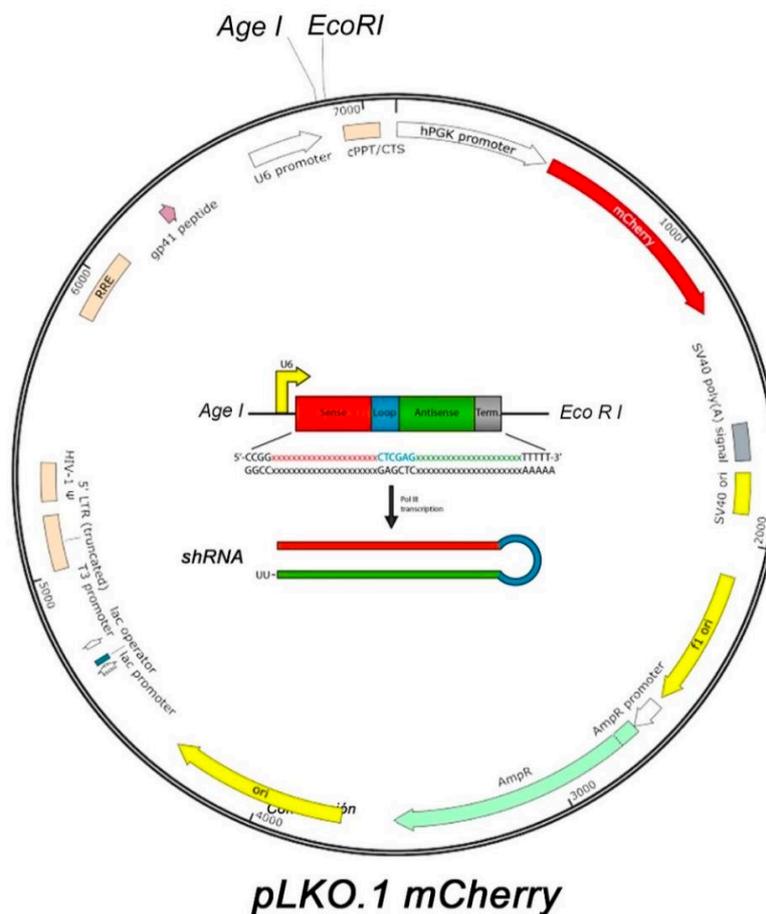


Figura M4: Esquema del vector utilizado para la clonación de las secuencias de ARN de interferencia.

A continuación, se realizó la ligación entre el vector digerido y purificado y los oligonucleótidos anillados, siguiendo este protocolo:

- 5 µl de la ligación de los oligonucleótidos F+R (IDT)
- 50 ng vector pLKO.1 digerido y purificado
- 10 µl tampón Quick ligase 2X (New England Biolabs, #M2200L)
- 1 µl T4 DNA ligasa (New England Biolabs, #M0201S)
- Hasta 20 µl con ddH₂O

En esta clonación, las secuencias de ARN de interferencia quedan aguas abajo del promotor U6 promoviendo su transcripción. Tras la ligación, la transformación se realizó en bacterias competentes Stbl3 (Thermoscientific, #C7373-03), creciéndose durante toda la noche en placas con ampicilina 100µg/ml (Sigma, #A0166-5G). Tras esto, se realizaron cultivos líquidos para aislar el ADN plasmídico mediante el kit de purificación Plasmid miniprep kit (Thermoscientific, #K0503) y se secuenciaron las construcciones en el Servicio de Técnicas Aplicadas a las Biociencias (STAB) de la Universidad de Extremadura. El oligonucleótido utilizado para la secuenciación de los plásmidos pLKO.1 fue 5'GACTATCATATGCTTACCGT-3' (IDT). Finalmente, los clones

de las construcciones seleccionados se crecieron en cultivos bacterianos de 100 ml para la extracción de ADN plasmídico en mayor cantidad utilizando el kit NucleoBond Extra Midi (Macherey-Nagel, #740410.50).

4.2. Producción de lentivirus

Para la producción de las partículas lentivirales se utilizó la línea celular HEK293T, cedida por el laboratorio de Miguel Fidalgo. El medio empleado para el mantenimiento y cultivo de la línea celular es DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (*Gibco*, #21969-c35) adicionado con FBS al 10%, L-Gln al 1% (*Gibco*, #25030-024) y P/S 1%.

El día anterior a la transfección se sembraron 9×10^6 células en placas de 150mm (*Falcon*, #353025) (una placa por cada construcción de ARNi que queramos producir) y se dejaron crecer durante toda la noche. Después de esto, mediante el método de polietilenimina (PEI) (*Sigma*, #919012) se transfectaron las construcciones de ARNi para la producción de lentivirus. Para ello, se preparó una mezcla de 1,6 ml de NaCl (*Panreac*, #131659.1214) 150mM, 40 μ g de la construcción de ARNi junto con 20 μ g de cada uno de los vectores lentivirales pMD2.G (*Addgene*, #12259) y psPAX2 (*Addgene*, #12260) que contienen la información necesaria para producir proteínas de la envoltura vírica (VSV-G) y codificar para las proteínas lentivirales de empaquetamiento (Gag-Pol-Rev), respectivamente. En otro tubo que contiene el mismo volumen de NaCl se añadieron 16 μ l de PEI 5X y se combinó posteriormente con la mezcla de ADN, incubándose a temperatura ambiente durante 30 minutos. Pasado este tiempo, la mezcla se dispensó gota a gota sobre medio de cultivo DMEM fresco en las placas de HEK293T y se incuban toda la noche, a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, se realizó un cambio de medio añadiendo medio fresco y se incubó 24 horas (48 horas desde la transfección). El siguiente paso es recolectar el medio ya que en el sobrenadante es donde se encuentran las partículas víricas, concentrándose mediante centrifugación con filtros Amicon Ultra 100KDa (*Merk* #UFC910096) a 3550xg durante 30 minutos y 4°C. Las partículas víricas concentradas se alicuotaron en un volumen de 50 μ l para evitar ciclos de descongelación-recongelación. Este proceso se realizó de la misma manera 72 horas después de la transfección, teniendo por tanto ya preparados los lentivirus para infectar las células de las vías respiratorias.

En los experimentos con ARN de interferencia se utiliza un control negativo, que es un vector lentiviral que tiene incluida la proteína fluorescente mCherry y una secuencia del gen de *Photinus pyralis* que codifica para la proteína Luciferasa (GenBank nº M15077). Este vector fue cedido por el laboratorio de Miguel Fidalgo.

Para determinar la titulación de las partículas lentivirales se utilizó el kit

UltraRapid Lentiviral Global Titer Kit (SBI #LV961A-1), extrayendo el ARN de las células infectadas para analizar, mediante qPCR, la proporción de células infectadas a través del análisis de secuencias determinadas de la construcción que se integran en el ADN celular. La titulación obtenida en los concentrados de partículas lentivirales que produjimos fue de aproximadamente 1×10^6 partículas infectivas/ml.

4.3. Transducción con lentivirus y selección de los cultivos de células.

Las células de las vías respiratorias de ratón y humano se expandieron para su cultivo como se ha explicado en los apartados tal y tal respectivamente. Las células se resuspendieron y se contaron, usando por cada infección 25000 células en 100µl de *Pneumacult ExPlus*. Además, se añadieron 25 µl de cada lentivirus utilizados en conjunto para cada proteína, por lo tanto, el volumen final de la suspensión fue de 75 µl. En base al título de partículas lentivirales y al número de células (partículas víricas / células infectadas), podemos calcular un factor conocido como multiplicidad de la infección (MOI): $0.075\text{ml de concentrado} \times 10^6 \text{ partículas víricas/ml} = 75.000 \text{ partículas víricas}$ añadidas a las 25.000 células, lo que nos da un MOI de 3. A esta mezcla se le añadió polibrene a 8µg/ml (Sigma, TR-1003), un polímero catiónico que actúa neutralizando la repulsión de carga entre el virus y la superficie celular, mejorando así la eficiencia de la infección.

La mezcla se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó durante 5 minutos a 400xg haciendo que la interacción entre la célula y el virus se vea favorecida. Tras este paso, la mezcla se resuspendió añadiendo 2,5ml de *Pneumacult ExPlus* con polibrene y las células se sembraron en placas de 60mm previamente tratadas con colágeno a 50 µg/ml y se incubaron toda la noche. Pasado este tiempo, el medio se reemplazó por medio fresco hasta el día siguiente donde las células infectadas se seleccionaron durante 48 horas con puromicina a una concentración de 3µg/ml (*MP Biomedicals*, #100552). Una vez seleccionadas las células, el medio se renovó utilizando *Pneumacult ExPlus* sin selección durante 24 horas más. En este punto, se pudo ver la eficacia de la infección observando la fluorescencia producida por la proteína mCherry. A partir de aquí, las células estaban listas para realizar los distintos experimentos.

5. Sobreexpresión de proteínas en cultivos celulares

Con el fin de estudiar el efecto de la sobreexpresión de Jam3 en la diferenciación de nuestro cultivo primario del epitelio de las vías respiratorias de ratón, se obtuvo ADN a partir de ARN de MTECS en ALI14 que se retrotranscribió usando el sistema SuperScript III One-Step RT-PCR con Platinum Taq (Invitrogen). A continuación, Jam3

se amplificó mediante PCR utilizando los siguientes oligonucleótidos a una concentración de 10 μ M:

Nombre oligonucleótidos	Secuencia
Forward	5'CCACAACCATGGCGCTGAGCCGG-3'
Reverse	5'CCATGGTTGTGGTCCAGATAACAAAGGACG-3'

Tabla M2: Secuencias para la sobreexpresión de mJam3 (NM_023277).

Jam3 se clonó en un vector lentiviral (pLKO.1-PIG) que contiene una región puromicina-IRES-GFP utilizando la enzima BstXI (New England Biolabs), en fase con la proteína GFP de este casete de expresión. A continuación, se transformaron bacterias competentes (One Shot Stbl3 Competent E.coli) creciéndose en placas con ampicilina 100 μ g/ml durante toda la noche. Tras esto, se realizaron cultivos líquidos para aislar el ADN plasmídico mediante el kit de purificación Plasmid miniprep kit y se secuenciaron las construcciones en el Servicio de Técnicas Aplicadas a las Biociencias (STAB) de la Universidad de Extremadura, utilizándose el oligonucleótido Forward para Jam3, mostrado en la tabla M2.

Para incorporar la construcción en las células, se utilizó la transfección con lipofectamina en células MDCK y HEK293T. El primer paso fue sembrar las células en placas de 12 pocillos alcanzado un 70-80% de confluencia en el momento de la transfección. A continuación, se prepararon los complejos de lípidos y ADN plasmídico, mezclando por un lado en un tubo 50 μ l de medio OPTIMEM, recomendado cuando se van a usar reactivos de transfección de lípidos catiónicos, con 2 μ g de DNA y otro tubo conteniendo 50 μ l de OPTIMEM y 2 μ l de lipofectamina 2000 (Invitrogen #11668-027), agitando con el vórtex el contenido de ambos tubos. Después, se mezcló el contenido, vertiendo la lipofectamina sobre el ADN, aplicando vórtex de nuevo e incubándose durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se agregó esta mezcla gota a gota sobre las células con el medio recién cambiado por OPTIMEM y se incubó durante 5 horas a 37°C y 5%CO₂. Para finalizar, se sustituyó el medio OPTIMEM por medio de cultivo DMEM y se seleccionaron las células con puromicina a 3 μ g/ml, siendo visible la fluorescencia en verde a las 48 horas, mostrando aquellas que presentan la construcción.

6. Análisis de los niveles de expresión génica mediante PCR cuantitativa (qPCR)

Los niveles de expresión de los genes de interés en nuestros cultivos celulares se analizaron mediante la cuantificación de ARN mensajero (ARNm) presente en

nuestras muestras. Con este fin, se extrajo el ARNm y se realizó una reacción de retrotranscripción sintetizando el ADN complementario (ADNc), que se utilizó como molde para la PCR cuantitativa.

6.1. Extracción de ARN

La extracción de ARNm se realizó mediante el kit ilustra RNAspin Mini (*GE Healthcare #2505500-71*), según las indicaciones del fabricante. Comenzamos la extracción de ARN mediante una lisis inicial, seguido de un filtrado del lisado total para precipitarlo con etanol 70%. Este volumen se transfirió a una columna de afinidad donde se realizó una incubación con DNAsa para eliminar el ADN genómico. A continuación, se realizaron dos lavados y se eluyó el ARN en agua mili-Q libre de RNAsa. El paso final fue determinar la concentración de ARN mediante la medida de la absorbancia espectrofotométrica a 260nm utilizando el equipo espectrofotométrico *BioPhotometer (Eppendorf)*.

6.2. Retrotranscripción

La retrotranscripción de ARN mensajero a ADNc se realizó mediante el kit High-Capacity cDNA reverse transcription (*Applied Biosystems, #4368814*), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se utilizó una cantidad comprendida entre 200 y 400ng de ARN totales llevados a 10µl con agua destilada libre de RNAsa para cada muestra. A esta mezcla se le añadió la retrotranscriptasa, tampón 10x, los cebadores aleatorios para la enzima y la mezcla de dNTPs, quedando preparada la mezcla para la reacción en el termociclador. El equipo utilizado fue Veriti 96-well Therman Cycler (*Applied Biosystems*) y el programa empleado en el termociclador se detalla a continuación:

1. Incubación de las muestras a 25°C durante 10 minutos
2. Incubación a 37°C durante 2 horas
3. Incubación a 85°C durante 5 minutos.

Una vez finalizado el programa, las muestras se diluyeron 10 veces en agua mili-Q y quedan listas para la PCR cuantitativa.

6.3. PCR cuantitativa

Los niveles de expresión de los genes de interés se analizaron por medio de PCR cuantitativa (qPCR, *Quantitative Polymerase Chain Reaction*), mediante el uso del kit *PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems #A25742)*, siguiendo las indicaciones del fabricante. 1µl de cada muestra de ADNc se transfirió a una placa de 96 pocillos (*MicroAmp EnduraPlate Optical 96-Well, Applied Biosystems, #4483354*) y 9

µl de una mezcla que contiene 2µl de agua mili- Q, 2µl de la mezcla de cebadores específicos para cada gen con una concentración de 10 µM, y 5µl de la *master mix* del kit. Para cada gen se realizaron duplicados o triplicados técnicos de la misma muestra.

Las secuencias de los cebadores utilizados en la qPCR se diseñaron partiendo de los exones extraídos de la base de datos Ensembl y Primer3, teniendo una temperatura de hibridación de 60°C y un tamaño de entre 10 y 25 nucleótidos. Las secuencias de cebadores para el estudio de la expresión génica en ratón y humano se recogen, respectivamente, en las siguientes tablas:

Nombre del gen	Secuencia F	Secuencia R
Trp63	CAGATTCAGAACGGCTCCTC	GATGGAGAGAGGGCATCAAA
FoxJ1	GTTTCATCCACCCATGTTCC	GTAGGACCCCTTCTGGGCTTC
Scgb1a1	CATCATGAAGCTCACGGAGA	AGGTGAGATGCTCGCAGTTT
Scgb3a2	TTCCCTCATTTGATCCCTTG	CACGTAGCAAAGGCTTCTCC
Spdef	CAGGGCCTGTCTGCTTTCTA	CATCGATTGCACCTGCTCTA
Krt5	CATCGATTGCACCTGCTCTA	TCCAGCAGCTTCCTGTAGG
Jam3	TACAGCTGGTACCGCAATGA	GAGTGCCTGTCTCCGAGTTC
Jam1	TCAGTGTCCCCTCCTCTGTC	GCATCTGCTGTAAGCATGGA
Mcidas	CAGATCAAGGCAACAACGAA	TTAGGGTCACGATTGTGCAG
Wrd19	TCTCCATAAGCCTTTGCTG	AGCATTGCTCAGGTCAGT
Ift81	GGGCTTGGTGATTGGAAGTA	CACTTGGCACCTCCAGTTTT
Jam2	TGACTGGAAGTGTGGTGGAG	CCTTTTGGATTCCCTAGCAA
Ei1a	AATGTGCTTTGACGGTGTGA	TGATTTTGGCATGTTCTGGA
BRD2	AATGGCTTCTGTACCAGCTTTAC	CTGGCTTTTTGGGATTGGACA
BRD3	GGGCGAAAGACTAACCAACTG	GAAAGGCCAGGCAAACCTGATG
BRD4	GCCTTGAACAGACCCTCTCC	TGACTTTGGTTGGTGGCCTT
Jag1	TGCAGAACGTGAATGGAGAG	GCGGGACTGATACTCCTTGA
Jag2	CACACCTGGAGCTGCAGATC	TTCTTTGCCATCCAGCCAT
Notch1	CACCTGCAGGCAAGATGTTA	AGTTCACAGTGGGGACCAGT
Notch2	ATCTCATCCCTGCGAAAATG	GGCATCTGTAGGAACCAGGA
DII-1	GGTTTGTGTGTGACGAGCAC	AGTGCAGTACTGGCCTTTCC

Tabla M7: Listado de oligonucleótidos utilizados como cebadores en qPCR en muestras procedentes de ratón.

Nombre del gen	Secuencia F	Secuencia R
TP63	CAGATTCAGAACGGCTCCTC	CTGGGTAGTCGGTGTGGAG
FOXJ1	GAACCCCTCAAAGGCAACTT	CTCATCGAAGTCCAGGCTGT
SCGB1A1	CTTTCAGCGTGTTCATCGAAA	TGATGCTTTCTCTGGGCTTT
SCGB3A2	CATCAACAAAGTCCCCCTTC	CCTCTGGTCCCAGCTCATT
IFT81	CCCTGGAGGGATGAACTGT	GGCACAATTTGGGAGAGAAA
KRT5	CTTGTGGAGTGGGTGGCTAT	CGAAACCAAATCCACTACCG
BRD2	GAGGTGTCCAATCCCAAAAAGC	ATGCGAACTGATGTTTCCACA
BRD3	TCAAATTGAACCTGCCGGATT	TGCATACATTCGCTTGCACTC
BRD4 Long Isoform	CACTCCACCCCATCTCAACC	TCATCCTCCAGCAGCACTTG
BRD4 Short Isoform	ACCTCCAACCCTAACAAGCC	TTTCCATAGTGTCTTGAGCACC

Tabla M8: Listado de oligonucleótidos utilizados como cebadores en qPCR en muestras procedentes de

humano

El protocolo de qPCR utilizado consistió en los siguientes pasos:

1. Desnaturalización a 95°C durante 10 min
2. Repetición de 50 ciclos, que consistieron en la desnaturalización del ADN a 95°C, la hibridación de los cebadores al ADN molde a 60°C, y extensión de la nueva cadena de ADN, donde se mide la señal fluorescente en cada pocillo.

A continuación, se analizó la temperatura de desnaturalización de cada producto de PCR midiendo la emisión de fluorescencia de *SYBR Green* durante el cambio de temperatura de 60°C a 95°C, para comprobar la presencia de un único producto de PCR y validar la especificidad de nuestros cebadores. El equipo que se empleó es el termociclador *QuantStudio 3* de *Applied Biosystems*.

Para la cuantificación de los niveles de expresión génica (ΔCt) se determinó el ciclo en el que la muestra supera el umbral de fluorescencia (Ct), utilizando la amplificación del gen *Eif1a* como control para normalizar la cantidad de ADNc en las distintas muestras. A continuación, se calculó la expresión relativa de los transcritos ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) relacionando los valores obtenidos con respecto a nuestra condición basal (no diferenciadas, sin tratamiento, etc).

7. Análisis de proteínas mediante Western Blot

La técnica de inmunobloting Western Blot, que permite analizar los niveles de expresión de las proteínas estudiadas en esta tesis, radica en la separación de las proteínas a través de geles de acrilamida y la transferencia de éstas a una membrana que permite el marcaje de anticuerpos para su detección.

7.1. Preparación de los extractos proteicos a partir de lisados celulares

El tampón de lisis para la obtención de los extractos proteicos está formado por Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) (Panreac, A2264), EGTA 1mM (Sigma, #E-4378) EDTA 1mM, ortovanadato sódico 1 mM (Sigma, #S6508-10G), fosfato sódico 5mM (Sigma, #342483-25G), fluoruro sódico 10 mM (Sigma #201154-100G), sacarosa 0,27 M (Panreac, #131621.1210), 2-mercaptoetanol 1% (v/v) (Panreac, #A1108.0100) Tritón X-100 y cóctel de inhibidor de proteasas 1x (Roche, #11873580001).

Para obtener los lisados celulares, las células se lavaron con PBS y se añadió tampón de lisis en frío sobre las placas de cultivo. A continuación, el volumen obtenido se traspasó a un tubo Eppendorf. El lisado se desarrolló a 4°C y en agitación durante 1 hora. El siguiente paso fue la centrifugación de los tubos a 15000xg y 4°C durante 30 minutos para descartar los fragmentos celulares no lisados y los restos de membrana.

El sobrenadante se transfirió a otro tubo Eppendorf, guardando 10 µl del lisado para la cuantificación de la concentración de proteínas.

7.2. Cuantificación de la concentración de proteínas por el método Bradford.

Para medir la concentración de proteínas de los extractos celulares lisados se utiliza el método colorimétrico de Bradford, que emplea el reactivo Coomassie G250 (Bio-Rad, #5000205) y albúmina de suero bovino (BSA, Panreac, #A8412) para obtener la recta patrón. La recta, preparada en una placa de 96 pocillos, se elaboró mediante el uso de cantidades ascendentes de BSA, de 0,25 µg a 2,5 µg diluyéndose en agua hasta conseguir un volumen de 160 µl. En la misma placa, se añadió 1 µl de cada extracto proteico en 159 µl de agua. A continuación, tanto en las muestras lisadas como en la recta patrón se agregaron 40 µl de reactivo de Coomassie y se homogeneizó la mezcla en los pocillos para la medida de la absorbancia a 595nm en el lector de placas multipocillo Infinite MPlex (Tecan). Para determinar la concentración de las proteínas, los valores obtenidos se extrapolaron mediante una regresión lineal determinada por la recta patrón construida con las cantidades utilizadas de BSA.

7.3. Electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Tras cuantificar la concentración de proteínas, las muestras se mezclaron con el volumen correspondiente de tampón de carga (1/5 del volumen total) compuesto por Tris-HCl 6,5 mM pH 6,8 (Panreac, A2264), SDS (10% p/v, Sigma, #161-031), glicerol (50% v/v), azul de bromofenol (0,025% p/v, Bio-Rad, #1610404) y β-mercaptoetanol (20% v/v). El tampón de carga aumenta la densidad de la muestra y permite visualizar el frente debido a la presencia de azul de bromofenol.

A continuación, las muestras se desnaturalizaron térmicamente incubándose 5 minutos a 95°C, quedando las proteínas preparadas para la separación en función de su peso molecular en geles de acrilamida-bisacrilamida mediante el método implantado por Laemmli (Laemmli, 1970). Para este fin, se preparó el gel inferior a una concentración de acrilamida entre 7,5% y 12 %, de acuerdo con el tamaño molecular de las proteínas de interés en esta tesis. Este gel estaba compuesto por acrilamida 40% (18,5-30% v/v, Alfa Aesar, #J60868), Tris 1,5 M pH 8,8 (25% v/v), SDS 10% (1% v/v), persulfato amónico 10% (0.5% v/v, Panreac, #A2941) y TEMED (0.05% v/v, Sigma, #T9281). Después, se preparó el gel superior con los mismos compuestos, pero utilizando Tris 0.5 M pH 6.8 en vez de Tris 1,5 M y con una concentración de acrilamida al 4%.

Una vez polimerizado el gel superior, se cargaron los pocillos con el marcador

de peso molecular Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad, #161-0374) y entre 10µg y 40µg de cada muestra. La electroforesis se realizó en tampón Tris/Glicina/SDS (Fisher, #BP13414) con un voltaje inicial de 75V hasta que el frente se empaqueta, cambiándose tras esto a 125 V. El sistema de electroforesis que se utilizó es Miniprotean 3 (Bio-Rad) y la fuente de alimentación Power Pac 300 (Bio-Rad).

7.4. Electrotransferencia en húmedo

Las proteínas separadas en el gel tras la electroforesis se transfirieron a unas membranas de nitrocelulosa (*Bio-Rad*, #1620112) mediante la aplicación de un campo eléctrico constante de 1000mA por membrana en una cubeta con tampón de transferencia compuesto por Tris 25 mM, Glicina 1,9 M y metanol al 20% (v/v) utilizando la fuente de alimentación *Consort EV261* (*Bio-Rad*). Para comprobar que la transferencia funcionó correctamente y las muestras son homogéneas en cuanto a la carga, las membranas se tiñeron con el colorante *Ponceau S.* (*Sigma #P7170*). A continuación, se retiró el colorante de las membranas realizando lavados con una solución de Tris-HCl 50 mM pH 7,5 y tween-20 (0.05% v/v, *Fisher #BP337*) (TBS-T).

7.5. Marcaje de membranas con anticuerpos

Para realizar el marcaje de las membranas con anticuerpos específicos para nuestras proteínas, las membranas se bloquearon previamente con una solución de TBS-T y leche desnatada al 5% (p/v) durante 1 hora en agitación y a temperatura ambiente, evitando con esto la unión específica de los anticuerpos. A continuación, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios que se muestran en la tabla M5 preparados en la solución de TBS-T y leche desnatada a 4°C, en agitación durante toda la noche.

Anticuerpo primario	Dilución	Fuente	Casa Comercial, Referencia
Anti-Jam3	1:500	Cabra	R&D Systems, #AF1213
Anti-GFP	1:500	Ratón	Roche #11814460001
Anti-Vinculina	1:2000	Ratón	Sigma, #V4505

Tabla M5: Anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas mediante Western Blot.

El siguiente paso fue lavar las membranas cinco veces con TBS-T durante 10 minutos en agitación, quedando preparadas para el marcaje con los anticuerpos secundarios conjugados con la enzima peroxidasa de rábano (HRP) de la tabla M6 preparados en la solución de bloqueo durante 1 hora, en agitación y a temperatura ambiente.

Anticuerpo Secundario	Dilución	Fuente	Casa Comercial, Referencia
Anti-Mouse-HRP	1:1000	Cabra	Cell Signaling #7076
Anti-Rabbit-HRP	1:1000	Cabra	Cell Signaling #7074
Anti-Goat-HRP	1:1000	Burro	Promega #V8051

Tabla M6: Anticuerpos secundarios utilizados para la detección de proteínas mediante Western Blot.

7.6. Revelado de membranas

Tras la incubación, se volvieron a realizar cinco lavados con TBS-T a las membranas y se incubaron con el sustrato quimioluminiscente Supersignal West Dura (Thermo Scientific) durante 5 minutos. A continuación, las membranas se revelaron con el equipo iBright CL1000 (Invitrogen). Los controles que se utilizaron para la normalización de los niveles de proteínas en las muestras son la detección de vinculina y la tinción de las membranas con Ponceau. La cuantificación de la señal obtenida se analizó mediante el software ImageJ por densitometría.

8. Inmunofluorescencia en células del epitelio respiratorio

Para determinar la localización subcelular y los niveles de expresión de las proteínas estudiadas en esta tesis fueron analizadas por medio de inmunofluorescencia. Al inicio de este protocolo, las muestras se lavaron con PBS $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ para mantener las uniones célula-célula y se fijaron 10 minutos con PFA 4% a temperatura ambiente. Tras esto, se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS-Tritón 0,1%, se separaron las membranas porosas que contiene a las células de los soportes mediante el uso de un bisturí y se ubicaron en una cámara húmeda y en oscuridad. A continuación, las membranas se bloquearon durante una hora con PBS-Tritón-BSA al 2% y se incubaron con los anticuerpos primarios de la tabla M3 preparados en la mezcla anterior toda la noche a 4°C.

Anticuerpo primario	Dilución	Fuente	Casa Comercial, Referencia
Anti-Jam3	1:150	Cabra	R&D Systems #AF1213
Anti-Jam3	1:100	Ratón	ThermoFisher #AB_2533486
Anti-p63	1:200	Conejo	Abcam #124762
Anti-SCGB1A1	1:50	Cabra	Santa Cruz #sc9772
Anti-FOXJ1	1:200	Ratón	Invitrogen #14-9965-82
Anti E-cadherina	1:100	Ratón	BD Biosciences #610182
Anti-Z01	1:100	Rata	TermoFisher #14-9776-82
Anti-VANGL1	1:100	Conejo	Sigma HPA025235

Anti- Acetil Tubulina	1:100	Ratón	Sigma #6793
Anti-Rab11a	1:50	Conejo	Cell Signaling #2413S
Anti-EEA1	1:100	Conejo	Cell Signaling #3288S
Anti-Dnai1	1:100	Conejo	ThermoFisher PA554526
Anti-Daap1	1:100	Conejo	Sigma-Millipore HPA049468
Anti-Centriolina	1:100	Ratón	Santa Cruz sc-365521
Anti-α tubulina	1:100	Ratón	ThermoFisher 32-2500
Anti-H3K27ac	1:2000	Conejo	Abcam #ab4729

Tabla M3: Anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas por inmunofluorescencia.

El siguiente paso fueron los 5 lavados de 10 minutos de las membranas con PBS-Tritón, quedando listos para el marcaje con los anticuerpos secundarios conjugados con fluoroforos de la tabla M4 preparado en PBS-Tritón-BSA al 2%. En la misma mezcla se preparó, de ser necesario, el marcaje de los núcleos con DAPI 0,3 μ M (4',6-diamidino-2-fenilindol, Sigma, #62248) y la faloidina fluorescente. Las membranas con los anticuerpos secundarios se incubaron una hora a temperatura ambiente y después, se lavaron 5 veces con PBS-Tritón. Finalmente, las membranas se montaron sobre un portaobjetos empleando el medio *Vectashield* (Vector laboratories, #H1000) quedando preparadas para la obtención de imágenes por microscopia confocal.

Anticuerpo Secundario	Dilución	Fuente	Casa Comercial, Referencia
Alexa-Fluor-594 anti-Goat	1:500	Burro	Invitrogen #A11058
Alexa-Fluor 594 anti-Rat	1:500	Burro	Invitrogen #A21209
Alexa-Fluor 594 Phalloidin	1:500	Burro	Invitrogen #A12381
Alexa-Fluor 488 anti-Rabbit	1:500	Cabra	Invitrogen #A21206
Alexa-Fluor 488 anti-Goat	1:500	Burro	Invitrogen #A32814
Alexa-Fluor 488 anti-Mouse	1:500	Cabra	Invitrogen #A11001

Tabla M4: Anticuerpos secundarios utilizados para la detección de proteínas por inmunofluorescencia

9. Adquisición y análisis de imágenes de microscopia confocal

La obtención de imágenes de inmunofluorescencia se llevó a cabo utilizando el microscopio confocal Olympus FV 1000 de la Unidad de Microscopía del Servicio de Técnicas Aplicadas a las Biociencias (STAB) de la Universidad de Extremadura. Las imágenes adquiridas se procesaron para cuantificar las poblaciones celulares, utilizando la señal procedente del marcaje con anticuerpos específicos de cada tipo celular. Las imágenes se obtuvieron con el objetivo de 40X del microscopio Olympus FV 1000, con zoom 2x y una resolución de 1024x1024 píxeles. Las imágenes se separaron por canales usando el programa ImageJ y se procesaron con Adobe Photoshop CC 2019.

10. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Para el análisis de la morfología, distribución y abundancia de los cilios en las células multiciliadas se utiliza la microscopía electrónica de barrido. Tras la diferenciación de los cultivos de células progenitoras de las vías respiratorias, los *transwells* se lavaron con PBS Ca²⁺/Mg²⁺, conservándose en el soporte dentro de la placa multipocillo. A continuación, las células se fijaron con glutaraldehído (2,5% v/v, *Sigma*, #G5882) en una solución de cacodilato sódico 0,1M (*Sigma*, #C0250) durante 90 minutos a 4°C. Posteriormente, los *transwells* se lavaron tres veces durante 5 minutos con cacodilato sódico 0,1M y se incubaron con tetraóxido de osmio (1% v/v, *Sigma*, #75632) durante 2h a 4°C. Transcurrido este tiempo, se eliminó el tetraóxido de osmio realizando tres lavados con cacodilato 0,1M y se llevó a cabo la deshidratación de las muestras incubándolas 30 minutos a 4°C a concentraciones crecientes de etanol, desde el 10% al 100% (v/v). Posteriormente, la membrana del *transwell* se separó del soporte plástico para ser procesadas en el Servicio de Análisis y Caracterización de Sólidos y Superficies de la Universidad de Extremadura. El etanol de los *transwell* se reemplazó gradualmente por CO₂, y éste se retiró utilizando la técnica del punto crítico y de este modo secan por completo las muestras. El siguiente paso fue recubrir las muestras de oro mediante *sputtering* o pulverización catódica, y la visualización de estas muestras empleando el equipo *Quanta 3D FEG (FEI Company)*. Las imágenes obtenidas se analizaron y procesaron con los softwares *ImageJ* y *Adobe Photoshop CC 2019*.

11. Ensayo de la integridad de la monocapa celular

El ensayo de la integridad del epitelio pseudoestratificado de los cultivos de células de las vías respiratorias tanto de ratón como humanas se realizó mediante un ensayo de biotinización apical en células diferenciadas.

Para empezar, se diferenciaron los cultivos de células de vías respiratorias de ratón hasta ALI14. Finalizado este proceso, la placa con los *transwells* se traspasó a hielo y tras aspirar el medio, se añadió tampón salino HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution, Gibco, #14025-092*) en la cámara superior e inferior del *transwell* a 4°C para el lavado de las células. A continuación, en la cámara superior se sustituyó el tampón HBSS por una solución fría de Biotina-sulfo-NHS-LC (*Thermo Scientific, #21335*) a una concentración de 2mg/ml en HBSS, mientras que en la cámara inferior se mantuvo el tampón HBSS y se realizaron dos incubaciones de 20 minutos cada una y a 4°C. En el siguiente paso, los *transwells* se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos y tras esto, se realizaron tres lavados con PBS-Tritón durante 5 minutos cada uno.

Posteriormente, se realizó una incubación con Estreptavidina-Alexa 555 (1:500, *Invitrogen*, #S32355), Faloidina-Alexa 488 (1:500, *Invitrogen*, #A12379) y DAPI 3 μ M diluido en PBS-Tritón en oscuridad durante 2h y a temperatura ambiente. Finalmente, los *transwells* se lavaron 5 veces con PBS-Tritón durante 10 minutos cada uno y se montaron sobre un portaobjetos empleando el medio de montaje *Vectashield*. Las imágenes se obtuvieron con el microscopio confocal *Olympus FV 1000* y se procesaron con los softwares *ImageJ* y *Adobe Photoshop CC 2019*.

12. Resistencia eléctrica transepitelial (TEER)

Durante el proceso de diferenciación de las células epiteliales de las vías respiratorias, la resistencia transepitelial (Transepithelial Electrical Resistance, TEER) se midió utilizando el equipo EVOM3 (*World Precision Instruments*), posicionando el electrodo en la cámara superior del *transwell*. Con este fin, se sustituyó medio PneumaCult por medio DMEM con FBS al 10% y Gln y P/S al 1% en ambas cámaras del *transwell*. Los valores que se obtuvieron se normalizan a K-Ohm/cm². Como blanco se empleó un *transwell* con medio DMEM sin células. Los valores se analizan utilizando Microsoft Excel y las gráficas se obtienen mediante el software GraphPad Prism 9.0.1

13. Medida de la batida de los cilios

La medida de la batida de los cilios comienza con la diferenciación de los cultivos de las células de las vías respiratorias. En este momento, la cámara superior de los *transwells* se lavó con PBS Ca⁺²/Mg⁺² durante 10 minutos a 37°C para eliminar el moco segregado por las células. Transcurrido este tiempo, se aspiró el PBS Ca⁺²/Mg⁺² y se añadió una mezcla de 5 μ l de bolas magnéticas (Dynabeads Streptavidin C1, *Invitrogen*, #65001) en 300 μ l de PBS Ca⁺²/Mg⁺² que se incubó durante 10 minutos para que decanten las bolas magnéticas sobre las células. Posteriormente, se retiró la mezcla de la cámara superior, manteniendo las bolas magnéticas para que se fijen a las células durante 90 minutos a 37°C. En el momento de realizar las grabaciones, se añadieron 100 μ l de PBS Ca⁺²/Mg⁺² en la cámara superior de los *transwells*, colocándose la placa en el microscopio invertido Motic AE20 y adquiriendo los vídeos con la cámara de un iPhone XS (*Apple Inc.*) a 240 fps. Las grabaciones se analizaron con el software MATLAB mediante una aplicación desarrollada en nuestro laboratorio que sigue el movimiento de las bolas magnéticas en las grabaciones obtenidas, expresándose las gráficas de frecuencia de batida en s⁻¹.

14. Inmunohistoquímica

Las tráqueas completas extraídas de los ratones se fijaron con paraformaldeído al 4 % en PBS 0,1 M pH 7,4 a 4°C durante la noche. Posteriormente, se lavaron con PBS y se crioprotegieron con PBS-Sacarosa al 10% toda la noche a 4°C, para así empaparlas con medio de inclusión y congelarlas en bloques de corte a -80°C. Se cortaron secciones de criostato de 20 mm en un plano longitudinal. Las secciones se montaron descongeladas en un portaobjetos Superfrost R Plus (Menzel-Gläser, Alemania) y se almacenaron a -20°C. Las muestras se lavaron en PBS-Triton X-100 (Sigma, #T8787) (PBS-T) durante 15 min. Luego, se añadió peróxido de hidrógeno al 3% diluido en PBS durante 45 min. Las muestras se lavaron dos veces en PBS-gelatina (2 g/l) (PanReac, 142060)-Triton X-100 0,25 % (PBS-G-T) durante 10 min y se incubaron en PBS-G-T-lisina 1 M (Merck, n.º 62) (PBS-G-T-L) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron con el anticuerpo primario Jam3 (1:150) diluido en PBS-G-T-L en una cámara húmeda durante la noche a temperatura ambiente. Después de eso, las muestras se lavaron dos veces en PBS-T durante 10 min y una vez en PBS-G-T durante 10 min y luego se incubaron con anticuerpo secundario IgG biotinilado anti-cabra (Sigma, #B7014, 1: 200) diluido en PBS-G-T-L en una cámara húmeda durante 2 h a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron dos veces en PBS-T durante 10 min y una vez en PBS-G-T durante 10 min y se incubaron con estreptavidina-HRP (Cell Signaling, #3999S, 1:100) diluida en PBS-G-T durante 2h a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron dos veces en PBS-T durante 10 min y se revelaron usando tetrahidrocloruro de 3,3-diaminobencidina al 0,03 % (DAB, Sigma, n.º868272-85-9) diluido en PBS con peróxido de hidrógeno al 0,025 %, creando un precipitado marrón donde Jam3 se expresó. Después de alcanzar la intensidad de color adecuada, la reacción se detuvo sumergiendo los portaobjetos en PBS-T. Finalmente, las muestras se tiñeron con eosina durante 10 segundos y se deshidrataron en soluciones crecientes de etanol, se lavaron en Xylol y se montaron con medio de montaje Eukitt. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio Nikon Eclipse 80i y se procesaron con Adobe Photoshop CC 2019.

15. Análisis de distribución de los cuerpos basales.

El análisis de la distribución de cuerpos basales se realizó en las células multiciliadas del epitelio pseudoestratificado de las vías respiratoria de ratón diferenciadas en ALI14 tanto en un control como en células que tienen silenciada la expresión de Jam3. La tinción de estos cuerpos basales se llevó a cabo mediante la técnica de inmunofluorescencia ya detallada anteriormente y el uso del anticuerpo primario α -tubulina que marca los cuerpos basales. Posteriormente, se obtuvieron

imágenes por microscopía confocal de esta inmunofluorescencia que permiten distinguir los cuerpos basales de las células multiciliadas y determinar la excentricidad promedio y la relación entre el ratio mayor/menor para cada célula individual. La excentricidad se define como la distancia entre los puntos focales de la elipse mínima que contiene el cuerpo basal dividida por el tamaño del eje mayor de esta elipse. En cuanto a la relación entre el eje mayor y menor (ratio Mm) para cada célula, se divide el tamaño del eje mayor de la elipse ya comentada por el tamaño del eje menor de la misma elipse. Estas medidas, siguiendo un enfoque similar al utilizado por Herawati et al. (2016), cuantifican la elongación del cuerpo basal discriminando entre cuerpos basales alineados y no alineados, obteniendo valores más largos en el caso de cuerpos basales alineados.

16. Análisis de datos de una única célula

El análisis de datos de una única célula de las vías respiratorias de ratón utilizado para las células control y silenciadas para Jam3 fue recopilado de GSE102580, que son datos específicos de expresión génica para células determinadas como multiciliadas (Plasschaert et al., 2018). Los genes que diferencian para células deuterosomales y células ciliadas maduras se obtuvieron de la bibliografía (Bukowy-Bieryllo, 2021), y su expresión unicelular se obtuvo tanto en células positivas para Jam3 como en células negativas para Jam3. Todos los cálculos se realizan con el software MATLAB.

17. Análisis de las categorías de las células multiciliadas durante la diferenciación.

Para categorizar el estadio en el que se encuentran las células multiciliadas de las vías respiratorias durante las primeras etapas de la diferenciación (a partir de ALI4) se utilizó la inmunofluorescencia con el anticuerpo centriolina. Las células multiciliadas pueden encontrarse en el estadio I con un par de centriolos, en el estadio II/III con muchos centriolos agregados y migrando, y en el estadio IV/V con gran cantidad de centriolos distribuidos homogéneamente en la membrana apical (Usami et al., 2021). Las imágenes se obtuvieron con el microscopio confocal Olympus FV 1000 y se procesan con los softwares ImageJ y GraphPad Prism 9.0.1.

18. Análisis estadístico

Los datos de todos los experimentos de esta tesis se analizan mediante el test *T de Student* para muestras no pareadas para comparar condiciones de control con diferentes grupos experimentales y se muestran como media \pm desviación estándar

(s.d.). Todos los experimentos se realizan empleando dos o tres réplicas biológicas con al menos cuatro réplicas experimentales de cada condición. Las gráficas y la significación estadística se obtienen mediante el software GraphPad Prism 9.0.1.

CAPITULO I

RESULTADOS CAPÍTULO I

La identificación de un gen candidato está basada en la elección de genes de una ruta bioquímica que se sabe que está implicada en la etiología de una enfermedad y/o que contiene miembros en los que sus mutaciones afectan al fenotipo de interés.

El epitelio de las vías respiratorias está constituido principalmente por tres tipos celulares, en equilibrio constante: las células basales, encargadas de regenerar tejidos y capaces de regenerar el epitelio completamente (Rock et al., 2009; Yang et al., 2018); células secretoras, que producen moco, esencial para atrapar patógenos y moléculas (Rawlins et al., 2009); y células multiciliadas, encargadas de cambiar la mucosidad hacia la boca para que las vías respiratorias permanezcan despejadas. (Cardoso, 2001; Rawlins & Hogan, 2006). Las diferentes poblaciones celulares en este epitelio se encuentran en constante equilibrio entre células basales y células diferenciadas a secretoras y ciliadas, dónde cualquier desregulación de este balance conlleva a una alteración de la homeostasis en las vías respiratorias, provocando la aparición de numerosas enfermedades de las vías respiratorias (Leeman et al., 2014).

El papel de Jam3 en el epitelio respiratorio es completamente desconocido, aunque se ha observado que la mayoría de los ratones *KO* para Jam3 mueren debido a infecciones en las vías respiratorias (Imhof et al., 2007). Mientras que los restantes que sobrevivían eran ratones macho infértiles, relacionando este fenotipo con un defecto en la diferenciación de las espermátidas y por tanto con la ciliogénesis de las células multiciliadas en el epitelio.

En base a los estudios anteriores que relacionan Jam3 con el epitelio de las vías respiratorias y el proceso de diferenciación y ciliogénesis, en este capítulo nos propusimos determinar el patrón de expresión de Jam3 en el epitelio respiratorio, así como su función molecular y celular en dicho epitelio, algo que hasta ahora no ha sido descrito.

1.1. La expresión *in vivo* de Jam3 se restringe a células multiciliadas en el epitelio de las vías respiratorias del ratón.

Para conocer la localización de Jam3 en las vías respiratorias de ratón, se realizó un análisis inmunohistoquímico de Jam3 en secciones de pulmón de ratón y se observó que Jam3 no se distribuye de forma homogénea en el epitelio, sino que estaba restringido a unas determinadas células (Figuras R1A). La figura R1A' reveló, mediante una visión aumentada de las vías respiratorias, que Jam3 se expresaba únicamente en las células multiciliadas.

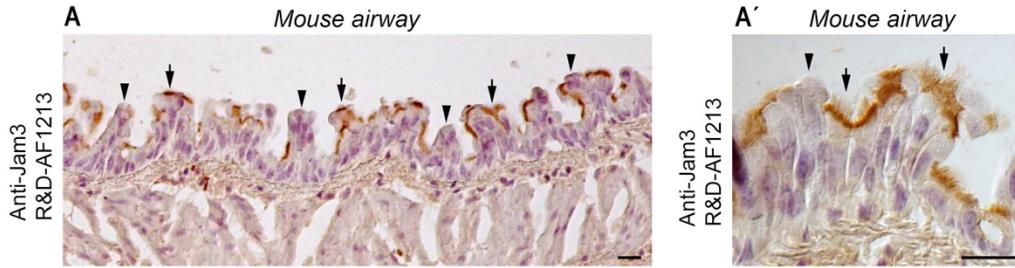


Figura R1: Localización de Jam3 en el epitelio de las vías respiratorias de ratón mediante análisis inmunohistoquímico. (A) Inmunohistoquímica de Jam3 en el epitelio de las vías respiratorias del ratón. Las flechas negras señalan las células multiciliadas, mientras que las puntas de flecha negra apuntan a células no ciliadas. (A') Imagen aumentada de la inmunohistoquímica de Jam3 en el epitelio de las vías respiratorias del ratón.

Con el objetivo de confirmar la localización de Jam3 en el epitelio de las vías respiratorias de ratón, se realizó una inmunofluorescencia en una tráquea completa para Jam3 y tubulina acetilada, una proteína que se acumula en el axonema del cilio. Este análisis corroboró que Jam3 co-localizó con células multiciliadas marcadas con tubulina acetilada (Figuras R2A-R2A''). Además, las imágenes a mayor aumento de la tráquea mostraron que los niveles de expresión de Jam3 en las células multiciliadas no eran homogéneos, encontrando células con altos o bajos niveles de expresión de Jam3 (Figuras R2B-R2B''). Estos resultados, en conjunto, revelaron que la expresión de Jam3 *in vivo* en el epitelio de las vías respiratorias está restringida a las células multiciliadas.

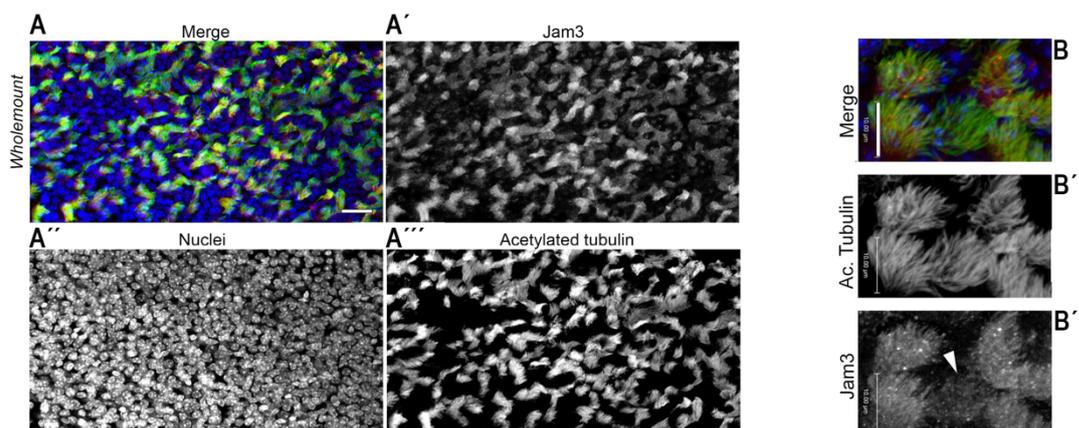


Figura R2: Análisis por inmunofluorescencia de la localización de Jam3 en el epitelio respiratorio de ratón. (A) Inmunofluorescencia de la tráquea completa de ratón que muestra Jam3 en rojo (gris en el panel A'), tubulina acetilada en verde (gris en el panel A''') y DAPI en azul (gris en el panel A''). (B) Imagen confocal a mayor aumento para la localización de Jam3 en rojo (gris en el panel B'') y tubulina acetilada en verde (gris en panel B') en la tráquea completa de ratón. La barra de escala representa 10 μm en el panel (B). La punta de flecha blanca señala a células multiciliadas con bajos niveles de expresión de Jam3.

1.2. La expresión *in vitro* de Jam3 está limitada a células multiciliadas en el epitelio respiratorio del ratón.

Una vez conocida la localización de Jam3 *in vitro*, quisimos saber cuál era el patrón de localización de Jam3 *in vitro* mediante inmunofluorescencia para Jam3 de células epiteliales de tráqueas de ratón diferenciadas (MTECs), que presentan en cultivo al menos los tres tipos celulares del epitelio respiratorio como son células basales, células secretoras y células multiciliadas. En la inmunofluorescencia se utilizaron dos anticuerpos diferentes para Jam3 (AF1213 y AB_2533486) y se obtuvo como resultado la expresión de Jam3 en unas células determinadas del epitelio respiratorio de ratón (Figura R3 panel A y A').

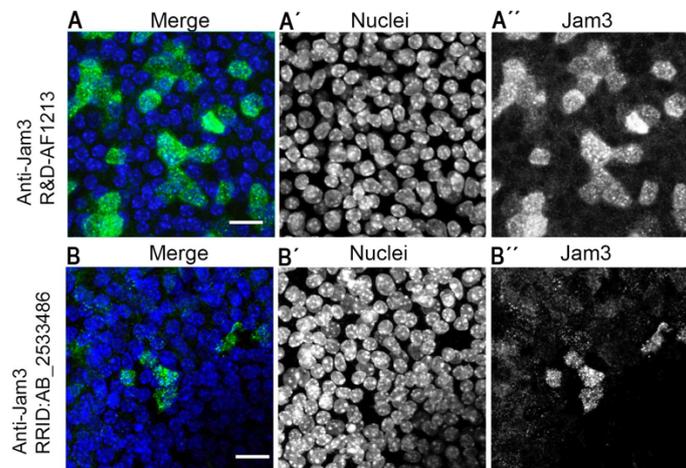


Figura R3: Expresión *in vitro* de Jam3 en células multiciliadas en el epitelio de las vías respiratorias del ratón. (A,B) Inmunofluorescencia de Jam3 en MTECs diferenciadas durante 14 días *in vitro*, núcleos en azul (gris en paneles A', B') y Jam3 en verde (gris en paneles A'', B'') utilizando dos anticuerpos diferentes. La barra de escala representa 20 μ m en los paneles (A, B).

Para confirmar que en las inmunofluorescencias de MTECs diferenciadas se detectaba el marcaje correcto para Jam3, se clonó el ADNc de Jam3 obtenido de MTECs en un vector que contenía una proteína GFP y esta construcción se transfirió a células MDCK y HEK293T. La inmunofluorescencia con el anticuerpo para Jam3 evidenció que marcaba solamente las células MDCK que contenían la construcción Jam3-GFP y no células vecinas (Figura R4A). La figura R4B confirma mediante Western-Blot que tanto el anticuerpo para Jam3 AF1213 como para GFP detectó la expresión de Jam3 solamente en las células transfectadas con la construcción Jam3-GFP, demostrando por tanto que los dos anticuerpos utilizados para Jam3 marcaron únicamente Jam3, obteniendo el mismo patrón de tinción en ambos.

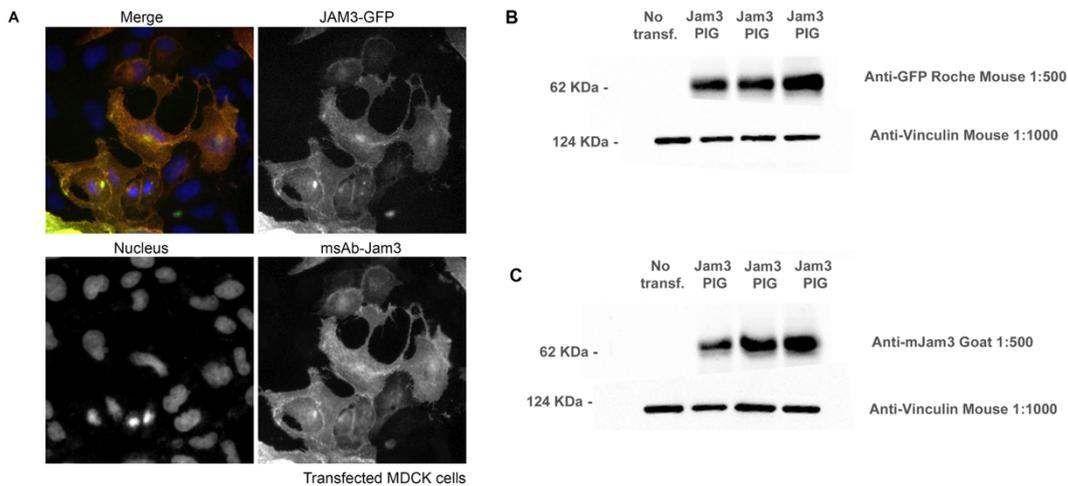


Figura R4: Validación del anticuerpo para Jam3 AF1213. (A) Inmunofluorescencia de Jam3 en células MDCK transfectadas con la construcción Jam3-GFP que muestra el mismo patrón de tinción de anti-Jam3 y la señal de Jam3-GFP. (B-C) Imágenes de Western-Blot para anti-GFP, anti-Jam3 y anti-vinculina como control (células HEK293T transfectadas con mCherry) y HEK293T transfectadas con Jam3-GFP para probar la capacidad de anti-Jam3 de reconocer Jam3 en Western-Blot.

A continuación, se realizaron inmunofluorescencias con dos marcadores característicos de células multiciliadas, la inmunofluorescencia de Jam3 y Foxj1 (factor de transcripción necesario para la diferenciación de células multiciliadas) (Figura R5 panel A) y la inmunofluorescencia de Jam3 con tubulina acetilada (Figura R5 panel B). Tras la obtención de imágenes por microscopía confocal de estas inmunofluorescencias, se cuantificó que más del 75 % de las células marcadas con Foxj1 o tubulina acetilada también eran positivas en el marcaje de Jam3 (Figura R5, panel C), confirmando de esta forma que la expresión de Jam3 en el epitelio de las vías respiratorias de ratón estaba limitada a células multiciliadas *in vivo* e *in vitro*. Sin embargo, se encontró que algunas células multiciliadas en cultivo *in vitro* no mostraron el marcaje para Jam3, no detectadas *in vivo*.

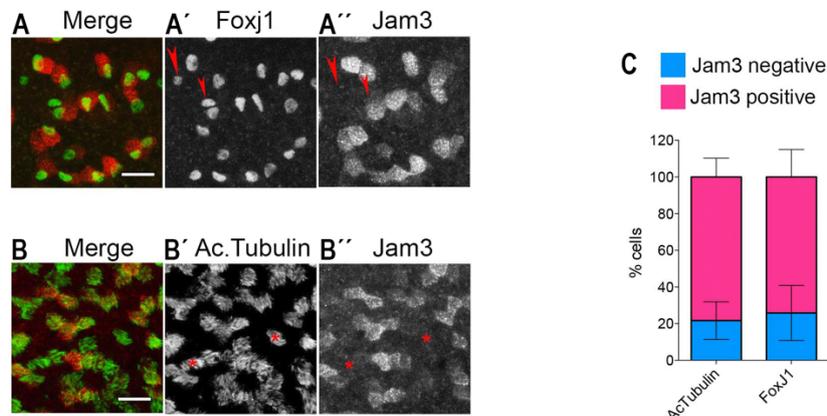
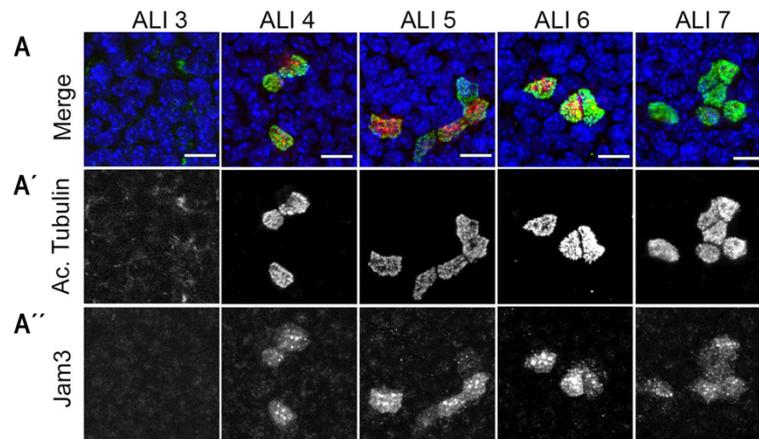


FIGURA R5: Análisis *in vitro* de la expresión de Jam3 en células multiciliadas. (A, B) Imágenes representativas de Jam3 y Foxj1 (A) o tubulina acetilada (B) para analizar el doble marcaje en células

multiciliadas. Foxj1 en verde (gris en el panel A'), y Jam3 en rojo (gris en el panel A"); Tubulina acetilada en verde (gris en el panel B'), y Jam3 en rojo (gris en panel B"). (C) Cuantificación del número de células que expresan Jam3 y tubulina acetilada o Jam3 y Foxj1. La barra de escala en los paneles (A, B) representa 20 μm . La flecha roja señala células positivas para Foxj1 y negativas para Jam3; las células rojas marcadas con asteriscos muestran células positivas para tubulina acetilada y negativas para Jam3.

Los resultados obtenidos hasta ahora demostraron que Jam3 se expresaba tanto *in vitro* como *in vivo* en las células multiciliadas, por lo que nos planteamos la siguiente cuestión: ¿La expresión de Jam3 podría estar relacionada con el estado de diferenciación de las células multiciliadas? Para responder a esta duda, se realizó una inmunofluorescencia en MTECs para Jam3 y tubulina acetilada a lo largo del proceso de diferenciación cuando las células multiciliadas comienzan a aparecer en nuestro sistema de cultivo ALI (de ALI3 a ALI7) (Panel R6A). La figura R6A' mostró que la tubulina acetilada comienza a acumularse a partir de ALI4 y no se detectó en ALI3. Asimismo, se observó que Jam3 también se acumuló en algunas células en ALI4 y que el número de células marcadas con Jam3 y tubulina acetilada aumentó a lo largo del proceso de diferenciación (Figura R6 panel A'' y cuantificado en R6B). En las imágenes de inmunofluorescencia encontramos células positivas para tubulina acetilada y altos niveles de expresión de Jam3, ocurriendo en la mayoría de las células desde ALI4 hasta ALI 7 (Figura R6B). Sin embargo, también se hallaron células marcadas con tubulina acetilada y con niveles bajos de expresión de Jam3 y células, aunque en baja proporción, marcadas con tubulina acetilada sin Jam3 (Figura R6B).



B	ALI 4	ALI 5	ALI 6	ALI 7
<i>Jam3 + High:</i>	24	76	81	83
<i>Jam3 + Low:</i>	7	17	15	14
<i>Jam3 -:</i>	0	7	4	3
<i>Total Ac. Tub +:</i>	31	100	100	100

Figura R6: Relación de la expresión de Jam3 con el estado de diferenciación de células multiciliadas.

(A) Conjunto de imágenes de microscopía confocal de MTECs a lo largo días de la diferenciación (ALI 3 a ALI7) con Jam3 en rojo (gris en el panel A''), tubulina acetilada en verde (gris en el panel A') y núcleos en azul. (B) Cuantificación de células positivas para tubulina acetilada con niveles de expresión altos para Jam3, niveles bajos de Jam3 o negativos para Jam3 de ALI4 a ALI7. Células sin marcaje para tubulina acetilada o Jam3 se detectan en ALI3. La barra de escala en el panel A representa 10 μ m.

Para conocer aún más la relación de la expresión de Jam3 y el estado de diferenciación de las células multiciliadas, se evaluó la expresión de genes que distinguen entre células deuteromales o células multiciliadas maduras (Bukowy-Bieryłło, 2021) utilizando un conjunto de datos publicados de expresión de una sola célula (Plasschaert et al., 2018). El análisis reveló que las células multiciliadas que no expresan Jam3 mostraron niveles más altos de expresión de marcadores de células deuteromales, mientras que no se observaron diferencias entre las células multiciliadas que son Jam3 positivas o negativas para los marcadores de células multiciliadas maduras (Figura R7). En base a estos datos, se concluyó que la mayoría de las células multiciliadas mostraron expresión de Jam3 y que dicha expresión se estuvo vinculada a células multiciliadas maduras.

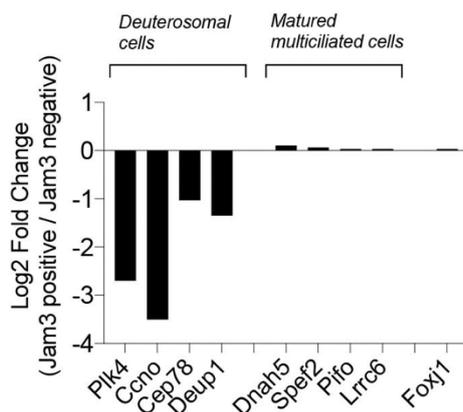


Figura R7: Análisis de la relación de la expresión de Jam3 y el estado de diferenciación de las células multiciliadas. Niveles relativos de expresión génica de células deuterosomales y marcadores de células ciliadas maduras en células con expresión positiva y negativa para Jam3 (todas son células positivas para Foxj1) utilizando datos de expresión de una sola célula (Plasschaert et al., 2018).

1.3. La localización subcelular de Jam3 se encuentra en los endosomas apicales de las células multiciliadas.

Una vez conocida la expresión de Jam3 en las células multiciliadas, quisimos determinar la localización subcelular de Jam3 dentro de estas células. Para ello, se realizó una inmunofluorescencia de Jam3 y ZO-1, una proteína ubicada en la superficie de la membrana citoplasmática de las uniones estrechas intercelulares, en MTECs diferenciadas y se obtuvieron imágenes por microscopía confocal de diferentes planos Z del epitelio (Figura R8A-A'', R8B-B''). El panel A' de la Figura R8 mostró que la localización de Jam3 en las células multiciliadas se encontraba en la parte apical de la célula, no detectándose en la parte distal o a lo largo del lado basolateral de estas células epiteliales. En las uniones célula-célula (flechas blancas en el panel A de la Figura R8), se observaron niveles bajos de expresión de Jam3, sin embargo, se encontró expresión de Jam3 por encima de esas uniones y en los endosomas apicales en la inmunofluorescencia doble de Jam3 y ZO1 (Figura R8, panel B).

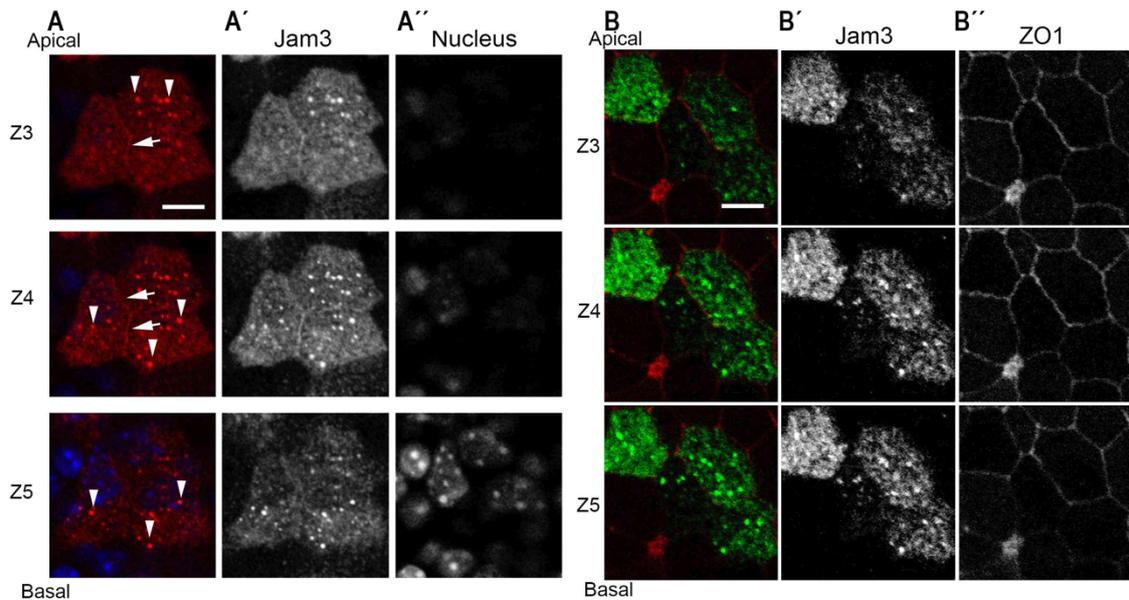


FIGURA R8: Jam3 se localiza en las uniones célula-célula y en los endosomas apicales. (A) Planos Z de microscopía confocal de apical a basal (Z3 a Z5) de Jam3 en células multiciliadas. Las flechas blancas señalan la localización de Jam3 en las uniones celulares, y las puntas de flecha blancas indican la localización de Jam3 en los endosomas apicales. Jam3 en rojo (gris en panel A'), y núcleo en azul (gris en panel A''). (B) Planos Z de microscopía confocal (Z3 a Z5) de co-localización de Jam3 con ZO1 en células multiciliadas. Jam3 en verde (gris en panel B'), y ZO1 en rojo (gris en panel B''). Los planos Z son de 1 µm. La barra de escala en los paneles (A, B) representa 10 µm.

Para comprobar si Jam3 se localiza también en los endosomas apicales en la tráquea completa de ratón se realizó una inmunofluorescencia para Jam3 (Figura R9), que situó a Jam3 en los endosomas de los planos más apicales.

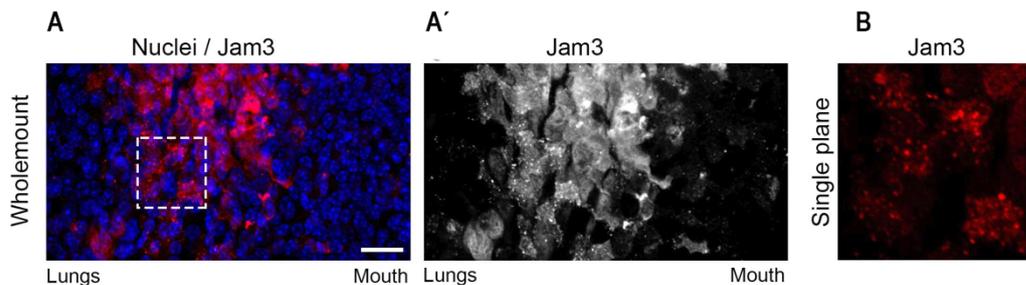


Figura R9: Análisis de la localización subcelular de Jam3 en la tráquea de ratón completa. (A) Inmunofluorescencia en tráquea completa de ratón para Jam3 en rojo (gris en el panel A') y núcleos en azul (B) Aumento de una región de interés del panel (A) que muestra la localización de Jam3 en un grupo de células. La barra de escala en panel D representa 10 µm. El cuadro blanco punteado muestra la región de interés representada en el panel B.

Para confirmar la localización apical de Jam3 en las células multiciliadas, se realizó una inmunofluorescencia que co-localizó Jam3 con un marcador de endosoma apical, EEA1, y un marcador de endosoma de reciclaje, Rab11. La figura R10A' mostró

que la mayoría de los endosomas que expresaron Jam3 eran endosomas apicales marcados con EEA1, mientras que no se encontró co-localización de Jam3 con Rab11 (Figura R10B).

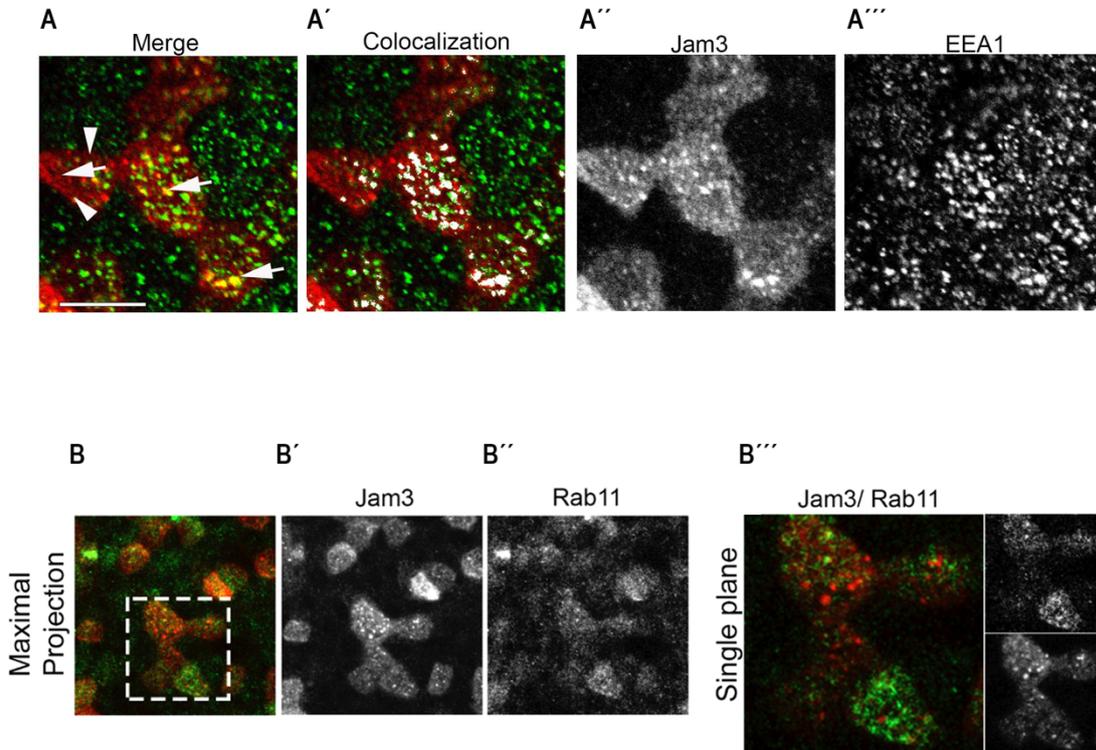


Figura R10: Jam3 co-localiza con EEA1, marcador de endosomas apicales. (A) Plano confocal para Jam3 en rojo (gris en el panel A'') y EEA1 en verde (gris en el panel A'''). Análisis de co-localización de Jam3 y EEA1 (blanco en el panel A'). Las flechas blancas señalan a la co-localización de Jam3 y EEA1 en endosomas y las puntas de flecha blancas indican endosomas que contienen Jam3 que son EEA1 negativos. No todos los endosomas positivos para EEA1 son positivos para Jam3. (B) Inmunofluorescencia de Jam3 en rojo (gris en el panel B') en combinación con Rab11 en verde (gris en el panel B'') en MTECs ALI14. B''' muestra un aumento de una región de interés del panel (B). La barra de escala en el panel A representa 10 μ m. El cuadro blanco punteado muestra la región de interés representada en el panel B'''.

Para acotar aún más la localización de Jam3 en la membrana, se realizó una inmunofluorescencia para Jam3 y Vangl1, una proteína relacionada con la polaridad celular planar situada en las uniones adherentes. Al observar diferentes imágenes en los planos más apicales de MTECs, se observó que Jam3 tiene una localización más apical que Vangl1 (Figura R11).

Todos los datos anteriores en conjunto mostraron que Jam3 se localiza principalmente en los endosomas apicales de las células multiciliadas a nivel de las uniones estrechas, y en las uniones célula-célula de algunas células por encima de Vangl1.

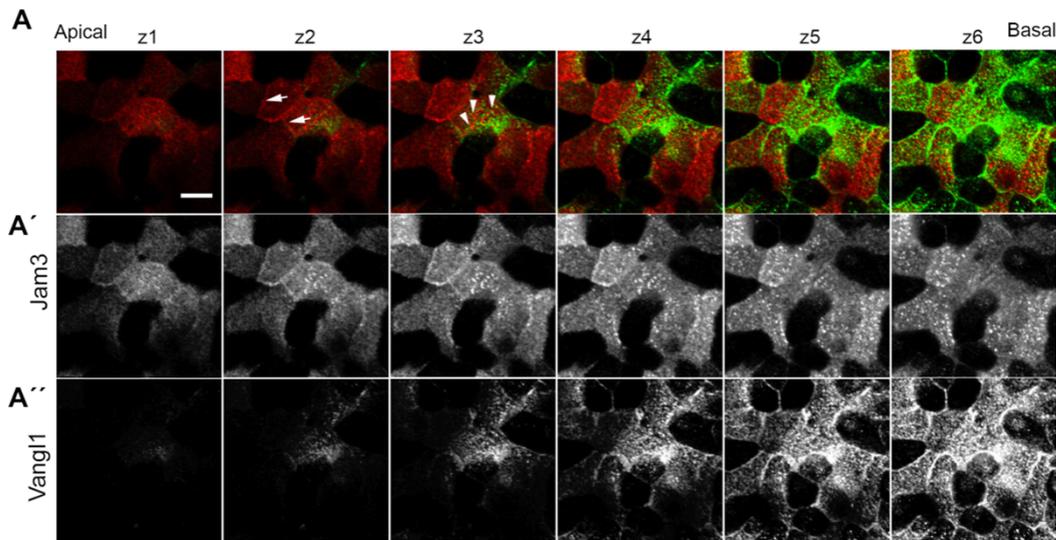


Figura R11: Co-localización de Jam3 y Vangl1 en la membrana. (A) Planos Z confocales (Z1 a Z6) de Jam3 en rojo (gris en A') en co-localización con Vangl1 en verde (gris en A'') en células multiciliadas. Las flechas blancas señalan la localización de Jam3 en las uniones célula-célula que son negativas para Vangl1. Las puntas de flecha blancas indican endosomas que expresan Jam3 y no Vangl1. Los planos Z tienen un tamaño de 1 μ m. La barra de escala representa 10 μ m.

1.4. La disminución de la expresión de Jam3 no alteró la morfología y función de los cilios.

Las MTECs se han utilizado ampliamente para estudiar la biología de las vías respiratorias, incluyendo la diferenciación celular, el funcionamiento de los cilios o la secreción de proteínas, entre otras características. Para evaluar la función de Jam3 en las células multiciliadas del epitelio de las vías respiratorias, se infectaron las células con una combinación de dos shRNA que disminuyeron la expresión de Jam3 en MTECs (Jam3-KD). Como control se infectaron las células con un shRNA contra la luciferasa (*Luc-KD*). La disminución de la expresión de Jam3 se confirmó a nivel de ARN mediante PCR cuantitativa (Figura R12 panel A) y a nivel de proteína por inmunofluorescencia (Figura R12D y R12E) en MTECs diferenciadas durante 14 días.

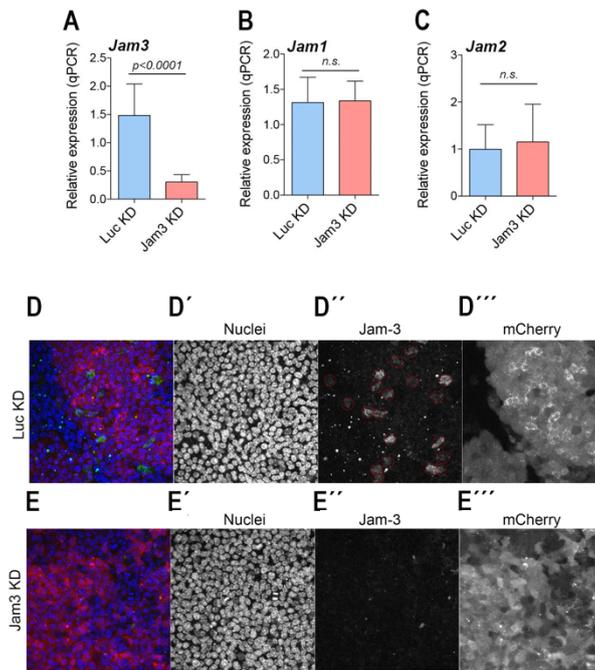


Figura R12: Análisis de la disminución de expresión de Jam3 en MTECs. (A–C) Niveles de expresión de ARNm de Jam3 (A), Jam1 (B) y Jam2 (C) en MTECs diferenciadas infectadas con virus control (Luc KD) o Jam3-shRNA (Jam3 KD), $n = 3$. (D, E) Imágenes de inmunofluorescencia para Jam3 en verde (gris en D'' y E'') en MTECs infectadas en rojo (gris en D''' y E'''), con shRNA contra luciferasa (Luc KD) (D) y Jam3 (Jam3 KD) (E).

Además, se analizó la expresión de Jam1 y Jam2 en condiciones de *Jam3-KD* en comparación con Luc-KD y se obtuvo que la disminución de la expresión de Jam3 no afecta la expresión de las otras dos moléculas de las uniones estrechas (Figura R12, panel B y C).

Una vez conocida la localización celular y subcelular de Jam3 en las células multiciliadas, se examinó la morfología de los cilios por microscopía electrónica de barrido (SEM). La figura R13 mostró que no se detectaron defectos en la morfología en los cilios en células Jam3-KD cuando se comparan con células Luc-KD. Así mismo, se observó que el tamaño y número de cilios son similares en la membrana apical de las MTECs tanto en células Jam3-KD como Luc-KD.

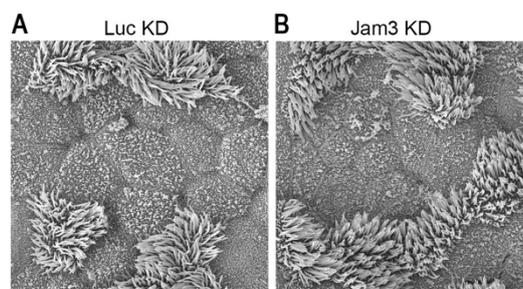


Figura R13: Análisis de la morfología de los cilios en ausencia de la expresión de Jam3. (A, B) Imágenes de microscopía electrónica de barrido de Jam3-KD y Luc KD en MTECs diferenciadas durante

14 días.

Sabiendo que la morfología de los cilios en las células multiciliadas no se vio alterada en células que tienen disminuida la expresión de Jam3, se quiso comprobar si esta expresión reducida de Jam3 alteraba la estructura de los cilios. Para ello, se realizó una inmunofluorescencia para tubulina acetilada y ZO-1, en la que no se encontraron diferencias entre la condición control y Jam3-KD (Figura R14, paneles A y B).

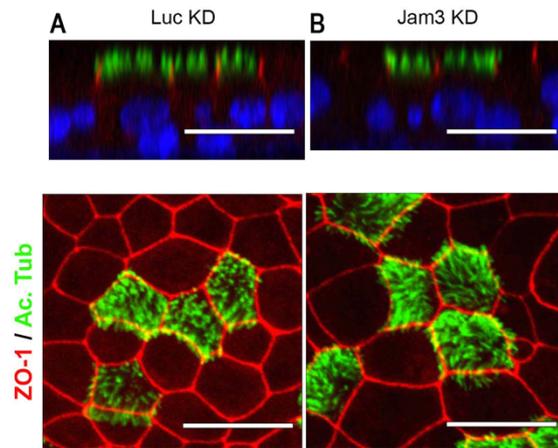


Figura R14: La disminución de la expresión de Jam3 no altera la estructura de los cilios. (A, B) Vistas lateral y superior de imágenes de microscopia confocal para tubulina acetilada (en verde), ZO-1 (en rojo) y núcleo (en azul) en Jam3-KD (B, B') y Luc KD (A, A') en MTECs. La barra de escala en los paneles (A, B) representa 20 μm .

Los experimentos anteriores mostraron que la estructura, la morfología o el número de cilios no se vieron afectados por la disminución de la expresión de Jam3. El siguiente interrogante fue si la funcionalidad de los cilios se había perdido o se conservó tras la reducción de la expresión de Jam3. Para conocer qué papel desempeñaba Jam3 en el funcionamiento de los cilios se llevó a cabo un ensayo que midió el batido de estos. Este experimento consistió en la adición de bolas magnéticas en la cámara superior de los *transwells* donde estaban las células diferenciadas, que se adherieron a la membrana apical. Las bolas se grabaron fácilmente con una cámara a velocidad lenta, debido a su color y tamaño (Figura R15A-C). En la figura R15D, no se observan diferencias en el batido de los cilios entre la condición control y Jam3-KD.

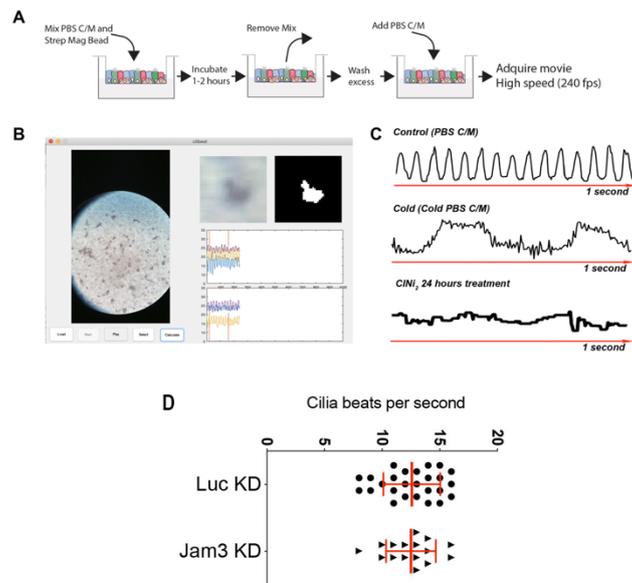


FIGURA R15: Medida del batido de los cilios en MTECs que tienen reducida la expresión de Jam3. (A) Esquema del ensayo desarrollado para medir la frecuencia de batido de los cilios descrito en Materiales y Métodos. (B) Imagen del programa desarrollado para medir el batido de los cilios. (C) Representación de las ondas de los cilios batiendo en un segundo en diferentes condiciones experimentales. (D) Cuantificación de la frecuencia de batidos de los cilios en número de latidos por segundo en MTECs tratadas con Luc KD y Jam3 KD.

A continuación, se analizó la distribución de los cuerpos basales en las células multiciliadas en MTECs control y Jam3-KD mediante una inmunofluorescencia de centriolina, un marcador característico de cuerpos basales de los cilios (Figura R16 paneles A-B). Tomando de referencia el análisis realizado por Herawati *et al.* (Herawati *et al.*, 2016), se diferenció entre cuerpos basales alineados y no alineados a lo largo de la diferenciación de células multiciliadas, y se cuantificó la alineación de cuerpos basales en células multiciliadas individuales utilizando la excentricidad y la relación del eje mayor/menor (relación Mm) de estos cuerpos (Figura R16 paneles C-D). Los resultados mostraron que los cuerpos basales de las células control se distribuyeron en filas largas bien alineadas en más del 40 % de las células; sin embargo, en la mayoría de las células Jam3-KD se observó la disposición de los cuerpos basales en filas cortas y además, la mayoría de las células que tenían reducidas la expresión de Jam3 presentaron un acortamientos de los cuerpos basales.

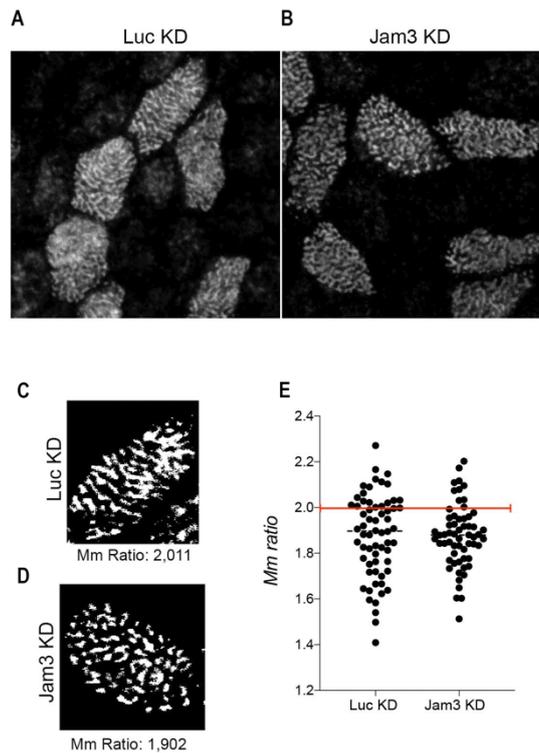


FIGURA R16: Análisis de la alineación de los cuerpos basales en células multiciliadas individuales. (A, B) Inmunofluorescencia para centriolina que marca cuerpos basales en células de control (A) y Jam3 KD (B). (C, D) Imagen en blanco y negro obtenida para calcular la relación Mm en una célula control (C) y una célula Jam3 KD (D). (E) Cuantificación de la relación Mm para células individuales. $n > 60$ en condiciones control y Jam3 KD.

Además, se analizó el estado de los microtúbulos de los cilios mediante una tinción con faloidina de los filamentos de actina y no se encontraron diferencias entre células control y Jam3 KD (Figura R17), concluyendo que la alteración en la distribución de los cuerpos basales en células Jam3 KD no depende del citoesqueleto.

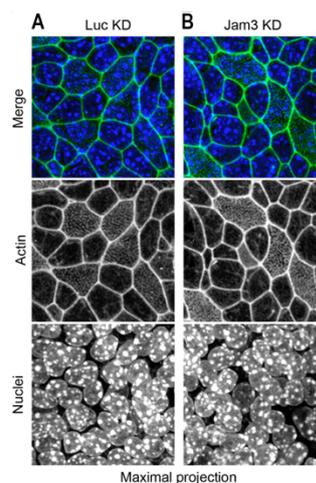


Figura R17: Estudio de la estructura de los microtúbulos en MTECs (A-B) Tinción de los filamentos de actina con faloidina en células de control (Luc KD) y Jam3 KD.

Los datos obtenidos con el análisis de la distribución de cuerpos basales de los cilios junto con la expresión de marcadores de células deuterosomales en células Jam3-KD, nos sugirieron que Jam3 podría estar implicado en la migración de los cuerpos basales. Para probar esta hipótesis, se realizó una inmunofluorescencia con centriolina a lo largo de los primeros días de la diferenciación (ALI4-ALI6) en células control y Jam3-KD (Figura R18 panel A-B). Utilizando la clasificación de Usami et al. (Usami et al., 2021) de las células multiciliadas durante la diferenciación, podemos diferenciarlas en diferentes etapas, la etapa I de diferenciación con la presencia de un par de centriolos, la etapa II/III que implica la aparición de muchos centriolos agregados y migrando, y la etapa IV/V que cuenta con numerosos centriolos homogéneamente distribuidos en la membrana apical. La figura R18 C mostró un retraso significativo en las células Jam3 KD en la maduración de las células multiciliadas ya que solo el 10% de estas células estaban en la etapa IV/V en ALI 5 en comparación al 70 % en las células de control. Esta diferencia es menor evidente en ALI 4 y ALI 6.

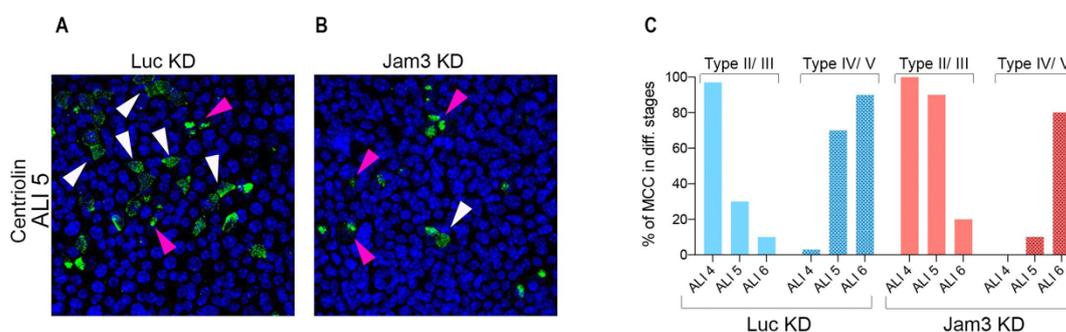


Figura R18: Categorización del estado de diferenciación de las células multiciliadas en células control y Jam3 KD. (A, B) Inmunofluorescencia de centriolina en células de control (Luc KD) y Jam3-KD en ALI 5. (C) Cuantificación de células multiciliadas en las diferentes etapas de diferenciación en células control y Jam3 KD. Las células en la etapa II/III se indican con puntas de flecha rosas mientras que las del tipo IV/V se señalan con puntas de flecha blancas.

Todos estos resultados nos sugieren que la disminución de la expresión de Jam3 en MTECs no afecta a la morfología o la funcionalidad de los cilios en las células multiciliadas, pero sí a la distribución de los cuerpos basales de estos y al estado de maduración de las células multiciliadas.

1.5. La disminución de la expresión de Jam3 en el epitelio de las vías respiratorias no afecta a la integridad del epitelio

Como se ha comentado en la introducción, el papel de las moléculas de adhesión de la unión, Jam1, Jam2 y Jam3, en las células epiteliales está relacionado principalmente con la función de barrera epitelial. Partiendo de este dato, se examinó la función de Jam3 en el estado de la monocapa del epitelio de las vías respiratorias del

ratón, aunque su expresión está restringida mayormente en los endosomas de las células multiciliadas. Para ello, se analizó la integridad del epitelio mediante un ensayo de permeabilidad que consistió en la biotilación de células control y Jam3-KD. En este experimento se observó que tanto en células Jam3-KD como control, las proteínas biotiniladas en la membrana plasmática marcadas con Estreptavidina-555 estaba restringido a la membrana apical (Figura R18 paneles A y B), concluyendo que en ausencia de Jam3, el epitelio de las vías respiratorias sigue formando una monocapa continua que no pudo ser traspasada por la biotina.

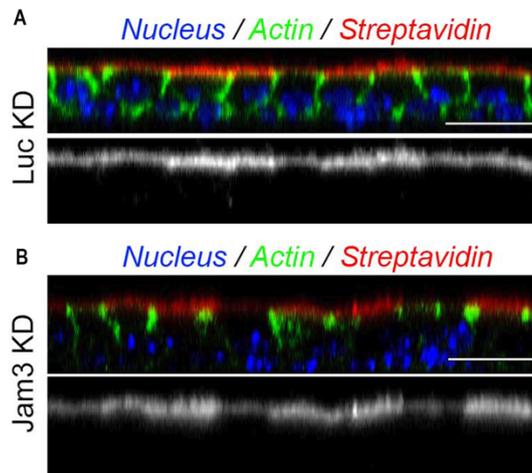


Figura R19: Estudio de la permeabilidad del epitelio de las vías respiratorias en ausencia de Jam3. (A, B). Imágenes de microscopia confocal en plano ortogonal de células control (A) y Jam3 KD (B). Estreptavidina Alexa 555 (en rojo) solo se observa en la membrana apical. Faloidina (en verde) para marcar la actina en la superficie apical y basolateral y Dapi (en azul) para el núcleo. La barra de escala en los paneles (A–B) representa 20 μm .

Para caracterizar aún más la monocapa del epitelio de las vías respiratorias, se realizó una inmunofluorescencia con ZO-1 para analizar el tamaño y el empaquetamiento celular, así como el reclutamiento de ZO-1 en las uniones celulares en ausencia de Jam3 (Figura R20A-D). Los resultados no mostraron cambios significativos en el tamaño y la forma celular en las células Jam3-KD en comparación con las células Luc-KD, no viéndose afectada la integridad epitelial al disminuir la expresión de Jam3.

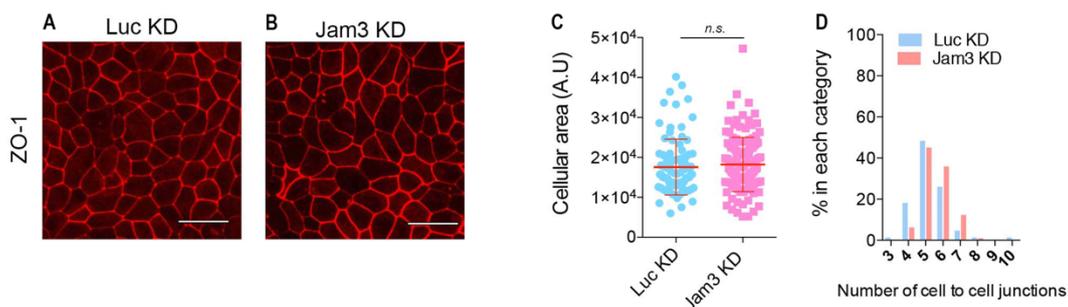


Figura R20: La disminución de la expresión de Jam3 no afecta a la integridad del epitelio. (A, B) Imágenes confocales de ZO-1 en células control (A) y Jam3 KD (B). (C, D) Análisis del tamaño celular (C) y el número de uniones célula-célula (D) de imágenes confocales de ZO-1 en células control y Jam3 KD. La barra de escala en los paneles (A–B) representa 20 μm . Los valores de p en todas las condiciones se obtuvieron utilizando la prueba *t*.

A continuación, se comprobó la permeabilidad a los iones de las uniones estrechas en la monocapa midiendo la resistencia transepitelial (TEER) antes de la diferenciación y durante el proceso de diferenciación de MTECs en células control y Jam3-KD. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en los valores de TEER en células Jam3-KD y Luc-KD durante el proceso de diferenciación de ALI0 a ALI14 (Figura R21), aunque las células Jam3-KD presentaron un TEER ligeramente más alto en comparación con las células control. También, se detectó que la monocapa de las vías respiratorias durante la expansión en células Jam3 KD muestran un ligero retraso a la hora de alcanzar la resistencia transepitelial máxima. Las mediciones de TEER en el día 2 y 4 durante la expansión fueron significativamente más bajas en las células Jam3-KD en comparación con las células Luc-KD.

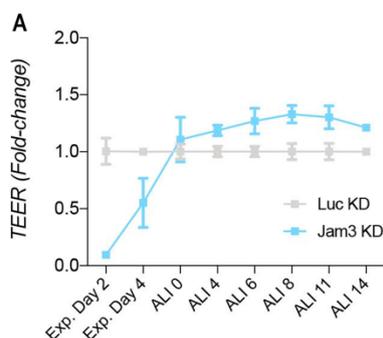


Figura R21: Estudio de la resistencia transepitelial en células control y Jam3-KD. (A) Medida de resistencia transepitelial (TEER) para probar la permeabilidad de la unión estrecha durante el proceso de diferenciación de MTECs Jam3-KD en comparación con las células Luc-KD.

Además, para seguir analizando la permeabilidad del epitelio de las vías respiratorias en células Jam3-KD, se realizó una inmunofluorescencia de moléculas de adhesión como E-cadherina o ZO-1. Los resultados no mostraron diferencias importantes en los cultivos control (Figura R22A) durante la expansión frente a las células Jam3-KD (Figura R22B).

Todos estos datos sugieren que la integridad epitelial de las células Jam3-KD epiteliales de las vías respiratorias diferenciadas no se ve gravemente comprometida.

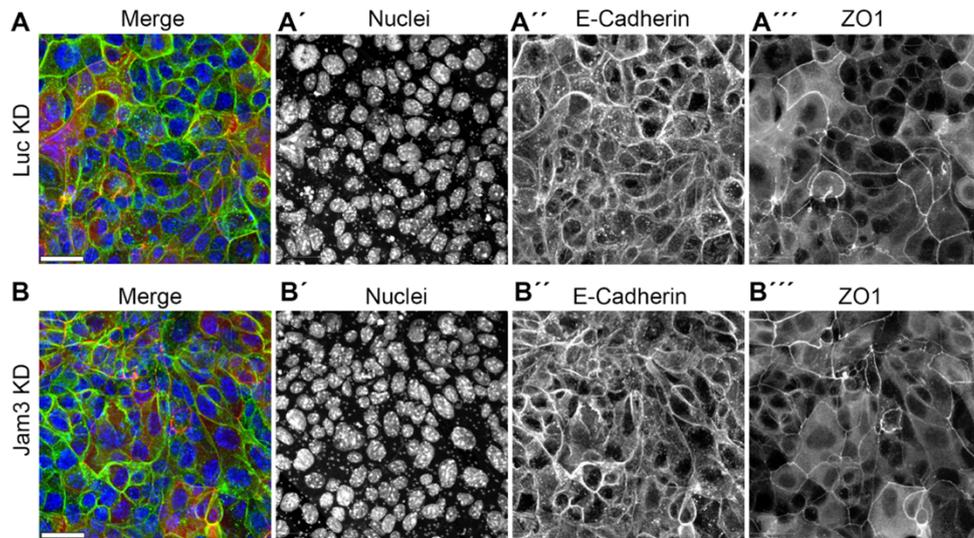


Figura R22: Marcate de moléculas de adhesión celular en células control y Jam3 KD. (A) Imagen confocal en etapa pre-ALI para ZO-1 en rojo (gris en A'''), E-cadherina en verde (gris en A'') y núcleo en azul (A') en células control. (B) Imagen confocal en etapa pre-ALI para ZO-1 en rojo (gris en B'''), E-cadherina en verde (gris en B'') y núcleo en azul (B') en células Jam3 KD. Barra de escala en A y B representa 30µm.

1.6. La expresión de Jam3 disminuye a lo largo de la diferenciación de las células epiteliales de las vías respiratorias.

Para conocer cómo varía Jam3 a lo largo del proceso de diferenciación en MTECs, se midió la expresión de Jam3 por PCR cuantitativa desde ALI0 a ALI14 (Figuras R23 panel D), así como la expresión de Jam1 (Figuras R23 panel E) y Jam2 (Figuras R23 panel F) y los marcadores de los tres tipos celulares principales del epitelio para comprobar que la diferenciación se produjo correctamente (Figuras R23A-C). En análisis por PCR cuantitativa para los marcadores de los tipos celulares mostró un alto nivel de expresión para Krt5 en ALI0, no detectándose expresión para Scgb1a1 o Foxj1. A medida que el epitelio se fue diferenciando, la expresión de Krt5 disminuyó de forma drástica mientras que la expresión de Foxj1 y Scgb1a1 aumentó progresivamente de ALI4 a ALI14. Sin embargo, el análisis de la expresión de las moléculas de adhesión durante la diferenciación señaló una expresión elevada de Jam3 en ALI0, mientras que se produjo un descenso de esta a lo largo de la diferenciación. Jam1 presentó una expresión similar a la obtenida con Jam3 (Figura R23E) y Jam2 mostró un aumento de la expresión a lo largo del proceso de diferenciación, obteniendo su máxima expresión en ALI14 (Figura R23F).

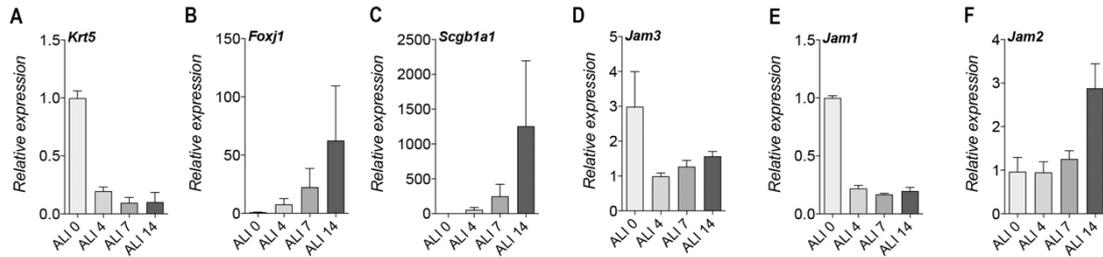


FIGURA R23: Análisis de la expresión de Jam 3 a lo largo del proceso de diferenciación. (A–C) Cuantificación de la expresión de ARNm de Krt5 (marcador basal, A), FoxJ1 (marcador de células multiciliadas, B) y expresión de Scgb1a1 (marcador de células secretoras, C) en ALI 0, ALI 4, ALI 7 y ALI14. (D–F) Cuantificación de la expresión de ARNm de Jam1 (E), Jam2 (F) y Jam3 (D) en ALI 0, ALI 4, ALI 7 y ALI14. n = 4.

Para comprobar el patrón de expresión de Jam3 obtenido por PCR cuantitativa, se realizó una inmunofluorescencia de Jam3 en ALI0 (Figura R24), confirmando que antes del proceso de diferenciación celular se detectó expresión de Jam3 en las células basales de la monocapa, localizado principalmente en la membrana plasmática en los contactos célula-célula. Este resultado coincidió con los obtenidos por qPCR y las mediciones de TEER, donde la expresión de Jam3 fue alta en ALI0.

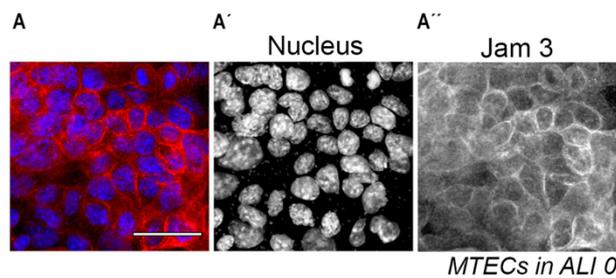


Figura R24: Jam3 se expresa en las células basales de la monocapa en ALI0. (A) Inmunofluorescencia de Jam3 en células basales en ALI0, núcleo en azul (gris en el panel A') y Jam3 en rojo (gris en el panel A''). La barra de escala en el panel A representa 20 μ m.

El cambio de expresión de Jam3 durante la diferenciación y su presencia en las células multiciliadas, nos hizo preguntarnos si Jam3 podría estar implicada en la diferenciación de células basales a multiciliadas. Para ello, se diferenciaron células Jam3 KD y Luc KD y se compró la expresión de los marcadores de los tres tipos celulares principales del epitelio, y se observó que la disminución de la expresión de Jam3 no produce cambios significativos en la expresión de Foxj1 (Figuras R25 panel A), Scgb1a1 (Figuras R25 panel A') o Krt5 (Figuras R25 panel A''). en comparación con la condición control. Estos datos demostraron que Jam3 no estaba involucrado en el proceso de diferenciación de células basales a multiciliadas.

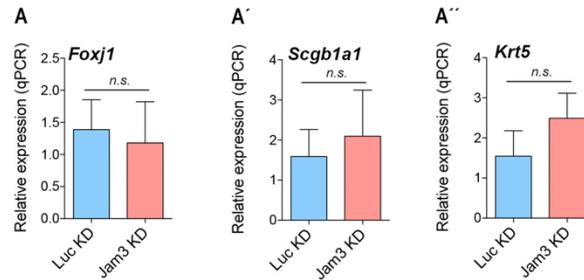


Figura R25: Estudio de la implicación de Jam3 en el proceso de diferenciación. (A-A'') Niveles de expresión de ARNm de Krt5 (A''), FoxJ1 (A) y Scgb1a1 (A') en células control y Jam3 KD. n = 4. p valor se obtiene utilizando t test.

Para confirmar los datos anteriores a nivel de proteínas, se realizaron inmunofluorescencias de FoxJ1 en células control (Figura R26 panel A) y Jam3-KD (Figura R26 panel B) a lo largo del proceso de diferenciación y se cuantificó el número de células positivas para Foxj1 durante la diferenciación (Figura R26 panel C). La cuantificación no mostró diferencias importantes en el número de células multiciliadas de ALI7 a ALI17 en células Jam3-KD al compararlas con las células control de ALI7 a ALI17.

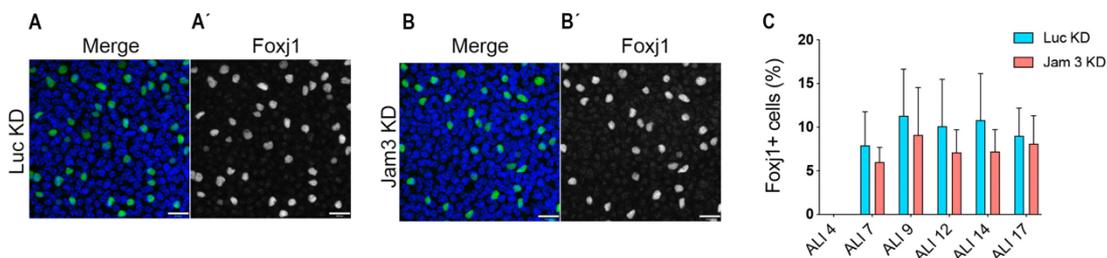


Figura R26: Cuantificación de células multiciliadas en células Luc-KD y Jam3-KD a lo largo del proceso de diferenciación. (A, B) Imágenes confocales para Foxj1 (verde en los paneles A, B y gris en los paneles A',B') en células Luc KD (A) o Jam3 KD (B) en ALI14. (C) Cuantificación relativa de células positivas para Foxj1 a lo largo del proceso de diferenciación en células control y Jam3 KD de ALI 4 a ALI 17. La barra de escala en los paneles (A, B) representa 20 μ m.

A medida que el epitelio se iba diferenciando, como hemos comentado anteriormente, Jam3 disminuyó su expresión, sin embargo, en la figura R23 panel F observamos que la expresión de Jam2 aumenta notablemente a lo largo de la diferenciación y se planteó la hipótesis de que Jam2 podría compensar esta disminución de la expresión de Jam3. Partiendo de esta premisa, se infectaron MTECs con *shRNA* para Jam2 y *shRNA* para Jam2 (células Jam2-KD) en combinación con los *shRNA* de Jam3 (células Jam2-KD/Jam3-KD). Los resultados mostraron que las células Jam2 KD o Jam2 KD/Jam3 KD no variaron significativamente la expresión de Jam1 (Figura R27C), pero sí disminuyeron la expresión de Jam2 y Jam3 confirmando la correcta funcionalidad de los *shRNA*. De forma similar a lo que ocurrió con las células Jam3-KD durante la diferenciación, la disminución de la expresión de Jam2 o Jam2/Jam3 no

afectó a la diferenciación de células basales ya que no se encontraron cambios significativos en la expresión de Krt5 (Figura R27 panel G), Foxj1 (Figuras R27 panel D) o Scgb1a1 (Figuras R27 panel F). Por lo tanto, estos resultados señalaron que ni Jam3 ni Jam2 estaban relacionados con la diferenciación de células basales a células multiciliadas a pesar de que su expresión varió a lo largo del proceso de diferenciación.

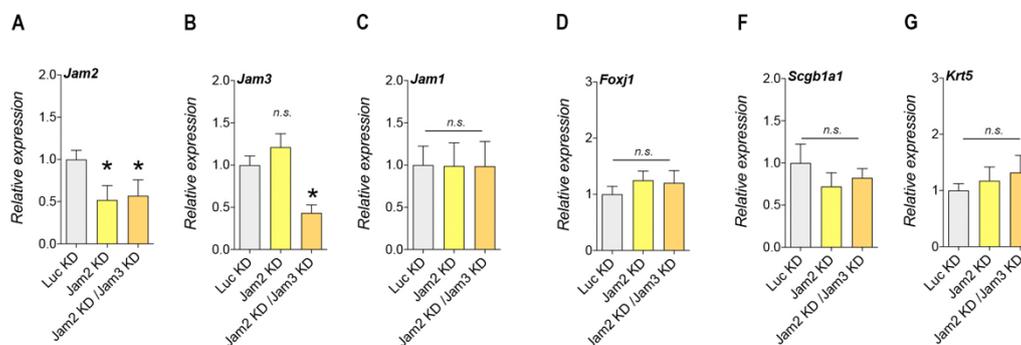


Figura R27: Análisis del efecto de la disminución de expresión de Jam2 y Jam2/Jam3 en la diferenciación del epitelio respiratorio. (A-G) Niveles de expresión de ARNm de Jam2 (A), Jam3 (B), Jam1 (C), Foxj1 (D), Scgb1a1 (F) y Krt5 (G) en MTECs diferenciados para Luc KD, Jam2 KD y Jam2/Jam3 KD. n = 4. p valor se obtiene utilizando t test. * p < 0,05

1.7. El tratamiento con IL6 en MTECs aumenta la expresión de Jam3, pero no cambia su localización subcelular.

Con los resultados anteriores que mostraron que Jam3 se restringió a células multiciliadas del epitelio respiratorio *in vivo e in vitro* y que el número de células multiciliadas no varía con la expresión de Jam3, nos planteamos si la expresión o la localización de Jam3 podría modularse por o en las células multiciliadas. Para ello, se trataron MTECs en el proceso de diferenciación con DAPT, un fármaco que inhibe la ruta de señalización de Notch (Pardo-Saganta et al., 2015) y se analizó por PCR cuantitativa la expresión de los marcadores de los tres tipos celulares del epitelio. Los datos mostraron un aumento de la expresión de Krt5 (Figuras R28 panel A) y Foxj1 (Figuras R28 panel B), marcadores de células basales y multiciliadas respectivamente, no detectándose expresión de Scgb1a1 (Figuras R28 panel C), marcador de células secretoras. Por lo tanto, la inhibición de Notch alteró la diferenciación de MTECs promoviendo la diferenciación de células multiciliadas y suprimiendo las células secretoras.

Además, se observó un aumento de expresión de Jam3 (Figura R28 panel E) y Jam1 (Figura R28 panel D) así como una disminución de la expresión de Jam2 (Figura R28 panel F) en las células tratadas con DAPT. Estos datos apoyaron que la expresión de Jam3 estaba relacionada con células multiciliadas y que la expresión Jam2 podría estar vinculada con células secretoras.

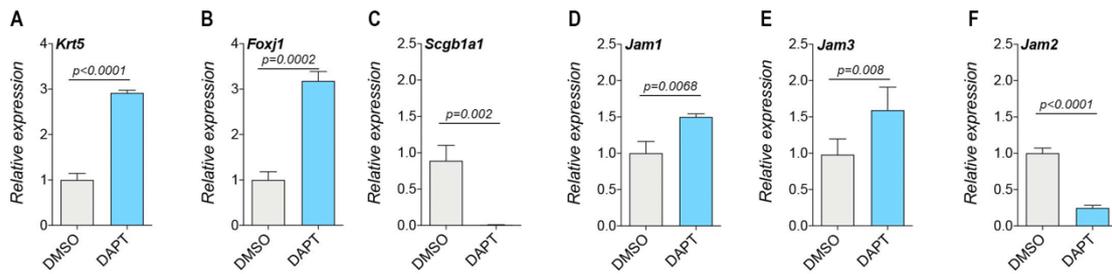


Figura R28: Análisis por PCR cuantitativa del efecto del tratamiento con DAPT en el proceso de diferenciación en MTECs. (A–F) Niveles de expresión de ARNm de Krt5 (A), Foxj1 (B) y Scgb1a1 (C), Jam1 (D), Jam3 (E) y Jam2 (F) en MTECs tratadas con DMSO o DAPT durante 14 días. p valor se obtiene utilizando t test.

Como se comentó en el apartado 2.1.2 de la Introducción, la expresión de Jam3 puede ser modulada por la respuesta inflamatoria. La interleuquina-6 (IL6) es una citoquina proinflamatoria relacionada con el tráfico de neutrófilos durante la respuesta inflamatoria, en el cual también se ha visto implicado Jam3 (McLoughlin et al., 2003). La ruta de señalización de IL6 limita el reclutamiento de neutrófilos, observándose que los ratones *knockout* para Jam3 presentaron una acumulación anómala de neutrófilos en los pulmones (Imhof et al., 2007; Fielding et al., 2008). Adicionalmente, IL6 puede modular la cantidad de células multiciliadas en el epitelio de las vías respiratorias humanas y de ratón (Tadokoro et al., 2014).

Basándonos en la literatura anterior, se comprobó si la expresión y la localización de Jam3 puede modularse a través de IL6 observando cómo varían los niveles de expresión tras el tratamiento con esta citoquina. En la figura R29 panel B, el análisis por PCR cuantitativa mostró que IL6 aumenta la cantidad de células multiciliadas en ALI14, presentando una mayor expresión de Foxj1, mientras que los cambios en los niveles de expresión de Krt5 (Figura R29 panel A) y Scgb1a1 (Figura R29 panel C) no fueron relevantes. Además, se encontró que la expresión de Jam3 también aumenta al tratar las células con IL-6 durante el proceso de diferenciación (Figuras R29 panel E), al igual que la expresión de Jam1 (Figuras R29 panel D). La expresión de Jam2 (Figuras R29 panel F) por el contrario disminuyó drásticamente.

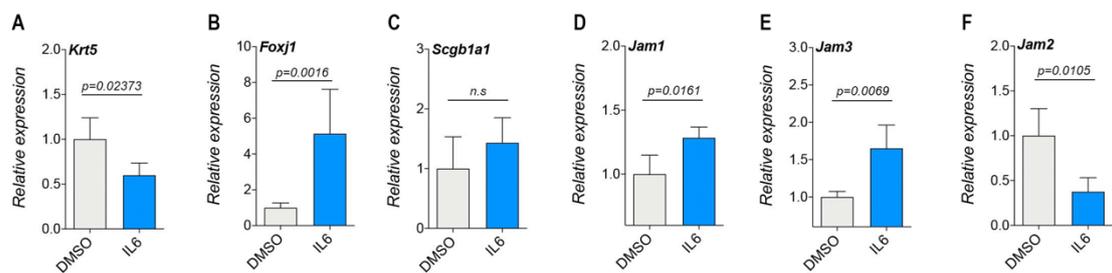


Figura R29: Análisis por PCR cuantitativa del efecto del tratamiento con IL6 en el proceso de diferenciación. (A-F) Niveles de expresión de ARNm de Krt5 (A), Foxj1 (B) y club (C) Jam1 (D), Jam3 (E) y Jam2 (F) en MTECs tratadas con DMSO o IL6 durante 14 días. n = 4. p valor se obtiene utilizando t test.

Para estudiar el cambio de localización subcelular de Jam3 en las células multiciliadas tratadas con IL-6, se realizó una inmunofluorescencia para Jam3 y faloidina, marcando los filamentos de actina de la membrana. Las imágenes de microscopía confocal no mostraron una localización subcelular diferente de Jam3 (Figuras R30 panel B) en las células tratadas con IL6 en comparación con el control (Figuras R30 panel A). Con estos datos se demostró que la expresión de Jam3, pero no su localización subcelular, puede regularse por IL6 ya que aumentó el número de células multiciliadas en el epitelio de las vías respiratorias.

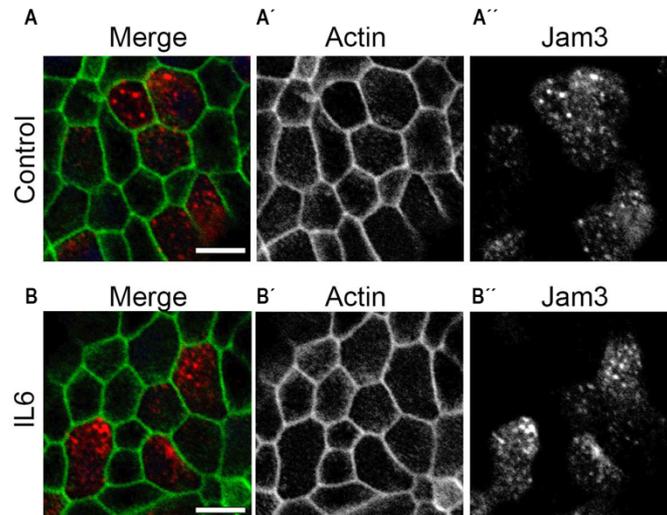


Figura R30: Inmunofluorescencia para Jam3 en células tratadas con IL-6 (A-B) Imágenes de microscopía confocal de Jam3 en MTECs tratadas durante 14 días con DMSO (A) o IL6 (B). La membrana celular se marca con actina en verde (gris en los paneles A', B') y Jam3 en rojo (gris en paneles A'', B''). Barra de escala en paneles (A, B) representa 20 μ m.

Por otro lado, en la literatura señaló que se podía movilizar Jam3 desde los endosomas hacia la membrana plasmática en las células endoteliales cuando se trataban con histamina o VEGF en tiempos cortos de exposición (Orlova et al., 2006; Kostelnik et al., 2019). Para comprobar si Jam3 se movilizaba de los endosomas a la membrana en células multiciliadas se trataron las células con histamina 50 μ M (Figura R31 panel B) e histamina 100 μ M (Figura R31 panel C) durante una hora. Los resultados mostraron que no había cambio en la localización subcelular de jam3 en ninguna de las condiciones cuando se comparan con el control (Figuras R31 panel A). Por lo tanto, a diferencia de las células endoteliales, la histamina no movilizó Jam3 desde los

endosomas hacia la membrana plasmática.

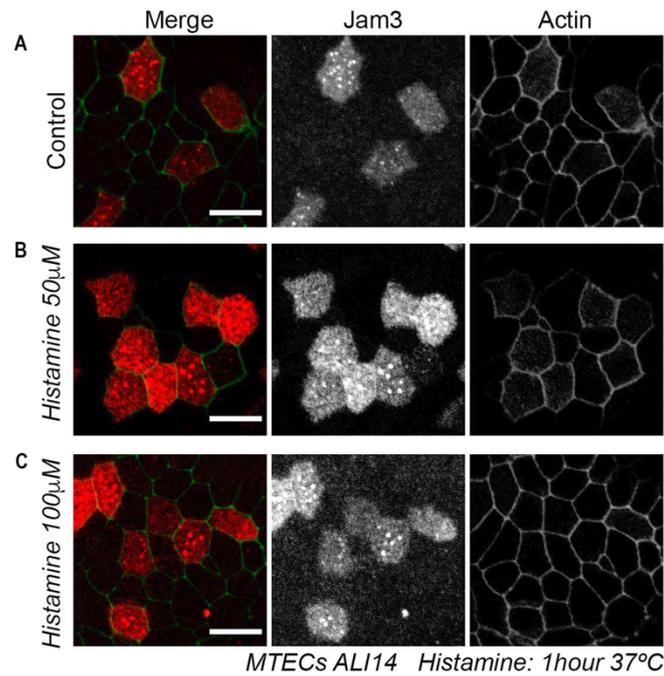


Figura R31: Inmunofluorescencia para estudiar la movilización de Jam3. en células tratadas con histamina. (A-C) Imágenes de microscopía confocal de Jam3 y faloidina en MTECs tratadas durante 1 h con PBS (A) y con histamina 50uM(B) e histamina 100uM(C). Barra de escala en paneles (A-C) representa 20 µm.

Los resultados obtenidos en este capítulo ponen de manifiesto que Jam3 podría ser un buen gen candidato para el estudio de la biología del epitelio respiratorio y el proceso de diferenciación celular a células multiciliadas ya que, aunque no está implicada en la ruta de diferenciación de células basales a secretoras y multiciliadas, se encarga de regular la alineación de los cuerpos basales de los cilios y el estado de maduración en células multiciliadas. También ayudan a determinar el posicionamiento apical en las células multiciliadas.

DISCUSION CAPITULO I

DISCUSIÓN CAPÍTULO I

Los estudios de genes candidatos se centran en un conjunto de marcadores de un gen o un grupo de genes que se cree que está relacionado con un fenotipo determinado. Debido a su ubicación genómica o su función en la aparición de este fenotipo lo convierte en un candidato para estudios adicionales.

Se han realizado estudios iniciales sobre la expresión distal/apical de las proteínas de unión estrecha a lo largo del tracto respiratorio. Por ejemplo, la expresión de claudinas varía a lo largo del epitelio, y la sección proximal expresa Cldn- 1, 3, 4, 5, 7, 10 y 18-1 y la sección distal Cldn- 3, 4, 7, 8, 15 y 18-1 (Günzel & Yu, 2013). Cómo todos esos patrones de localización contribuyen a la fisiología del tracto respiratorio se requieren análisis detallados de cada una de esas proteínas. Los ratones *knockout* para Jam3 mueren en su mayoría debido a una disfunción respiratoria, sin embargo, la localización y la función celular en el epitelio de las vías respiratorias seguía siendo desconocida. En esta tesis hemos clasificado a Jam3 como una proteína que solo se expresa en células multiciliadas en el epitelio de las vías respiratorias del ratón sin efecto sobre la diferenciación de las células basales, la integridad epitelial o defectos importantes de los cilios. También se describe que la proteína Jam3 es una proteína que actúa de forma temprana en el establecimiento de monocapa para permitir la formación adecuada de uniones estrechas, pero más adelante, la función Jam3 se restringe a células multiciliadas maduras, encontrándose principalmente en la membrana apical de los endosomas.

La molécula de adhesión de unión 3 se conoce como una proteína basolateral en las células epiteliales, sin embargo, en esta tesis situamos a Jam3 en una localización apical en endosomas de clasificación apical. Anteriormente, Jam3 también estaba ubicado en otros lugares subcelulares como en los contactos de células germinales y células de Sertoli, situándose en las placas de unión (Gliki et al., 2004; Cartier-Michaud et al., 2017). En estas placas de unión, Jam3 está involucrado en el acrosoma y polaridad celular de las células germinales (Gliki et al., 2004; Pellegrini et al., 2011; Cartier-Michaud et al., 2017). La inesperada localización apical en de Jam3 en las células multiciliadas de las vías respiratorias también fue previamente documentado en el túbulo proximal del riñón, donde la ausencia de un adaptador de clatrina específico, AP1B, resultó tener una localización apical en esas células epiteliales (Schreiner et al., 2010). En células epiteliales del túbulo proximal, el papel de Jam3 en la membrana apical permanece desconocido. También es cierto que no es la única proteína de unión estrecha "fuera de lugar" en la membrana apical del epitelio de una célula. Anteriormente, se ha identificado que la proteína CAR también estaba localizada

en la membrana apical en un mecanismo dependiente de AP1B. Pero de nuevo se desconoce porqué algunas células tienen CAR en su membrana apical (Diaz et al., 2009; Carvajal-Gonzalez et al., 2012; Gravotta et al., 2012). En esta tesis, encontramos que una parte de las proteínas Jam3 se ubican intracelularmente en endosomas de clasificación apical y no en la membrana basolateral o uniones estrechas. Una posible explicación es que Jam3 ubicado en los endosomas regule el transporte de ciertas proteínas de carga que necesitan ser entregadas a la membrana plasmática apical o incluso a los cilios. Otra posible función podría ser que Jam3 regula la asociación de diferentes proteínas a endosomas de clasificación apical como GTPasas, RhoD o RhoB, que pueden regular el citoesqueleto (Fernandez- Borja et al., 2005; Nehru et al., 2013). Este último escenario parece poco probable ya que no detectamos defectos de actina o tubulina en células KD para Jam3 en estado estacionario. Será necesario seguir trabajando para responder cómo y por qué Jam3 alcanzó esta clasificación apical endosoma y también cómo Jam3 afecta al ensamblaje y la distribución de los cuerpos basales actuando desde los endosomas.

Los resultados en la tesis utilizando células Jam3-KD no mostraron un fenotipo relacionado con la ciliogénesis. No encontramos un cambio en la morfología, número o frecuencia de batido de los cilios. Sin embargo, sí que se encontró un defecto en el patrón de distribución de los cuerpos basales de los cilios en ausencia de Jam3, correlacionándose con un retraso en el ensamblaje/posicionamiento de los cuerpos basales en las células multiciliadas. Una distribución adecuada del cuerpo basal en la membrana apical de las células multiciliadas es la responsable de hacer que los cilios batan en la misma dirección (Carvajal-Gonzalez et al., 2016a; Adler y Wallingford, 2017; Román et al., 2019). Además de esto, no encontramos una distribución polarizada de Jam3 ni la co-localización con un componente central de polaridad celular planar como es Vangl1. En resumen, en este capítulo hemos llegado a la conclusión de que Jam3 en células multiciliadas en estado maduro podría ser necesario para la distribución adecuada de cuerpos basales en células individuales sin efecto en la coordinación planar a lo largo del epitelio. Todos estos datos refuerzan el análisis de genes candidatos específicos de tipos celulares del epitelio de las vías respiratorias como una buena estrategia a la hora de caracterizar defectos en el epitelio respiratorio relacionándolo con un fenotipo determinado asociándose a enfermedades del tracto respiratorio.

CONCLUSIONES CAPITULO I

CONCLUSIONES CAPÍTULO I

- La expresión de la molécula de adhesión de la unión, Jam3, está restringida a los endosomas apicales de las células multiciliadas de las vías respiratorias.
- Jam3 regula la alineación de los cuerpos basales del cilio y el posicionamiento en el lado apical de las células multiciliadas.
- Jam3 no está involucrado en el proceso de diferenciación de células basales a multiciliadas.

CAPITULO II

RESULTADOS CAPITULO II

RESULTADOS CAPÍTULO II

Los modelos de estudio del epitelio respiratorio son una herramienta fundamental para avanzar en la investigación de la relación entre los cambios genéticos y la aparición de fenotipos característicos de las enfermedades de las vías respiratorias, así como para el estudio de la biología del epitelio respiratorio. Como se ha mencionado anteriormente, en nuestro laboratorio se llevó a cabo el desarrollo de una línea inmortalizada de células madre basales humanas aisladas de las vías respiratorias, a través de la expresión de hTERT, que era capaz de formar un epitelio pseudoestratificado pero que ha perdido la capacidad de diferenciarse a células secretoras y células multiciliadas.

En el segundo capítulo de esta tesis se realizaron cribados farmacológicos en esta línea celular inmortalizada en busca de factores relacionados con la biología de células madre y epigenéticos que promovieran la diferenciación de este epitelio y conseguir desarrollar un nuevo modelo experimental para estudiar el epitelio de las vías respiratorias.

2.1. Cambios en la morfología del epitelio de las vías respiratorias producidos por los fármacos relacionados con la biología de las células madre.

Selene Díaz Chamorro en su tesis caracterizó la capacidad proliferativa y de diferenciación de la línea celular BROC2, que presentó expresión de p63, marcador de las poblaciones de células basales, Foxj1 y Scgb1a1, marcadores de las poblaciones de células multiciliadas y secretoras, respectivamente. Pero se encontró que, en los subcultivos con un número elevado de pases, esta línea celular perdió la capacidad de diferenciación, sin embargo, siguió manteniendo la capacidad proliferativa. Basándonos en estos resultados, se intentó promover el proceso de diferenciación del epitelio utilizando la citoquina IL6, relacionada con el mantenimiento, reparación y diferenciación de las células basales del epitelio de las vías respiratorias (Tadokoro et al., 2014; Dawson et al., 2021). Los resultados de este experimento mostraron que IL6 aumentaba la capacidad de pseudoestratificación del epitelio, pero no promovía la diferenciación de células basales en cultivos con pases elevados de la línea celular.

Con todos estos datos, utilizamos una librería de fármacos relacionados con la biología de las células madre (Tocris #734), formado por 120 compuestos implicados en el estudio la reprogramación, diferenciación, proliferación y señalización de células madre. Las células de la línea celular se expandieron y sembraron en soportes tipo *transwell*, como se detalla en el apartado de materiales y métodos y una vez confluentes,

el medio de la cámara inferior fue sustituido por medio de diferenciación ALI durante 21 días. Los fármacos de la librería y la IL-6 se añadieron al medio ALI a partir del día 4 de diferenciación, a una concentración de 1 μ M y 10ng/ml respectivamente, momento desde el cuál se monitorizó el estado de la monocapa del epitelio mediante microscopía de contraste de fases hasta finalizar los 21 días de diferenciación. A continuación, se analizaron por PCR cuantitativa los marcadores de los tres tipos celulares característicos del epitelio (p63 para células basales, Foxj1 para células multiciliadas y Scgb1a1 para células secretoras), juntando los ADNc en grupos de 8 muestras para un estudio más eficiente (Figura R32).

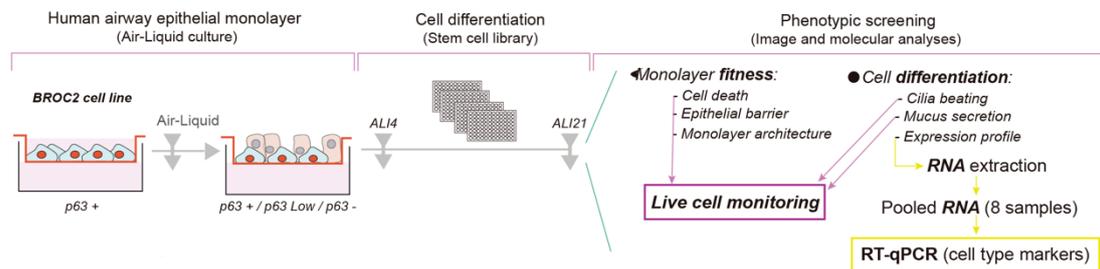


Figura R32: Esquema gráfico del estudio con la librería de fármacos relacionados con la biología de células madre. Representación esquemática del tratamiento de la línea celular BROCC2 con la librería de factores relacionados con la biología de células madre y su análisis del estado de la monocapa y del proceso de diferenciación por PCR cuantitativa.

El control diario del estado de la monocapa de la línea celular al tratarse con los fármacos de la librería nos mostró un cambio en la morfología del epitelio con el tratamiento con determinados fármacos, pero no se observó batido de los cilios ni secreción mucosa (Figura R33). Además, en el análisis por PCR cuantitativa no hubo amplificación de Foxj1 ni Scgb1a1. Estos resultados demostraron que el tratamiento con los fármacos no consiguió diferenciar el epitelio de las vías respiratorias, pero si modificó la morfología de la monocapa.

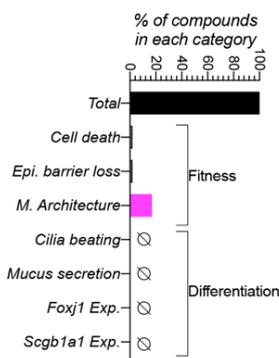


Figura R33: Efectos del tratamiento con fármacos relacionados con la biología de células madre en la estructura y diferenciación del epitelio respiratorio. Representación gráfica del porcentaje de compuestos implicados en los procesos celulares de muerte celular, diferenciación, función de barrera

epitelial y estructura de la monocapa, y de características específicas del proceso de diferenciación como son el batido ciliar, la secreción de moco y la expresión de los marcadores *Foxj1* y *Scgb1a1*.

El tratamiento con la librería de fármacos produjo cambios en la morfología del epitelio de la línea celular BROCC2 originando diferentes fenotipos. El seguimiento de las células tratadas al microscopio mostró que hubo fármacos diferentes que originaron los mismos fenotipos. La figura R34 recogió todos los fenotipos observados por microscopía de contraste de fases y los fármacos que los produjeron. En el fenotipo control, las células se trataron con DMSO e IL-6 y mostraron la aparición de cistos, células basales hiperplásicas del epitelio (Seibold et al., 2013), en la monocapa (Figura R34 panel A). Los fármacos I-BET 151, CPI203, DBZ y DAPT de la figura R34 panel B produjeron una pérdida de estos cistos, dándole un aspecto más regular al epitelio en comparación con el control. Mientras que el fenotipo observado en la figura R34 panel C, producido por los fármacos Chromans1, GSK 429286, *Forskolin* y AT7867, mostró una gran cantidad de cistos en el epitelio, observados también en el control. Por otro lado, la formación de sobrecrecimientos celulares en el epitelio determinó el último fenotipo observado en el experimento (Figura R34 panel D), inducido por los compuestos AM580 y CD437.

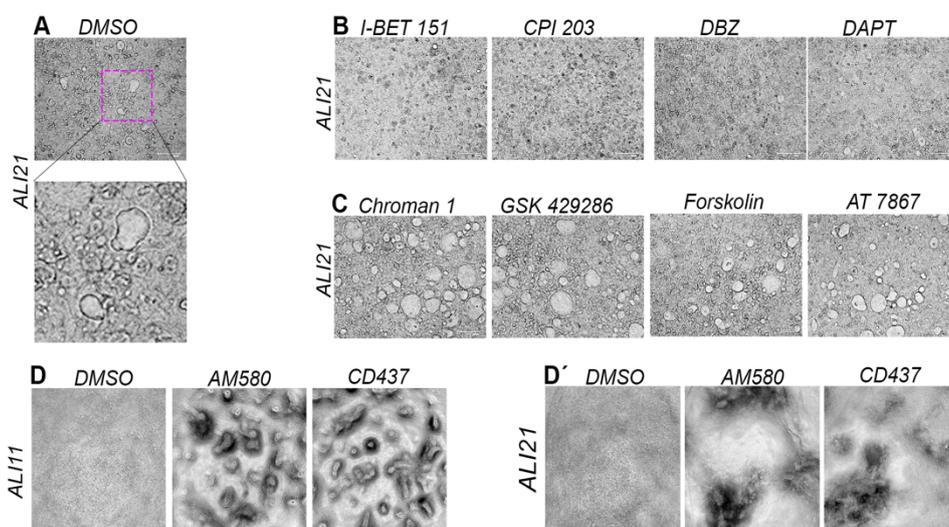


Figura R34 | Los compuestos de la librería de factores de células madre alteraban la morfología de la monocapa, produciendo diferentes fenotipos. (A, B,C,D) Imágenes de microscopía de contraste de fase de la línea celular en el día 21 de diferenciación y día 11 (D) donde se observan el control experimental (A) y los fármacos que producen el fenotipo de regularización del epitelio (B), formación de cistos (C) y el sobrecrecimiento celular (D, D').

Estos cambios en la estructura del epitelio de las células tratadas con los fármacos de la librería se confirmaron mediante una tinción con faloidina (en lila), marcando los filamentos de actina del citoesqueleto, y con DAPI (en amarillo) para marcar los núcleos en ALI21. Los resultados obtenidos en las imágenes de microscopía

confocal fueron similares a los de microscopía de contraste de fases, mostrando un epitelio más regular (Figura R35 panel A') en comparación con el control (Figura R35 panel A), la formación de cistos (Figura R35 panel A'') y el sobrecrecimiento celular (Figura R35 panel A''') causados por los fármacos. En las imágenes de microscopía confocal de la figura R35B-B''' se observaron los planos Z de las monocapas de los diferentes fenotipos, destacando una pérdida importante de la estratificación de las células del epitelio respiratorio tratados con CPI203 (Figura R35 panel B').

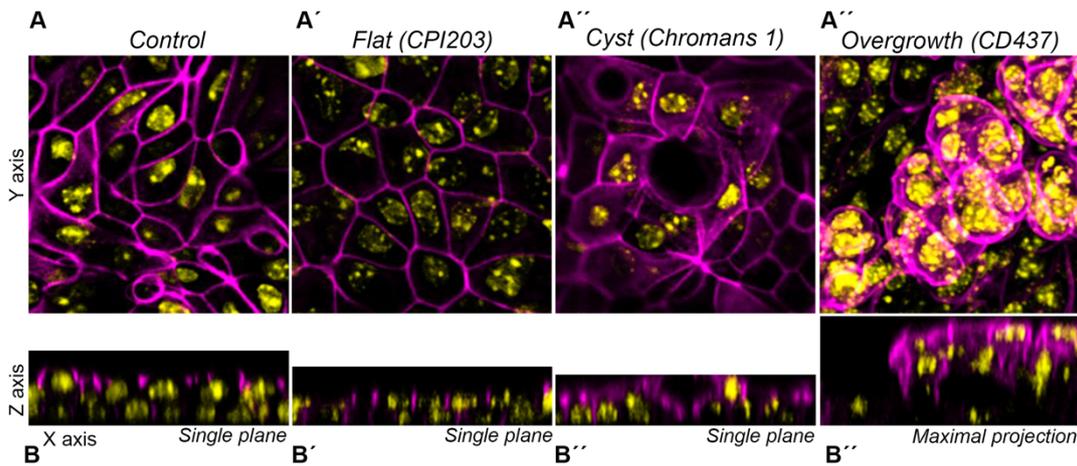


Figura R35. Análisis de la estructura de la monocapa de los diferentes fenotipos en la línea celular BROC2. Imágenes de microscopía confocal para faloidina en lila y núcleos en amarillo en el modelo experimental de estudio a día 21 de diferenciación en células control (A, B) tratadas con DMSO, con pérdida de estratificación del epitelio (A', B'), formación de cistos (A'', B'') y sobrecrecimiento celular (A''', B'''). Las figuras B-B''' muestran el plano ortogonal del epitelio reparatorio.

En el siguiente paso identificamos los fármacos que dieron lugar a cada fenotipo y se analizó la ruta molecular en la que estaban implicados. En la figura R36 se observó que los compuestos que formaban un fenotipo similar estaban implicados en la misma ruta bioquímica, por lo que se agruparon basándonos en esta característica. El sobrecrecimiento celular en la monocapa fue originado por fármacos análogos a ácido retinoico (AM580, CD437 y EC23) que actúan como agonistas del receptor de ácido retinoico (RAR), implicados en la diferenciación de las células madre pluripotentes inducidas por el ser humano en mesodermo intermedio (Araoka et al., 2014), la reprogramación de células somáticas a células madre pluripotentes inducidas (Wang et al., 2011) y la inhibición de la proliferación de células tumorales y las vías de señalización de supervivencia, induciendo apoptosis (Lu et al., 2010). Además, este fenotipo apareció también con el tratamiento con PD173074, un inhibidor de los receptores del factor de crecimiento fibroblástico 1,2 y 3 (FGF-R 1,2 y 3) implicado en el bloqueo de la diferenciación neuronal de las células madre embrionarias de ratón (Stavridis et al.2007), en la supresión de la diferenciación de células madre embrionarias de ratón,

manteniendo el estado indiferenciado (Kunath et al., 2007; Ying et al. 2008) y promoviendo la diferenciación de las células madre embrionarias humanas (Hanna et al. 2010).

Por otro lado, los fármacos que originaron la aparición de los cistos actúan en su mayoría inhibiendo la Rho quinasa (SR3677, Chromans1 y GSK429286), promoviendo la supervivencia y diferenciación de las células madre pluripotenciales (Chen et al., 2021). De igual forma, los compuestos implicados en la ruta de AMP/AKT *Forskolin*, que aumenta los niveles de AMPc, y AT7867, que inhibe PKA, también dieron lugar a este fenotipo. *Forskolin* se relacionó con diferenciación neuronal en las células progenitoras neurales del hipocampo de rata (Hsieh et al., 2004), mientras que AT7867 se vio implicado en la proliferación de células progenitoras pancreáticas derivadas de iPSC y en la supresión de la proliferación de múltiples líneas celulares de cáncer humano, incluido el de mama (Grimshaw et al., 2010)

Los fármacos que provocaron una pérdida de estratificación del epitelio se enmarcaron en los compuestos inhibidores de los dominios proteicos bromodominios (I-BET 151 y CPI203) y de la ruta Notch (DAPT y DBZ). También produjeron este fenotipo el inhibidor de la histona deacetilasa SAHA. Los compuestos inhibidores de proteínas con bromodominios, I-BET 151 y CPI203, impidieron la lectura de la lisina acetilada del extremo N-terminal bloqueando el reordenamiento de la cromatina (Dawson et al., 2011). Los inhibidores de la ruta de Notch promueven diferenciación hacia células multiciliadas en el epitelio respiratorio, bloqueando la diferenciación hacia células secretoras (Rock et al. 2009).

Phenotype Summary		
Overgrowth	Dome absence	Dome
RETINOIC ACIDS analogs AM 580 CD 437 EC 23	BROMODOMAINS inhibitor I-BET 151 dihydrochloride CPI 203	ROCK inhibitor SR 3677 dihydrochloride GSK429286 Chromans 1
FGFR-1, -2, and -3 inhibitor PD 173074	NOTCH Signaling DAPT DBZ	AMP / PKA /AKT Forskolin AT 7867
	HDACS inhibitor SAHA	p18INK inhibitor NSC 23005 sodium
		JAK1,2,3 inhibitor Pyridone 6

Figura R36: Tabla resumen de los compuestos que dan lugar a los distintos fenotipos en el modelo experimental. En cada grupo se especifican los fármacos de la librería que forman cada fenotipo en particular, y la ruta molecular en la que están implicada su acción.

Estos resultados nos sugirieron que, aunque la librería de fármacos no consiguió diferenciar el epitelio de la línea celular BROCC2, sí que produjo cambios en la morfología de este.

2.2. El fármaco I-BET 151 es capaz de revertir los fenotipos producidos por AM580, sobrecrecimientos celulares, y Chromans1, cistos.

Tras los resultados obtenidos del set de fármacos anteriores, se comprobó el estado de la monocapa utilizando uno de los compuestos que originaba cada fenotipo y distinguir cuál de los tres prevalecía sobre el resto. Para ello se sembraron las células de la línea celular BROCC2 en los soportes tipo *transwells* y cuando alcanzaron la confluencia adecuada se pasaron a medio de diferenciación ALI. Reproduciendo las condiciones del experimento del apartado 2.1, en el día 4 de diferenciación se trataron las células con los fármacos seleccionados de la librería (AM580, I-BET 151 y Chromans1 junto con IL6) hasta que se observaron los fenotipos producidos por cada compuesto sobre el día 9 de diferenciación. A partir de ese momento, a las células tratadas con AM580 y Chromans1 también se les añadió IBET 151, para comprobar si los cistos y los sobrecrecimientos celulares desaparecían.

En la figura R37, mediante microscopía de contraste de fases observamos el cambio de morfología en la monocapa en ALI9 al añadir AM580 e IBET-151 por separado en comparación con DMSO, apareciendo el sobrecrecimiento celular y la pérdida de estratificación, respectivamente. Al añadir ambos inhibidores a la vez en ALI10, se percibió que los sobrecrecimientos celulares fueron desapareciendo, mientras que las células tratadas únicamente con AM580 conservaron su fenotipo.

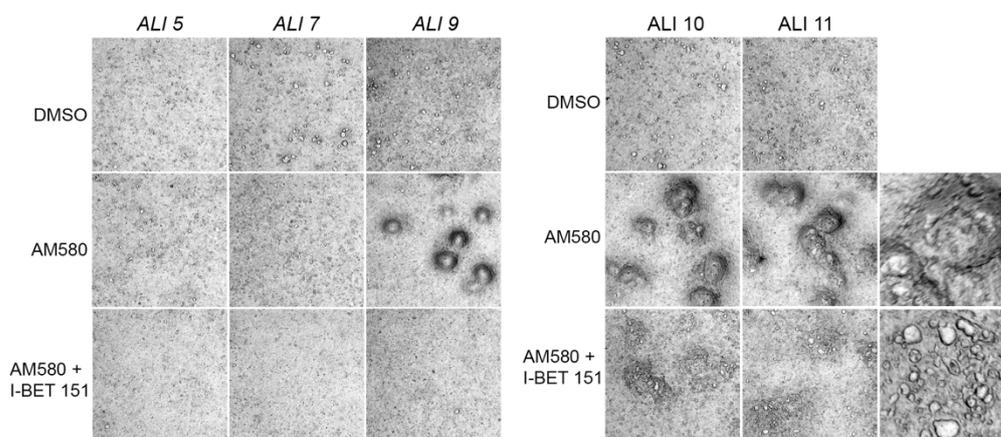


Figura R37: El efecto de I-BET 151 revierte el fenotipo de sobrecrecimiento celular originado por AM580. Imágenes de microscopía de contraste de fase de las células tratadas a lo largo de la diferenciación con AM580 e I-BET 151 y a partir de ALI10, las imágenes corresponden al tratamiento conjunto con ambos compuestos.

Para confirmar estos datos, se cuantificó el número de sobrecrecimientos celulares que aparecieron a lo largo de la diferenciación de la línea celular cuando se trató con AM580 e IBET-151 por separado, y cuando se trató con ambos compuestos a la vez en ALI10. La gráfica R38 mostró que en las células tratadas con AM580 iba aumentando el número de agregados celulares durante la diferenciación, hasta que en

ALI10 las células se trataron también con IBET151, observándose una reducción drástica del número de sobrecrecimientos celulares en la monocapa.

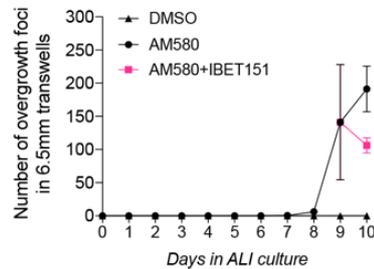


Figura R38. Cuantificación de los sobrecrecimientos celulares en células tratadas con con IBET-151 y AM580. Cuantificación del número de sobrecrecimientos celulares en las células tratadas con DMSO, AM580 y con AM580 e I-BET 151 a lo largo del proceso de diferenciación.

Una vez comprobado que I-BET 151 revirtió el fenotipo producido por el fármaco AM580, quisimos comprobar si ocurría lo mismo con los cistos que aparecen en la monocapa al tratar las células de la línea BROc2 con el compuesto Chromans1. Reproduciendo las condiciones del experimento anterior, la figura R39 mostró que los cistos aparecieron en el día 5 del proceso de diferenciación del epitelio, y al igual que la reversión del fenotipo en los resultados anteriores, el fenotipo de los cistos en las células tratadas con Chromans1 e I-BET 151, fue desapareciendo, aunque más lentamente.

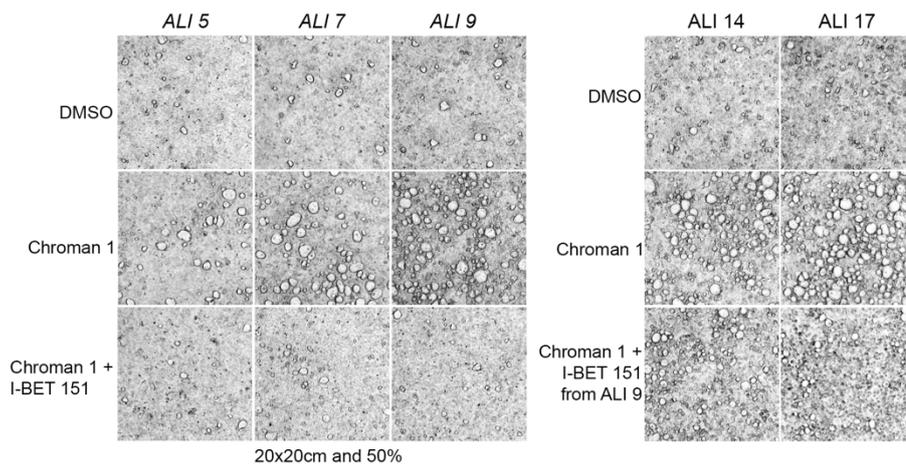


Figura R39: I-BET 151 revierte la formación de cistos. Imágenes de microscopía de contraste de fase de las células tratadas a lo largo de la diferenciación con Chromans1 e I-BET 151 y a partir de ALI14, las imágenes corresponden también al tratamiento conjunto con ambos compuestos desde ALI9.

2.3. Cambios en la morfología del epitelio de las vías respiratorias producidos por los fármacos de la librería epigenética.

Los fármacos inhibidores de bromodominios como I-BET 151 alteraron la morfología del epitelio, causando una pérdida de estratificación de este y revirtiendo el resto de los fenotipos obtenidos en la línea BROCC2 al utilizar la librería de fármacos relacionados con la biología de las células madre. Estos cambios en el comportamiento de las células basales pudieron producirse por modificaciones epigenéticas en sus programas transcripcionales y reguladores, afectando por tanto a la proliferación y diferenciación celular (Rock et al. 2010).

Para demostrar nuestra hipótesis, se utilizó un segundo set (Tocris #7578) de 160 compuestos epigenéticos, en los que se encontraron moduladores transcripcionales, que modificaban la actividad de los factores de transcripción influyendo en la expresión de sus genes diana (Li et al., 2014); “escritores” epigenéticos o *writers* que introducen modificaciones químicas en el ADN y las histonas; lectores epigenéticos o *readers*, que contienen proteínas que identifican e interpretan dichas modificaciones, donde se encuentran las proteínas con bromodominios; y los borradores epigenéticos o *erasers*, un grupo de enzimas encargadas de la eliminación de las modificaciones químicas (Biswal et al., 2018).

El cultivo y la diferenciación de la línea celular BROCC2 se realizó de la misma forma que el experimento descrito en el apartado 2.1 de resultados. En el día 4 de diferenciación se añadieron los compuestos de la librería epigenética junto con IL-6, a una concentración de 1 μ M y 10 ng/ml, respectivamente. El estado de la monocapa del epitelio se monitorizó, mediante microscopía de contraste de fases, durante toda la diferenciación desde ALI4 a ALI21 y se analizó la morfología del epitelio mediante la tinción con faloidina y DAPI.

domain) constituyen una familia formada por cuatro miembros: Brd2, Brd3, Brd4 y Brdt. Brd2, Brd3 y Brd4 se expresaron de forma ubicua, mientras que la expresión de Brdt se encontró restringida a la línea germinal masculina (Shang et al., 2004). Su estructura está muy conservada entre los distintos miembros y estaban formados (de N-terminal a C-terminal) por dos bromodominios en tándem, un motivo B y un dominio extraterminal (ET) que la diferenciaba de otros grupos de proteínas con bromodominios. Los bromodominios BD1 y BD2 eran capaces de reconocer residuos de lisinas acetiladas tanto en histonas como en otras proteínas (Gamsjaeger et al., 2011; Huang et al., 2009), aunque se unían principalmente a la histona H4 (Kanno et al., 2004). El motivo B era esencial para la homo y heterodimerización de la proteína, estabilizando así su unión a la cromatina y facilitando su asociación a los cromosomas durante la mitosis (García-Gutiérrez et al., 2012). El dominio ET, formado a su vez por el dominio NET (N-terminal Extra Terminal) y el motivo SEED, rico en residuos de serina, glutámico y aspártico (Florence & Faller, 2001), es el principal responsable de la interacción con otras proteínas (Rahman et al., 2011).

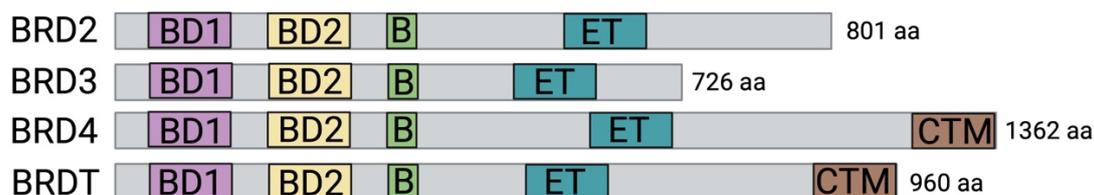


Figura R41: Estructura de la familia de proteínas BET. La estructura de las proteínas BET consta de dos bromodominios en tándem BD1 y BD2 (lila y amarillo, respectivamente), la región correspondiente al motivo B (verde) y el dominio ET (azul). En BRD4 y BRDT se encuentra la región CTM (dominio C-terminal, marrón). Los números indican la longitud en aminoácidos (aa) de las proteínas humanas. Imagen creada con BioRender.com.

El fenotipo producido por los fármacos inhibidores de las proteínas con bromodominios, I-BET 151, CPI203, OTX015 y +(-)JQ1, se observó en la figura R40 panel C, tanto por microscopía de contraste de fases como por microscopía confocal (faloidina en lila y núcleos en amarillo). Estas imágenes señalaron un aspecto más regular del epitelio de la línea celular BROc2 al tratarse con estos fármacos. Las células tratadas con -(-)JQ1 no sufrieron cambios morfológicos en la monocapa, ya que -(-)JQ1 es un enantiómero del compuesto +(-) JQ1 y no tiene afinidad para inhibir las proteínas con bromodominios, constituyendo por tanto un control negativo para +(-)JQ1. debido a que son el control negativo para +(-)JQ1. Las células tratadas con iBET-BD2, inhibidor del dominio BD2 de las proteínas con bromodominio, no mostraron tampoco cambios en la morfología del epitelio, lo que nos sugirió que el dominio BD1 de las proteínas con

bromodominios estaba implicado en el correcto desarrollo de la morfología del epitelio respiratorio.

2.4. Las proteínas con bromodominios regulan el proceso de diferenciación del epitelio de las vías respiratorias.

Con todos los datos obtenidos anteriormente de que las proteínas con bromodominios estaban implicadas en la estratificación del epitelio respiratorio, surgió la pregunta de cómo podrían los fármacos inhibidores de proteínas con bromodominios afectar al proceso de diferenciación.

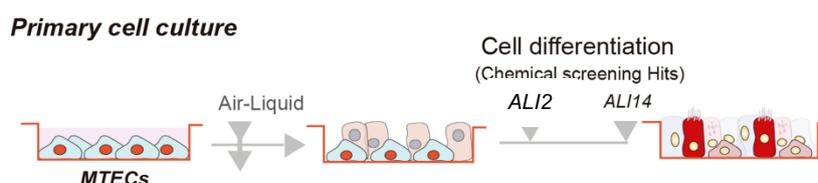


Figura R42: Esquema gráfico del experimento para estudiar el efecto de fármacos en la diferenciación celular en MTECs. Representación del tratamiento células epiteliales de las vías respiratorias de ratón con los fármacos que produjeron fenotipos en el cribado de factores de células madre y epigenéticos.

Para ello, se cultivaron y diferenciaron MTECS y se trataron con los fármacos que alteraban el estado de la monocapa, seleccionando dos compuestos por cada fenotipo, a partir del día 2 de diferenciación y se mantuvieron hasta ALI14 (figura R42). Se comprobó la permeabilidad a los iones de la monocapa midiendo la resistencia transepitelial a día 4,7 y 14 de diferenciación de las células control (tratadas con DMSO) y las células tratadas con los diferentes fármacos (Figura R43). Los resultados obtenidos muestran valores de TEER similares en los diferentes tratamientos durante el proceso de diferenciación, aunque en ALI7, las células tratadas con los fármacos análogos de ácido retinoico (en negro) y los inhibidores de ROCK (en azul) mostraron valores de TEER más bajos que las células control (en amarillo), mostrando una disminución en la integridad de la monocapa. Por el contrario, las células tratadas con los compuestos inhibidores de las proteínas con bromodominios (en rosa) presentaron un mayor valor de TEER en comparación con las células tratadas con DMSO, observándose por tanto un aumento de la integridad de la monocapa y la unión entre células.

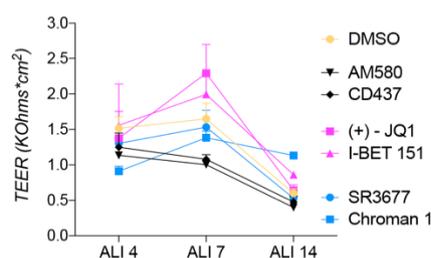


Figura R43: **Análisis de la permeabilidad de la monocapa al tratarse con los fármacos análogos de ácido retinoico, inhibidores de ROCK e inhibidores de las proteínas con bromodominio.** Se usó la medida de resistencia transepitelial (TEER) para probar la permeabilidad de la monocapa cuando las células se tratan con los fármacos en comparación con el control. En amarillo se indican las células control, en negro las células tratadas con análogos de ácido retinoico, en rosa las tratadas con inhibidores de bromodominios y en azul las células tratadas con inhibidores de ROCK.

A continuación, se analizó el estado de la monocapa y la estructura de los cilios de las células tratadas con los distintos fármacos en ALI14 mediante microscopía electrónica de barrido (Figura R44 panel A). Los resultados mostraron que las células tratadas con los fármacos inhibidores de Rock y análogos de ácido retinoico no mostraron cambios significativos en la estructura del epitelio ni de los cilios. Sin embargo, se observó que las células tratadas con (+-)JQ1 e I-BET 151 no mostraron cilios o los que aparecieron tenían alterada la estructura de estos, afectando por tanto a la diferenciación de las células multiciliadas del epitelio respiratorio.

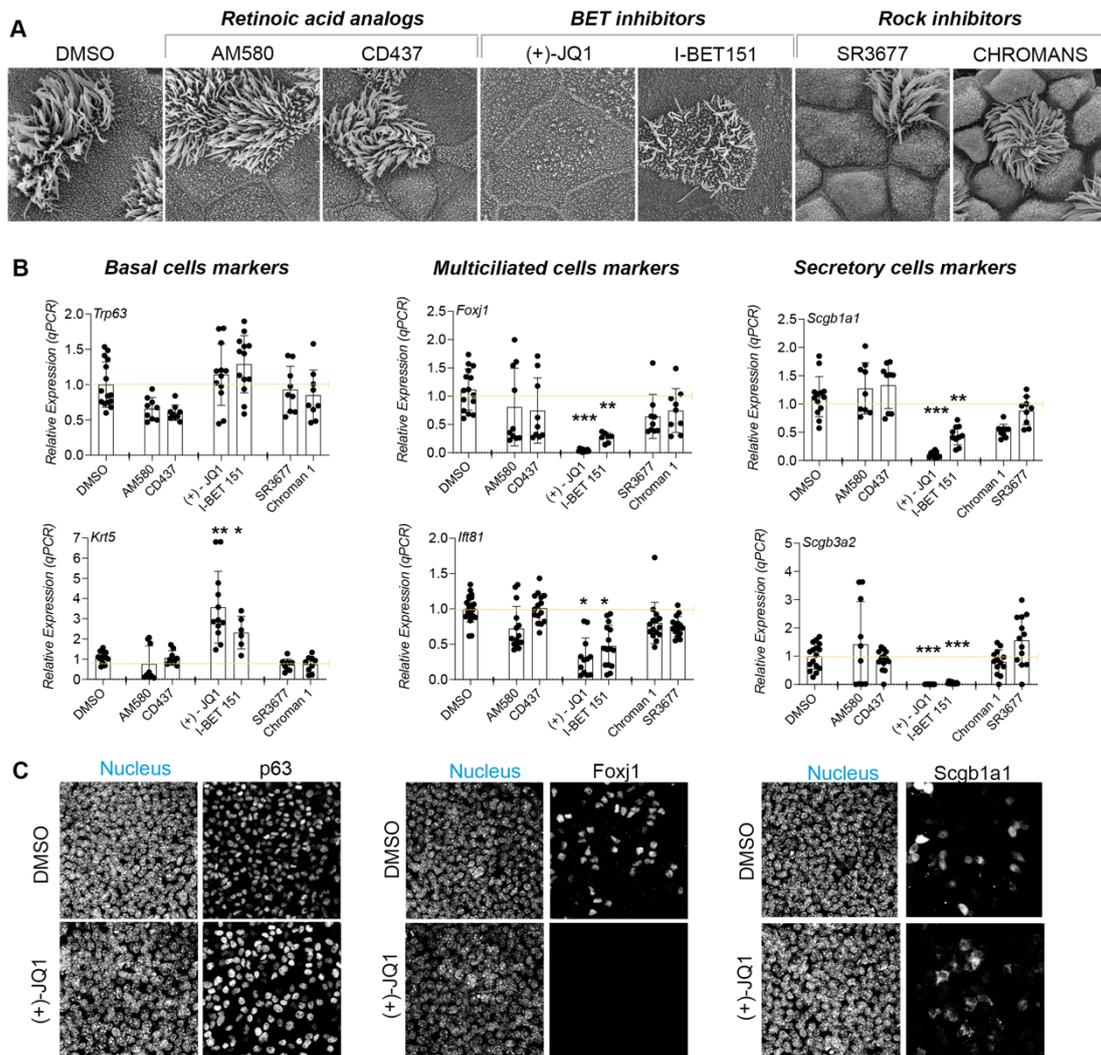


Figura R44: **Las proteínas con bromodominios están implicadas en el proceso de diferenciación.** (A) Imágenes de microscopía electrónica de barrido del control y de los tratamientos con los fármacos análogos

de ácido retinoico, inhibidores de ROCK e inhibidores de bromodominios en MTECs diferenciadas durante 14 días. (B) Cuantificación de la expresión de ARNm de Krt5 y Trp63 (marcadores basales), FoxJ1 e Ift81 (marcadores de células multiciliadas) y expresión de Scgb1a1 y Scgb3a2 (marcadores de células secretoras en ALI14). (C) Imágenes de inmunofluorescencia para p63, Foxj1 y Scgb1a1 en MTECs control y tratadas con +(-) JQ1, un inhibidor de proteína con bromodominios. Las normalizaciones se hicieron, en todos los casos, relativas al cultivo control. *p <0,05; ** p <0,01; ***p<0,001

Además, se analizó mediante PCR cuantitativa la expresión de los marcadores de diferenciación de cada tipo celular en las células tratadas con los fármacos seleccionados (Figura R44 panel B). La expresión de p63 y Krt5, marcadores de células basales, no mostró diferencias significativas en las células tratadas con los fármacos de ácido retinoico e inhibidores de ROCK al compararse con el control, a diferencia de las células tratadas con +(-) JQ1 e I-BET 151, que en el caso de Krt5 mostró un aumento significativo de su expresión, mientras que el aumento de la expresión de p63 no fue significativo.

En cuanto a la expresión de los marcadores de células multiciliadas, Foxj1 e Ift81, las células tratadas con los fármacos análogos de ácido retinoico e inhibidores de ROCK no señalaron cambios significativos en la expresión de estos marcadores al compararlas con las células control. Sin embargo, los fármacos inhibidores de las proteínas con bromodominios provocaron una disminución significativa de la expresión de Ift81 y en mayor medida de la expresión de Foxj1, viéndose perjudicado el proceso de diferenciación.

La expresión de Scgb1a1 y Scgb3a2, marcadores de células secretoras, no mostró cambios importantes en las células tratadas con los análogos de retinoico AM580, CD437 y los compuestos Chromans1 y SR3677, pero si disminuyó significativamente al tratarse con los fármacos inhibidores de las proteínas con bromodominios. Estos resultados demostraron y apoyaron la hipótesis de que las proteínas con bromodominios BET estaban implicadas o participaron en la regulación del proceso de diferenciación.

Estos datos se confirmaron mediante la realización de una inmunofluorescencia de células tratadas con +(-) JQ1 de las tres poblaciones celulares principales del epitelio (Figura R44 panel C), no apareciendo cambios significativos en el marcaje de p63. Sin embargo, la inmunofluorescencia para Foxj1 y Scgb1a1 mostró una disminución muy drástica del marcaje en las células tratadas con el inhibidor en comparación con el control,

Por lo tanto, se concluyó que las proteínas con bromodominios están implicadas en el proceso de diferenciación celular del epitelio respiratorio, ya que los compuestos que los inhiben disminuyen significativamente el número de células multiciliadas y secretoras durante la diferenciación.

2.5. Las proteínas con bromodominios actúan en los primeros días del inicio del proceso de diferenciación.

Los resultados obtenidos anteriormente expusieron que las proteínas con bromodominios estaban implicados en el proceso de diferenciación, por lo que nos planteamos cuál era el marco mínimo de actuación de los inhibidores de los bromodominios para bloquear la diferenciación, es decir, en qué días era importante la actuación de estos bromodominios. Las MTECs se trataron con +(-)JQ1 desde ALI2 durante varios días en la diferenciación (Figura R45 panel A), el primer pulso con el inhibidor se aplicó de ALI 2 a ALI4, el segundo de ALI4 a ALI6 y el tercer pulso, de ALI2 a ALI6.

Se comprobó la permeabilidad a los iones de la monocapa midiendo la resistencia transepitelial en los pulsos de tratamiento ALI a ALI4 y de ALI2 a ALI6, y se obtuvieron valores de TEER similares en los diferentes tiempos de tratamiento durante el proceso de diferenciación, aunque en ALI7, las células tratadas con el fármaco de ALI2 a ALI6 mostró un valor de TEER más alto, indicando un aumento en la integridad de la monocapa durante este periodo (Figura R45 panel B).

El efecto de estos pulsos en MTECs se analizó mediante PCR cuantitativa de los principales marcadores de poblaciones celulares (Figura R45 panel C). Los marcadores de células basales, Krt5 y p63, aumentaron su expresión de forma significativa al tratar las células con el inhibidor de ALI2 a ALI4, mientras que en el resto de los pulsos la expresión no cambió significativamente. En la expresión de marcadores de células multiciliadas, Foxj1 e Ift81, se observó una disminución significativa cuando las células se tratan con +(-)JQ1 a pulsos de tiempo largos, de ALI2 a ALI6, mientras que en los otros marcos temporales la expresión no varió. mostrando un mayor impacto en el bloqueo de la diferenciación cuando el inhibidor se aplicada al inicio de la diferenciación durante un periodo más largo de tiempo, produciéndose una disminución significativa tanto de las células secretoras como ciliadas. De la misma forma, los marcadores de células secretoras, Scgb1a1 y Scgb3a2, disminuyeron su expresión de forma significativa cuando se tratan MTECs con el fármaco de ALI2 a ALI6, aunque también se observó una disminución de la expresión de este marcador cuando se aplicó de ALI4 a ALI6.

Por lo tanto, estos resultados nos sugirieron que las proteínas con bromodominios eran relevantes en las etapas iniciales de la diferenciación, ya que en las células tratadas con el fármaco inhibidor el efecto era más acusado durante un marco temporal extendido y al inicio de la diferenciación.

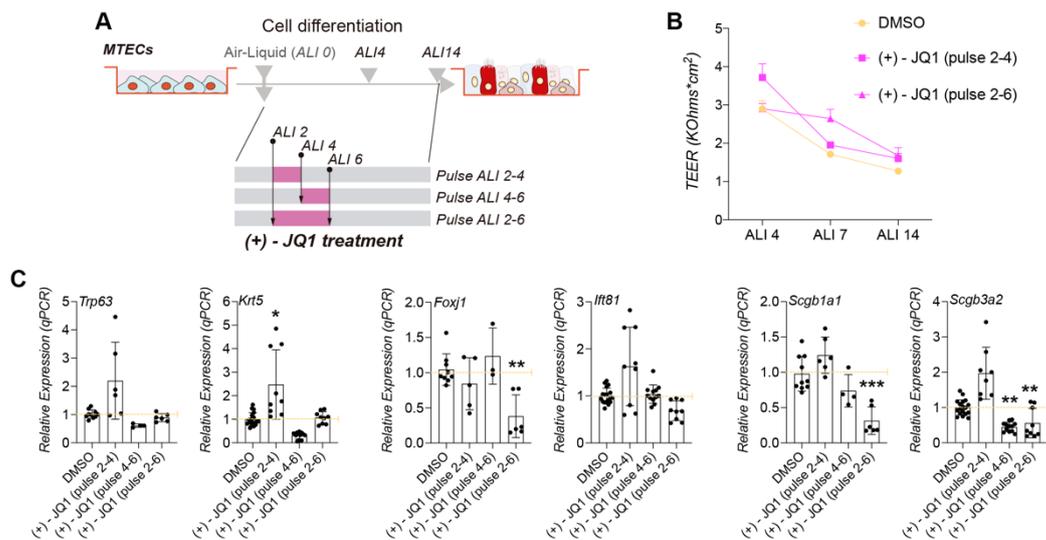


Figura R45. Estudio del marco temporal de actuación de los fármacos inhibidores de bromodominios. (A) Esquema gráfico del experimento para estudiar el tiempo de actuación de los fármacos en la diferenciación celular en MTECs. (B) Resistencia transepitelial (TEER) de las células tratadas con JQ1 de ALI2 a ALI4 (cuadrado rosa) y de ALI2 a ALI6 (triángulo rosa) comparado con células tratadas con DMSO (amarillo). (C) Cuantificación de la expresión de ARNm de Krt5 y Trp63 (marcadores basales), FoxJ1 e Ifi81 (marcadores de células multiciliadas) y expresión de Scgb1a1 y Scgb3a2 (marcadores de células secretoras en los diferentes pulsos temporales. Las normalizaciones se hicieron, en todos los casos, relativas al cultivo control. *p < 0,05; ** p < 0,01; ***p < 0,001

2.6. BRD3 y BRD4 son las proteínas con bromodominios relevantes en el proceso de diferenciación del epitelio de las vías respiratorias.

Conociendo que las proteínas con bromodominios eran necesarias en el proceso de diferenciación en el epitelio de las vías respiratorias, nos surgió la siguiente pregunta: ¿Qué proteína con bromodominios era la más relevante durante este proceso? Con el fin de estudiar el papel de los BRD en la diferenciación de las células que formaban el epitelio de las vías respiratorias, se silenció la expresión de estas proteínas en cultivos primarios indiferenciados. Mediante transducción lentiviral, se generaron cultivos que contenían secuencias de ARN de interferencia (*shRNA*) para BRD2 (BRD2-KD), BRD3 (BRD3-KD) y BRD4 (BRD4-KD), utilizándose como control el ARN de interferencia frente a la proteína Luciferasa (*shLuc*). Se emplearon tres secuencias distintas para el silenciamiento de cada BRD, infectándose de forma combinada para maximizar el efecto del *knockdown*. Los *shRNA* para BRD2, BRD3 y BRD4 fueron cedidos por Miguel Fidalgo. La disminución de la expresión de BRD2, BRD3 y BRD4 se confirmó a nivel de ARN mediante PCR cuantitativa en células MTECs diferenciadas durante 14 días, consiguiendo un silenciamiento de la expresión de alrededor de un 50% (Figura R47 panel A). A continuación, se comprobó mediante PCR cuantitativa de los marcadores de los principales tipos celulares del epitelio si la disminución de la expresión de los BRD

afectó a la diferenciación de células basales a multiciliadas y secretoras. (Figura R46 panel B-D).

La expresión de los marcadores de células basales, p63 y Krt5, no se vio afectada en las células BRD2-KD ni BRD4-KD, pero si disminuyó de forma significativa en las células BRD3-KD, de forma más drástica en Krt5, en comparación con el control. Sin embargo, observamos que las células BRD4-KD si disminuyen contundentemente la expresión tanto de los marcadores de células ciliadas como secretoras.

Por otro lado, las células BRD3-KD mostraron un aumento significativo de la expresión de Foxj1 e Ift81, pero disminuyendo drásticamente la expresión de los marcadores de células secretoras. Las células BRD2-KD no cambiaron la expresión de forma significativa de los marcadores de células secretoras y ciliadas.

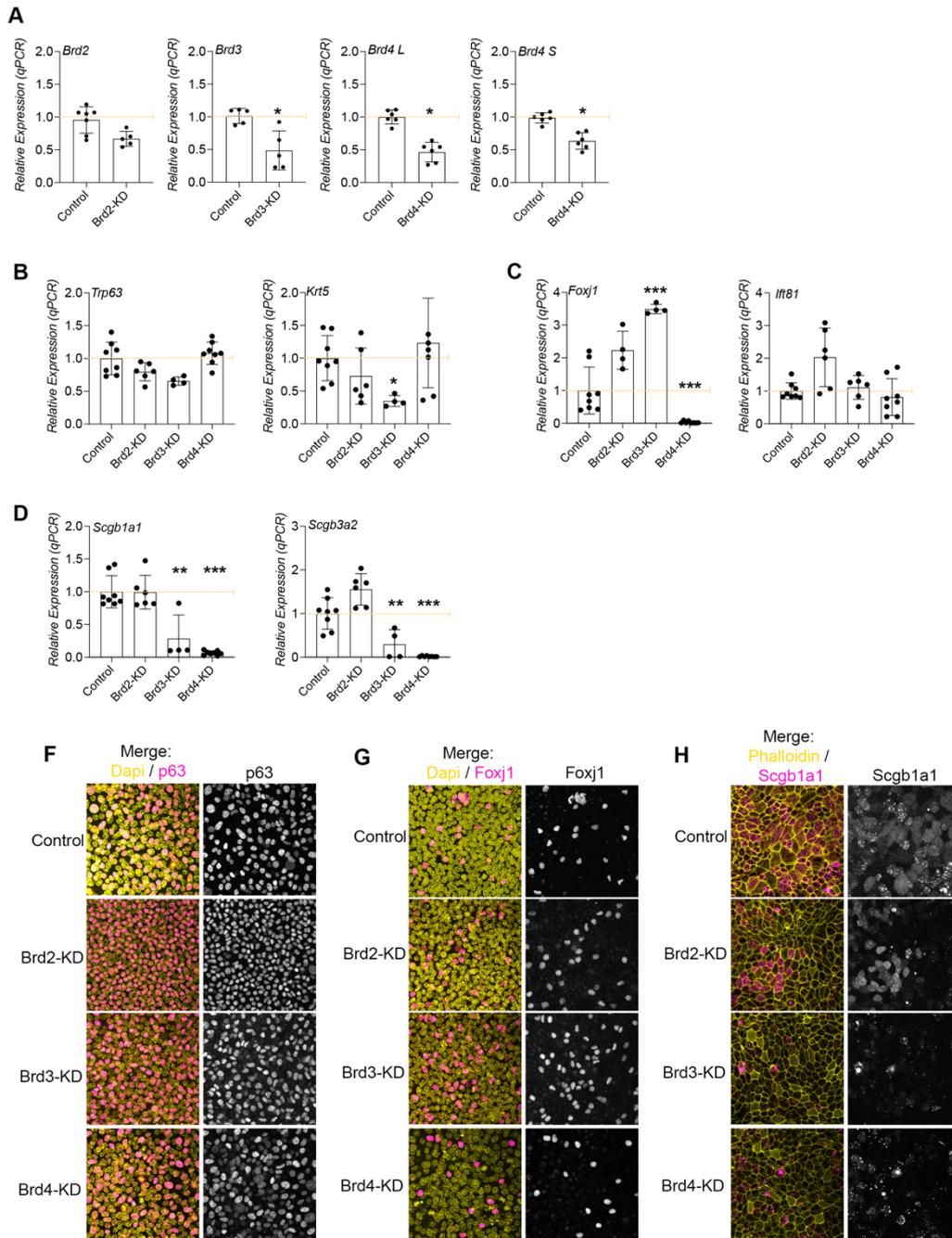


Figura R46: Análisis del efecto del silenciamiento de las proteínas con bromodominios en la diferenciación. (A) Niveles de expresión de ARNm de BRD2, BRD3 y BRD4 en MTECs diferenciadas infectadas con virus control (Luc KD) o BRD-*shRNA*. (B-D) Cuantificación de la expresión de ARNm de Krt5 y p63 (marcadores basales, B), *Ift81* y *Foxj1* (marcadores de células multiciliadas, C) y expresión de *Scgb1a1* y *Scgb3a2* (marcadores de células secretoras, D). (E-G) Imágenes de microscopía confocal para p63, *Foxj1* y *Scgb1a1* en células control y BRD-KD. Faloidina y DAPI en amarillo. P63, *Foxj1* y *Scgb1a1* en lila, en gris a la derecha de las imágenes compuestas. Las normalizaciones se hicieron, en todos los casos, relativas al cultivo control. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Estos resultados se confirmaron mediante la realización de una inmunofluorescencia de p63, *Foxj1* y *Scgb1a1* para los distintos *knockdown* de BRD. Las imágenes de

microscopia confocal de la Figura R46 panel F no mostró diferencias en el número de células marcadas para p63 al comparar los *knockdown* de los BRD con el control. La inmunofluorescencia para Foxj1 mostró un aumento de células multiciliadas en las células BRD3-KD en comparación con el control, y una disminución significativa en las células BRD4-KD (Figura R46 panel G). De la misma forma, no se observó marcaje de Scgb1a1 en células BRD3-KD y BRD4-KD comparadas con el control (Figura R46 panel H). disminución en el número de células ciliadas y secretoras en las células BRD4-KD comparado con el control. Estos datos sugirieron que las proteínas con bromodominios BET BRD3 y BRD4 eran las más relevantes en el proceso de diferenciación.

Los resultados obtenidos de las células BRD3-KD mostraron similitudes con el funcionamiento de la ruta de Notch cuando se trataron las células con DAPT, aumentando la población de células multiciliadas y suprimiendo la expresión de las células secretoras, sugiriendo que las proteínas con bromodominios y la ruta Notch podrían estar relacionadas. Para apoyar esta hipótesis, en la librería de fármacos relacionados con la biología de células madre se observó la presencia de compuestos que inhibían la ruta de Notch, DAPT y DBZ, y que produjeron el mismo fenotipo que los fármacos inhibidores de las proteínas con bromodominios. Por lo que, para comprobar si estas proteínas con bromodominios, y más específicamente BRD3, reguló la ruta de Notch, se analizó mediante PCR cuantitativa la expresión de los ligandos de Notch, Jag1, Jag2, DII-1, Notch1 y Notch2. Los resultados de este análisis mostraron una disminución de todos los ligandos de la ruta de Notch (DII-1, Jag1, Jag2, Notch1 y Notch2) en las células BRD3-KD en comparación con el control, siendo significativa la disminución de la expresión de Jag2 y DII-1. Estos datos señalaron una posible interacción de la ruta de Notch y las proteínas con bromodominios, en especial BRD3, en la regulación del proceso de diferenciación.

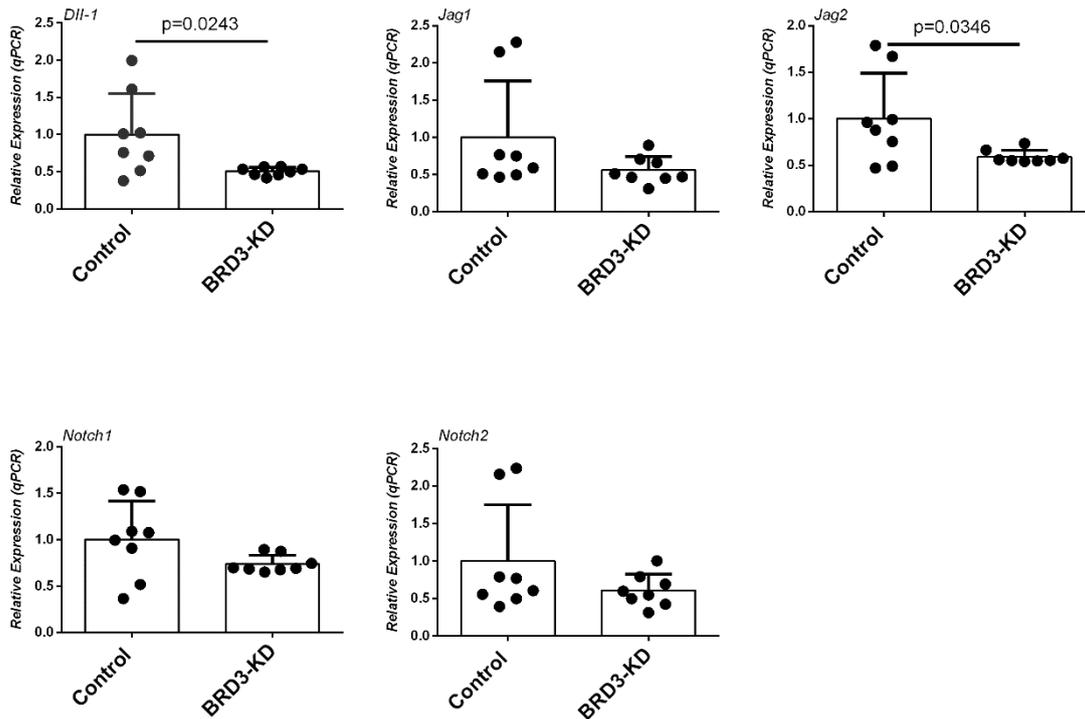


Figura R47: Estudio de la expresión de los ligandos de la ruta Notch en células BRD3-KD. Niveles de expresión de ARNm de Dll-1, Jag1, Jag2, Notch1 y Notch2 en MTECs diferenciadas control (Luc KD) o BRD3-KD.

Los resultados obtenidos de este capítulo sugieren que nuestro modelo experimental, la línea inmortalizada BROCC2, podría servir de modelo de estudio de la biología del epitelio de las vías respiratorias, ya que permite analizar cambios morfológicos en la monocapa de este epitelio, así como la estructura de esta.

También se demostró la implicación de las proteínas con bromodominios BET en el proceso de diferenciación, en especial de BRD3, clave en el conocimiento de las rutas que regulan este proceso.

DISCUSIÓN CAPITULO II

DISCUSIÓN CAPÍTULO II

A pesar de un eficaz sistema de defensa, el epitelio de las vías respiratorias se ve frecuentemente lesionado por contaminantes, microorganismos y virus inhalados. La respuesta de este epitelio incluye una sucesión de eventos celulares entre los que destaca la pérdida de integridad y diferenciación del epitelio, por lo que las células epiteliales tienen que regenerarse para restablecer sus funciones, siendo capaces de desdiferenciarse, extenderse y migrar sobre la membrana basal y rediferenciarse progresivamente para reconstituir un epitelio respiratorio funcional (Coraux et al., 2005).

Para estudiar de forma más específica la biología del epitelio de las vías respiratorias, así como los mecanismos implicados en la regeneración de este epitelio y la caracterización de las células madre epiteliales, se utilizan modelos experimentales de estudio del epitelio respiratorio, como son cultivos *in vitro*, líneas inmortalizadas, organoides y modelos animales entre otros, descritos en la literatura (de Jong et al., 1994; Yu et al., 2007; Blume & Davies., 2013; Seok et al., 2013)

El uso de líneas celulares inmortalizadas tiene la ventaja de prevenir la senescencia gracias a la expresión inducida de la telomerasa humana como (Ramírez et al., 2004) y la posibilidad de cultivar las células sin perder la capacidad de diferenciación. El desarrollo de la línea inmortalizada BROCC2 en el laboratorio contribuyó a la investigación de la biología del epitelio respiratorio, estableciéndose como un modelo para el estudio del proceso de diferenciación de células basales hacia células multiciliadas y secretoras. El problema apareció cuando esta línea va perdiendo su capacidad de diferenciación a medida que aumenta el número de pases celulares. Para lograr establecer esta línea inmortalizada como modelo de estudio del epitelio respiratorio se intentó promover la diferenciación de células basales mediante una librería de compuestos farmacológicos de factores asociados a células madre y epigenéticos. Los datos aportados por esta tesis muestran que el tratamiento de las células con la librería de fármacos no consiguió diferenciar el epitelio, pero la monocapa si cambió su morfología, apareciendo tres fenotipos diferentes que fueron la formación de sobrecrecimientos celulares, originados por análogos de ácido retinoico; la pérdida de estratificación del epitelio producido por fármacos inhibidores de proteínas con bromodominios; y la formación de cistos, causados por inhibidores de ROCK. Experimentos posteriores demostraron que los inhibidores de proteínas con bromodominios podía revertir los otros dos fenotipos una vez formados. Utilizando la librería epigenética demostramos que los fármacos que provocaban un epitelio más regular pertenecían a la familia de los inhibidores de las proteínas con bromodominios

BET específicamente. Además, tomando como referencia el fenotipo de regularización del epitelio, ya que era el que más efecto mostrada, decidimos conocer cómo afectan estos inhibidores en un cultivo primario que sí se diferencia, obteniendo como resultado un bloqueo del proceso de la diferenciación, suprimiendo la expresión de células multiciliadas como secretoras, manteniendo únicamente la presencia de células basales. Estos datos nos hicieron preguntarnos qué proteínas con bromodominios era importante en la diferenciación y cuál era el marco temporal en el que actuaban. Para ello, realizamos pulsos temporales del tratamiento con JQ1 en MTECs durante la diferenciación, obteniendo las proteínas inhibidoras de bromodominios son importantes en las primeras etapas de la diferenciación. Para determinar que proteína con bromodominios estaba implicada a la diferenciación, se utilizaron RNA de interferencia para cada BRD y se analizó por PCR cuantitativa e inmunofluorescencia los tres tipos celulares principales del epitelio respiratorio, obteniendo que BRD3 y BRD4 son las proteínas implicadas en el proceso de diferenciación, y más en concreto BRD3, que se relacionó con la ruta de Notch al conocerse el posible papel de BRD3 en la diferenciación de células basales hacia células multiciliadas.

Los fármacos de la librería que daban lugar a los crecimientos celulares, como son AM580, CD437 y EC23, inhiben de la proliferación de células tumorales y las vías de señalización de supervivencia, induciendo apoptosis (Lu et al., 2010). La figura R35 panel D' coincide con los datos obtenidos de este estudio, ya que se observa que en los días finales de la diferenciación de la monocapa de la línea BROCC2, estos agregados van degradándose y sufriendo apoptosis. Sin embargo, estos fármacos también se han relacionado con el proceso de diferenciación de células madre pluripotentes inducidas en mesodermo intermedio (Araoka et al., 2014), proceso que no observamos en nuestra línea inmortalizada, ya que, aunque muestra un cambio en la morfología del epitelio, las células de la monocapa no se diferenciaron.

Por otro lado, los fármacos que forman cistos en la monocapa son SR3677 y Chormans 1, y actúan inhibiendo ROCK. Estos fármacos se ha utilizado en estudios que promueven la supervivencia y diferenciación de células madre pluripotenciales (Chen et al., 2021), sin embargo, en nuestro modelo experimental no han conseguido promover este proceso. En cuanto a los fármacos que forman un fenotipo más regular del epitelio se encuentran los fármacos inhibidores de los bromodominios y de la ruta de Notch, implicada en el proceso de diferenciación de hacia células multiciliadas (Garrido-Jiménez et al., 2021).

Al analizar el efecto de los fármacos que originan los diferentes fenotipos en el epitelio respiratorio de la línea BROC2 en la diferenciación, obtenemos que los inhibidores de las proteínas con bromodominios son los que más efecto producen, bloqueando por completo la diferenciación de células basales a secretoras, vinculando por tanto a estas proteínas con bromodominios al proceso de diferenciación. Las proteínas con bromodominios BET se han relacionado en numerosos estudios con el proceso de diferenciación meso-endodermo mediante la unión de los BRD a las regiones reguladoras de la ruta Activin/Noval (Surface et al., 2016), en el cáncer en que una mutación en el gen NUT (Nuclear Protein Testis) bloquea la diferenciación epitelial favoreciendo la carcinogénesis (French et al. 2008), confirmando nuestros datos.

A continuación, quisimos conocer exactamente el BRD que estaba implicado en controlar la diferenciación, para ello desarrollamos tres *shRNA* para cada uno de ellos e infectamos a MTECs. Tanto las células con una expresión reducida de BRD3 como BRD4 mostraron una menor o nula expresión de células ciliadas y secretoras, sin embargo, las células BRD3-KD aumentaron el número de células multiciliadas y disminuyeron la expresión de células secretoras, implicando a la proteína BRD3 en el proceso de diferenciación. Estos datos relacionan los bromodominios con la ruta Notch, ya que en la librería de fármacos relacionados con la biología de células madre, los fármacos inhibidores de bromodominios y de la ruta Notch daban lugar al mismo fenotipo. También, analizamos los ligandos de la ruta Notch cuando las células tienen una expresión reducida de BRD3, observando una disminución de la expresión de estos ligandos y por lo tanto de la ruta. Garrido Jiménez en su tesis relacionó el bloqueo de Notch con DAPT con un aumento de la diferenciación hacia células multiciliadas, lo mismo que ocurre en las células BRD3-KD, por lo que estos datos implican una relación entre Notch y los bromodominios en el proceso de diferenciación de células multiciliadas.

La implicación de las proteínas con bromodominios BET con la diferenciación hacia células ciliadas nos aporta un mayor conocimiento de las rutas moleculares implicadas en los procesos de regeneración y diferenciación del epitelio, avanzando en el camino hacia la terapia regenerativa, permitiendo la reconstitución de un epitelio de las vías respiratorias funcional en numerosas enfermedades respiratorias, como el asma, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, fibrosis quística y bronquiolitis.

CONCLUSIONES CAPITULO II

CONCLUSIONES CAPÍTULO II

- Nuestro modelo experimental de estudio del epitelio de las vías respiratorias humanas BROCC2 sirve para el análisis de cambios morfológicos en el epitelio, pero no para estudios de diferenciación a elevado número de pases celulares.
- Las proteínas con bromodominios son relevantes tanto en el proceso de diferenciación hacia células ciliadas y secretoras como en la pseudoestratificación del epitelio de las vías respiratorias.
- El marco de actuación de las proteínas con bromodominios se establece al inicio de la diferenciación
- La proteína con bromodominios BET, BRD3, regula el proceso de diferenciación a células multiciliadas, relacionándose con la ruta de Notch suprimiendo la diferenciación de células basales a secretoras.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Adler, P. N., & Wallingford, J. B. (2017). From planar cell polarity to ciliogenesis and back: the curious tale of the PPE and CPLANE proteins. *Trends in cell biology*, 27(5), 379-390.
- Alghamdi, J., & Padmanabhan, S. (2014). Fundamentals of complex trait genetics and association studies. *Handbook of pharmacogenomics and stratified medicine*, 1, 235-257
- Anderson, J. M., & Van Itallie, C. M. (2009). Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(2), a002584
- Andrieu, G. P., & Denis, G. V. (2018). BET proteins exhibit transcriptional and functional opposition in the epithelial-to-mesenchymal transition. *Molecular Cancer Research*, 16(4), 580-586
- Araoka, T., Mae, S. I., Kurose, Y., Uesugi, M., Ohta, A., Yamanaka, S., & Osafune, K. (2014). Efficient and rapid induction of human iPSCs/ESCs into nephrogenic intermediate mesoderm using small molecule-based differentiation methods. *PLoS one*, 9(1), e84881
- Arrate, M. P., Rodriguez, J. M., Tran, T. M., Brock, T. A., & Cunningham, S. A. (2001). Cloning of human junctional adhesion molecule 3 (JAM3) and its identification as the JAM2 counter-receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 276(49), 45826-45832
- Aurrand-Lions, M. A., Duncan, L., Du Pasquier, L., & Imhof, B. A. (2000). Cloning of JAM-2 and JAM-3: an emerging junctional adhesion molecular family. In *Lymphoid Organogenesis: Proceedings of the Workshop held at the Basel Institute for Immunology 5th–6th November 1999* (pp. 91-98). Springer Berlin Heidelberg
- Banerjee, A. K. (2009). Preinvasive lesions of the bronchus. *Journal of Thoracic Oncology*, 4(4), 545-551
- Barkauskas, C. E., Chung, M. I., Fioret, B., Gao, X., Katsura, H., & Hogan, B. L. (2017). Lung organoids: current uses and future promise. *Development*, 144(6), 986-997.
- Basbaum, C.B. & Finkbeiner, W.E. Airway secretion: a cell-specific analysis. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* 20, 661-667 (1988).
- Bayram, H., Devalia, J. L., Khair, O. A., Abdelaziz, M. M., Sapsford, R. J., Sagai, M., & Davies, R. J. (1998). Comparison of ciliary activity and inflammatory mediator release from bronchial epithelial cells of nonatopic nonasthmatic subjects and atopic asthmatic patients and the effect of diesel exhaust particles in vitro. *Journal of allergy and clinical immunology*, 102(5), 771-782.
- Bazzoni, G. (2003). The JAM family of junctional adhesion molecules. *Current opinion in cell biology*, 15(5), 525-530

- Bazzoni, G., Martinez-Estrada, O. M., Mueller, F., Nelboeck, P., Schmid, G., Bartfai, T., ... & Brockhaus, M. (2000). Homophilic interaction of junctional adhesion molecule. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40), 30970-30976
- Belkina, A. C., & Denis, G. V. (2012). BET domain co-regulators in obesity, inflammation and cancer. *Nature reviews Cancer*, 12(7), 465-477
- Bhogaraju, S., Cajanek, L., Fort, C., Blisnick, T., Weber, K., Taschner, M., ... & Lorentzen, E. (2013). Molecular basis of tubulin transport within the cilium by IFT74 and IFT81. *Science*, 341(6149), 1009-1012.
- Biswas, S., & Rao, C. M. (2018). Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy. *European journal of pharmacology*, 837, 8-24
- Blume, C., & Davies, D. E. (2013). In vitro and ex vivo models of human asthma. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 84(2), 394-400.
- Boucher, R. C. (2007). Evidence for airway surface dehydration as the initiating event in CF airway disease. *Journal of internal medicine*, 261(1), 5-16
- Boutin, C., Labedan, P., Dimidschstein, J., Richard, F., Cremer, H., André, P., ... & Tissir, F. (2014). A dual role for planar cell polarity genes in ciliated cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(30), E3129-E3138
- Bukowy-Bieryłto, Z. (2021). Long-term differentiating primary human airway epithelial cell cultures: how far are we?. *Cell Communication and Signaling*, 19(1), 63.
- Cao, X., Coyle, J. P., Xiong, R., Wang, Y., Heflich, R. H., Ren, B., ... & Rojanasakul, L. (2021). Invited review: human air-liquid-interface organotypic airway tissue models derived from primary tracheobronchial epithelial cells—overview and perspectives. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 57, 104-132.
- Cardoso, W. V. (2001). Molecular regulation of lung development. *Annual review of physiology*, 63(1), 471-494.
- Cartier-Michaud, A., Bailly, A. L., Betzi, S., Shi, X., Lissitzky, J. C., Zarubica, A., ... & Aurrand-Lions, M. (2017). Genetic, structural, and chemical insights into the dual function of GRASP55 in germ cell Golgi remodeling and JAM-C polarized localization during spermatogenesis. *PLoS Genetics*, 13(6), e1006803.
- Carvajal-Gonzalez, J. M., Gravotta, D., Mattera, R., Diaz, F., Perez Bay, A., Roman, A. C., ... & Rodriguez-Boulan, E. (2012). Basolateral sorting of the coxsackie and adenovirus receptor through interaction of a canonical YXXΦ motif with the clathrin adaptors AP-1A and AP-1B. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(10), 3820-3825.
- Carvajal-Gonzalez, J. M., Roman, A. C., & Mlodzik, M. (2016b). Positioning of centrioles is a conserved readout of Frizzled planar cell polarity signalling. *Nature communications*, 7(1), 11135

- Carvajal-Gonzalez, J. M., Mulero-Navarro, S., & Mlodzik, M. (2016a). Centriole positioning in epithelial cells and its intimate relationship with planar cell polarity. *BioEssays*, 38(12), 1234-1245
- Carvajal-Gonzalez, J. M., Mulero-Navarro, S., & Mlodzik, M. (2016). Centriole positioning in epithelial cells and its intimate relationship with planar cell polarity. *BioEssays*, 38(12), 1234-1245.
- Chapman, D. G., Tully, J. E., Nolin, J. D., Janssen-Heininger, Y. M., & Irvin, C. G. (2014). Animal models of allergic airways disease: where are we and where to next?. *Journal of cellular biochemistry*, 115(12), 2055-2064.
- Chavakis, T., Keiper, T., Matz-Westphal, R., Hersemeyer, K., Sachs, U. J., Nawroth, P. P., ... & Santoso, S. (2004). The junctional adhesion molecule-C promotes neutrophil transendothelial migration in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 279(53), 55602-55608
- Chen, G., Korfhagen, T. R., Xu, Y., Kitzmiller, J., Wert, S. E., Maeda, Y., ... & Whitsett, J. A. (2009). SPDEF is required for mouse pulmonary goblet cell differentiation and regulates a network of genes associated with mucus production. *The Journal of clinical investigation*, 119(10), 2914-2924
- Chen, Y., Tristan, C. A., Chen, L., Jovanovic, V. M., Malley, C., Chu, P. H., ... & Singeç, I. (2021). A versatile polypharmacology platform promotes cytoprotection and viability of human pluripotent and differentiated cells. *Nature methods*, 18(5), 528-541
- Choe, M. M., Sporn, P. H., & Swartz, M. A. (2003). An in vitro airway wall model of remodeling. *American journal of physiology-Lung cellular and molecular physiology*, 285(2), L427-L433.
- Chowdhury, F., Howat, W. J., Phillips, G. J., & Lackie, P. M. (2010). Interactions between endothelial cells and epithelial cells in a combined cell model of airway mucosa: effects on tight junction permeability. *Experimental Lung Research*, 36(1), 1-11
- Coraux, C., Hajj, R., Lesimple, P., & Puchelle, E. (2005). In vivo models of human airway epithelium repair and regeneration. *European Respiratory Review*, 14(97), 131-136.
- Coraux, C., Hajj, R., Lesimple, P., & Puchelle, E. (2005). In vivo models of human airway epithelium repair and regeneration. *European Respiratory Review*, 14(97), 131-136.
- Coyne, C. B., Vanhook, M. K., Gambling, T. M., Carson, J. L., Boucher, R. C., & Johnson, L. G. (2002). Regulation of airway tight junctions by proinflammatory cytokines. *Molecular biology of the cell*, 13(9), 3218-3234

- Cunningham, S. A., Arrate, M. P., Rodriguez, J. M., Bjercke, R. J., Vanderslice, P., Morris, A. P., & Brock, T. A. (2000). A novel protein with homology to the junctional adhesion molecule: characterization of leukocyte interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 275(44), 34750-34756
- Daniely, Y. *et al.* Critical role of p63 in the development of a normal esophageal and tracheobronchial epithelium. *American journal of physiology. Cell physiology* **287**, C171-181 (2004).
- Davis, J. D., & Wypych, T. P. (2021). Cellular and functional heterogeneity of the airway epithelium. *Mucosal immunology*, 14(5), 978-990
- Dawson, M. A., Prinjha, R. K., Dittmann, A., Giotopoulos, G., Bantscheff, M., Chan, W. I., ... & Kouzarides, T. (2011). Inhibition of BET recruitment to chromatin as an effective treatment for MLL-fusion leukaemia. *Nature*, 478(7370), 529-533
- Dawson, R. E., Jenkins, B. J., & Saad, M. I. (2021). IL-6 family cytokines in respiratory health and disease. *Cytokine*, 143, 155520
- de Jong, P. M., van Sterkenburg, M. A., Hesselting, S. C., Kempenaar, J. A., Mulder, A. A., Mommaas, A. M., ... & Ponec, M. (1994). Ciliogenesis in human bronchial epithelial cells cultured at the air-liquid interface. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 10(3), 271-277
- DeMaio, L., Tseng, W., Balverde, Z., Alvarez, J. R., Kim, K. J., Kelley, D. G., ... & Borok, Z. (2009). Characterization of mouse alveolar epithelial cell monolayers. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 296(6), L1051-L1058
- Deslee, G., Dury, S., Perotin, J. M., Al Alam, D., Vitry, F., Boxio, R., ... & Belaaouaj, A. (2007). Bronchial epithelial spheroids: an alternative culture model to investigate epithelium inflammation-mediated COPD. *Respiratory research*, 8, 1-13
- Devaiah, B. N., Case-Borden, C., Gegonne, A., Hsu, C. H., Chen, Q., Meerzaman, D., ... & Singer, D. S. (2016). BRD4 is a histone acetyltransferase that evicts nucleosomes from chromatin. *Nature structural & molecular biology*, 23(6), 540-548
- Devalia, J. L., Sapsford, R. J., Rusznak, C., Toumbis, M. J., & Davies, R. J. (1992). The effects of salmeterol and salbutamol on ciliary beat frequency of cultured human bronchial epithelial cells, in vitro. *Pulmonary pharmacology*, 5(4), 257-263.
- Di Micco, R., Fontanals-Cirera, B., Low, V., Ntziachristos, P., Yuen, S. K., Lovell, C. D., ... & Hernando, E. (2014). Control of embryonic stem cell identity by BRD4-dependent transcriptional elongation of super-enhancer-associated pluripotency genes. *Cell reports*, 9(1), 234-247
- Díaz Chamorro, S. (2023). Regulación de la expresión de la citoquina IL6 en el tejido adiposo y su función fisiológica en el epitelio respiratorio.

- Díaz-Coránguez, M., Liu, X., & Antonetti, D. A. (2019). Tight junctions in cell proliferation. *International journal of molecular sciences*, 20(23), 5972
- Diaz, F., Gravotta, D., Deora, A., Schreiner, R., Schoggins, J., Falck-Pedersen, E., & Rodriguez-Boulan, E. (2009). Clathrin adaptor AP1B controls adenovirus infectivity of epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(27), 11143-11148
- Didon, L., Zwick, R. K., Chao, I. W., Walters, M. S., Wang, R., Hackett, N. R., & Crystal, R. G. (2013). RFX3 modulation of FOXJ1 regulation of cilia genes in the human airway epithelium. *Respiratory research*, 14(1), 1-13
- Dobbs, L. G., Pian, M. S., Maglio, M., Dumars, S., & Allen, L. (1997). Maintenance of the differentiated type II cell phenotype by culture with an apical air surface. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 273(2), L347-L354.
- Dye, B. R., Hill, D. R., Ferguson, M. A., Tsai, Y. H., Nagy, M. S., Dyal, R., ... & Spence, J. R. (2015). In vitro generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. *elife*, 4, e05098.
- Ebnet, K. (2017). Junctional adhesion molecules (JAMs): cell adhesion receptors with pleiotropic functions in cell physiology and development. *Physiological reviews*
- Ebnet, K., Schulz, C. U., zu Brickwedde, M. K. M., Pendl, G. G., & Vestweber, D. (2000). Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. *Journal of Biological Chemistry*, 275(36), 27979-27988
- Ebnet, K., Suzuki, A., Ohno, S., & Vestweber, D. (2004). Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions?. *Journal of cell science*, 117(1), 19-29
- Endter, S., Francombe, D., Ehrhardt, C., & Gumbleton, M. (2009). RT-PCR analysis of ABC, SLC and SLCO drug transporters in human lung epithelial cell models. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61(5), 583-591.
- Fernandez-Borja, M., Janssen, L., Verwoerd, D., Hordijk, P., & Neefjes, J. (2005). RhoB regulates endosome transport by promoting actin assembly on endosomal membranes through Dia1. *Journal of cell science*, 118(12), 2661-2670.
- Fielding, C. A., McLoughlin, R. M., McLeod, L., Colmont, C. S., Najdovska, M., Grail, D., ... & Jenkins, B. J. (2008). IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via STAT3. *The journal of immunology*, 181(3), 2189-2195.
- Filippakopoulos, P., Qi, J., Picaud, S., Shen, Y., Smith, W. B., Fedorov, O., ... & Bradner, J. E. (2010). Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature*, 468(7327), 1067-1073

- Franzdóttir, S. R., Axelsson, I. T., Arason, A. J., Baldursson, Ó., Gudjonsson, T., & Magnusson, M. K. (2010). Airway branching morphogenesis in three dimensional culture. *Respiratory research*, 11(1), 1-10.
- French, C. A., Ramirez, C. L., Kolmakova, J., Hickman, T. T., Cameron, M. J., Thyne, M. E., ... & Aster, J. C. (2008). BRD–NUT oncoproteins: a family of closely related nuclear proteins that block epithelial differentiation and maintain the growth of carcinoma cells. *Oncogene*, 27(15), 2237-2242.
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., & Tsukita, S. (1998). Claudin-1 and-2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *The Journal of cell biology*, 141(7), 1539-1550
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., & Tsukita, S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *The Journal of cell biology*, 123(6), 1777-1788
- Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K., & Tsukita, S. (1998). A single gene product, claudin-1 or-2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *The Journal of cell biology*, 143(2), 391-401
- Gamsjaeger, R., Webb, S. R., Lamonica, J. M., Billin, A., Blobel, G. A., & Mackay, J. P. (2011). Structural basis and specificity of acetylated transcription factor GATA1 recognition by BET family bromodomain protein Brd3. *Molecular and cellular biology*, 31(13), 2632-2640
- Garcia-Gutierrez, P., Mundi, M., & Garcia-Dominguez, M. (2012). Association of bromodomain BET proteins with chromatin requires dimerization through the conserved motif B. *Journal of cell science*, 125(15), 3671-3680.
- Garrido Jiménez, S., Barrera López, J. F., Díaz Chamorro, S., Mateos Quiros, C. M., Rodríguez Blanco, I., Márquez Pérez, F. L., ... & Carvajal González, J. M. (2021). p53 regulation by MDM2 contributes to self-renewal and differentiation of basal stem cells in mouse and human airway epithelium.
- Garrido-Jimenez, S., Roman, A. C., & Carvajal-Gonzalez, J. M. (2019). Diminished expression of fat and Dachshous PCP proteins impaired centriole planar polarization in Drosophila. *Frontiers in Genetics*, 10, 328
- Garth, J., Barnes, J. W., and Krick, S. (2018). Targeting Cytokines as Evolving Treatment Strategies in Chronic Inflammatory Airway Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 19. doi:10.3390/ijms19113402
- Glikli, G., Ebnet, K., Aurrand-Lions, M., Imhof, B. A., & Adams, R. H. (2004). Spermatid differentiation requires the assembly of a cell polarity complex downstream of junctional adhesion molecule-C. *Nature*, 431(7006), 320-324

- Gómez-López, S., Whiteman, Z. E., & Janes, S. M. (2021). Mapping lung squamous cell carcinoma pathogenesis through in vitro and in vivo models. *Communications Biology*, 4(1), 937.
- Gomperts, B. N., Gong-Cooper, X., & Hackett, B. P. (2004). Foxj1 regulates basal body anchoring to the cytoskeleton of ciliated pulmonary epithelial cells. *Journal of cell science*, 117(8), 1329-1337
- Gomperts, B.N., Gong-Cooper, X. & Hackett, B.P. Foxj1 regulates basal body anchoring to the cytoskeleton of ciliated pulmonary epithelial cells. **117**, 1329-1337 (2004).
- Gravotta, D., Carvajal-Gonzalez, J. M., Mattera, R., Deborde, S., Banfelder, J. R., Bonifacino, J. S., & Rodriguez-Boulan, E. (2012). The clathrin adaptor AP-1A mediates basolateral polarity. *Developmental cell*, 22(4), 811-823.
- Greene, C., Campbell, M., & Janigro, D. (2019). Fundamentals of Brain–Barrier Anatomy and Global Functions. In *Nervous System Drug Delivery* (pp. 3-20). Academic Press
- Grimshaw, K. M., Hunter, L. J. K., Yap, T. A., Heaton, S. P., Walton, M. I., Woodhead, S. J., ... & Garrett, M. D. (2010). AT7867 is a potent and oral inhibitor of AKT and p70 S6 kinase that induces pharmacodynamic changes and inhibits human tumor xenograft growth. *Molecular cancer therapeutics*, 9(5), 1100-1110.
- Günzel, D., & Yu, A. S. (2013). Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiological reviews*, 93(2), 525-569
- Hammer, C., Linke, R., Wagner, F., & Diefenbeck, M. (1998). Organs from animals for man. *International archives of allergy and immunology*, 116(1), 5-21
- Hanna, J., Cheng, A. W., Saha, K., Kim, J., Lengner, C. J., Soldner, F., ... & Jaenisch, R. (2010). Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(20), 9222-9227.
- Harris, A. (1997). Towards an ovine model of cystic fibrosis. *Human molecular genetics*, 6(13), 2191-2193.
- Hartmann, C., Schwietzer, Y. A., Otani, T., Furuse, M., & Ebnet, K. (2020). Physiological functions of junctional adhesion molecules (JAMs) in tight junctions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1862(9), 183299.
- Hawkins, F. J., Suzuki, S., Beermann, M. L., Barillà, C., Wang, R., Villacorta-Martin, C., ... & Kotton, D. N. (2021). Derivation of airway basal stem cells from human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 28(1), 79-95.
- Hawkins, F., Kramer, P., Jacob, A., Driver, I., Thomas, D. C., McCauley, K. B., ... & Kotton, D. N. (2017). Prospective isolation of NKX2-1–expressing human lung

- progenitors derived from pluripotent stem cells. *The Journal of clinical investigation*, 127(6), 2277-2294.
- Henjakovic, M., Sewald, K., Switalla, S., Kaiser, D., Müller, M., Veres, T. Z., ... & Braun, A. (2008). Ex vivo testing of immune responses in precision-cut lung slices. *Toxicology and applied pharmacology*, 231(1), 68-76.
 - Herawati, E., Taniguchi, D., Kanoh, H., Tateishi, K., Ishihara, S., & Tsukita, S. (2016). Multiciliated cell basal bodies align in stereotypical patterns coordinated by the apical cytoskeleton. *Journal of Cell Biology*, 214(5), 571-586
 - Herriges, M., & Morrisey, E. E. (2014). Lung development: orchestrating the generation and regeneration of a complex organ. *Development*, 141(3), 502-513
 - Hirano, Y., Ode, Y., Ochani, M., Wang, P., & Aziz, M. (2018). Targeting junctional adhesion molecule-C ameliorates sepsis-induced acute lung injury by decreasing CXCR4+ aged neutrophils. *Journal of leukocyte biology*, 104(6), 1159-1171
 - Hogan BL, Barkauskas CE, Chapman HA, Epstein JA, Jain R, Hsia CC, et al Repair and regeneration of the respiratory system: complexity, plasticity, and mechanisms of lung stem cell function. *Cell Stem Cell* 2014; 15:123–38.
 - Hong, K.U., Reynolds, S.D., Watkins, S., Fuchs, E. & Stripp, B.R. Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. *The American journal of pathology* **164**, 577-588 (2004).
 - HOVENBERG, H. W., DAVIES, J. R., & CARLSTEDT, I. (1996). Different mucins are produced by the surface epithelium and the submucosa in human trachea: identification of MUC5AC as a major mucin from the goblet cells. *Biochemical Journal*, 318(1), 319-324
 - Hsieh, J., Nakashima, K., Kuwabara, T., Mejia, E., & Gage, F. H. (2004). Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(47), 16659-16664
 - Huang, B., Yang, X. D., Zhou, M. M., Ozato, K., & Chen, L. F. (2009). Brd4 coactivates transcriptional activation of NF- κ B via specific binding to acetylated RelA. *Molecular and cellular biology*
 - Imhof, B. A., Zimmerli, C., Gliki, G., Ducrest-Gay, D., Juillard, P., Hammel, P., ... & Aurrand-Lions, M. (2007). Pulmonary dysfunction and impaired granulocyte homeostasis result in poor survival of Jam-C-deficient mice. *The Journal of pathology*, 212(2), 198-208
 - Imhof, B. A., Zimmerli, C., Gliki, G., Ducrest-Gay, D., Juillard, P., Hammel, P., ... & Aurrand-Lions, M. (2007). Pulmonary dysfunction and impaired granulocyte homeostasis result in poor survival of Jam-C-deficient mice. *The Journal of pathology*, 212(2), 198-208.

- Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., & Tsukita, S. (1999). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *The Journal of cell biology*, 147(6), 1351-1363
- Jiang, X. C. (2013). Generation of general and tissue-specific gene knockout mouse models. *Lipoproteins and Cardiovascular Disease: Methods and Protocols*, 253-271.
- Jiménez, S. G. (2022). Rutas moleculares que determinan el posicionamiento de los centriolos en células de drosophila y la diferenciación del epitelio respiratorio de vertebrados (Doctoral dissertation, Universidad de Extremadura)
- Judge, E. P., Hughes, J. L., Egan, J. J., Maguire, M., Molloy, E. L., & O'Dea, S. (2014). Anatomy and bronchoscopy of the porcine lung. A model for translational respiratory medicine. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 51(3), 334-343.
- Junk, D.J. *et al.* Different mutant/wild-type p53 combinations cause a spectrum of increased invasive potential in nonmalignant immortalized human mammary epithelial cells. *Neoplasia (New York, N.Y.)* **10**, 450-461 (2008). Laemmli
- Kanno, T., Kanno, Y., LeRoy, G., Campos, E., Sun, H. W., Brooks, S. R., ... & Ozato, K. (2014). BRD4 assists elongation of both coding and enhancer RNAs by interacting with acetylated histones. *Nature structural & molecular biology*, 21(12), 1047-1057
- Kanno, T., Kanno, Y., Siegel, R. M., Jang, M. K., Lenardo, M. J., & Ozato, K. (2004). Selective recognition of acetylated histones by bromodomain proteins visualized in living cells. *Molecular cell*, 13(1), 33-43.
- Kasper, J. Y., Hermanns, M. I., Unger, R. E., & Kirkpatrick, C. J. (2017). A responsive human triple-culture model of the air–blood barrier: incorporation of different macrophage phenotypes. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 11(4), 1285-1297
- Keiper, T., Santoso, S., Nawroth, P. P., Orlova, V., & Chavakis, T. (2005). The role of junctional adhesion molecules in cell-cell interactionsThe role of junctional adhesion. *Histology and histopathology*
- Kim, M., Mun, H., Sung, C. O., Cho, E. J., Jeon, H. J., Chun, S. M., ... & Jang, S. J. (2019). Patient-derived lung cancer organoids as in vitro cancer models for therapeutic screening. *Nature communications*, 10(1), 3991.
- Konishi, S., Gotoh, S., Tateishi, K., Yamamoto, Y., Korogi, Y., Nagasaki, T., ... & Mishima, M. (2016). Directed induction of functional multi-ciliated cells in proximal airway epithelial spheroids from human pluripotent stem cells. *Stem cell reports*, 6(1), 18-25.
- Kostelnik, K. B., Barker, A., Schultz, C., Mitchell, T. P., Rajeeve, V., White, I. J., ... & Nightingale, T. D. (2019). Dynamic trafficking and turnover of JAM-C is essential for endothelial cell migration. *PLoS biology*, 17(12), e3000554.

- Kummer, D., & Ebnet, K. (2018). Junctional adhesion molecules (JAMs): the JAM-integrin connection. *Cells*, 7(4), 25
- Kunath, T., Saba-El-Leil, M. K., Almousailleakh, M., Wray, J., Meloche, S., & Smith, A. (2007). FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. doi:10.1038/227680a0.
- Leeman, K. T., Fillmore, C. M., and Kim, C. F. (2014). “Chapter Eight - Lung Stem and Progenitor Cells in Tissue Homeostasis and Disease,” in *Stem Cells in Development and Disease*, ed. M. B. T.-C. T. in D. B. Rendl (Academic Press), 207–233.
- LeRoy, G., Rickards, B., & Flint, S. J. (2008). The double bromodomain proteins Brd2 and Brd3 couple histone acetylation to transcription. *Molecular cell*, 30(1), 51-60
- Li, X., Zhao, Y., Tian, B., Jamaluddin, M., Mitra, A., Yang, J., ... & Kudlicki, A. (2014). Modulation of gene expression regulated by the transcription factor NF- κ B/RelA. *Journal of Biological Chemistry*, 289(17), 11927-11944.
- Lordan, J. L., Davies, D. E., Wilson, S. J., Dent, G., Corkhill, A., Jaffar, Z., ... & Holgate, S. T. (2001). The role of CD28-B7 costimulation in allergen-induced cytokine release by bronchial mucosa from patients with moderately severe asthma. *Journal of allergy and clinical immunology*, 108(6), 976-981.
- Loret, T., Peyret, E., Dubreuil, M., Aguerre-Chariol, O., Bressot, C., Le Bihan, O., ... & Lacroix, G. (2016). Air-liquid interface exposure to aerosols of poorly soluble nanomaterials induces different biological activation levels compared to exposure to suspensions. *Particle and Fibre Toxicology*, 13, 1-21
- Lu, Y., Bertran, S., Samuels, T. A., Mira-y-Lopez, R., & Farias, E. F. (2010). Mechanism of inhibition of MMTV-neu and MMTV-wnt1 induced mammary oncogenesis by RAR α agonist AM580. *Oncogene*, 29(25), 3665-3676
- Maina, J. N., & van Gils, P. (2001). Morphometric characterization of the airway and vascular systems of the lung of the domestic pig, *Sus scrofa*: comparison of the airway, arterial and venous systems. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 130(4), 781-798
- Malavia, N. K., Raub, C. B., Mahon, S. B., Brenner, M., Panettieri Jr, R. A., & George, S. C. (2009). Airway epithelium stimulates smooth muscle proliferation. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 41(3), 297-304.
- Mandell, K. J., & Parkos, C. A. (2005). The JAM family of proteins. *Advanced drug delivery reviews*, 57(6), 857-867
- Martín-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., ... & Dejana, E. (1998). Junctional adhesion molecule, a novel member

- of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *The Journal of cell biology*, 142(1), 117-127
- McCarron, A., Parsons, D., & Donnelley, M. (2021). Animal and cell culture models for cystic fibrosis: which model is right for your application?. *The American Journal of Pathology*, 191(2), 228-242.
 - McCauley, K. B., Hawkins, F., Serra, M., Thomas, D. C., Jacob, A., & Kotton, D. N. (2017). Efficient derivation of functional human airway epithelium from pluripotent stem cells via temporal regulation of Wnt signaling. *Cell stem cell*, 20(6), 844-857.
 - McDowell, E. M., Becci, P. J., Schürch, W., & Trump, B. F. (1979). The respiratory epithelium. VII. Epidermoid metaplasia of hamster tracheal epithelium during regeneration following mechanical injury. *Journal of the National Cancer Institute*, 62(4), 995-1008.
 - McLoughlin, R. M., Witowski, J., Robson, R. L., Wilkinson, T. S., Hurst, S. M., Williams, A. S., ... & Topley, N. (2003). Interplay between IFN- γ and IL-6 signaling governs neutrophil trafficking and apoptosis during acute inflammation. *The Journal of clinical investigation*, 112(4), 598-607.
 - Meeusen, E. N., Snibson, K. J., Hirst, S. J., & Bischof, R. J. (2009). Sheep as a model species for the study and treatment of human asthma and other respiratory diseases. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 6(4), 101-106.
 - Mok, K. W., Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. (2013). Regulation of blood–testis barrier (BTB) dynamics during spermatogenesis via the “Yin” and “Yang” effects of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) and mTORC2. *International review of cell and molecular biology*, 301, 291-358.
 - Müller, L., Riediker, M., Wick, P., Mohr, M., Gehr, P., & Rothen-Rutishauser, B. (2010). Oxidative stress and inflammation response after nanoparticle exposure: differences between human lung cell monocultures and an advanced three-dimensional model of the human epithelial airways. *Journal of the Royal Society Interface*, 7(suppl_1), S27-S40.
 - Nakajima, M. *et al.* Immunohistochemical and ultrastructural studies of basal cells, Clara cells and bronchiolar cuboidal cells in normal human airways. *Pathology international* **48**, 944-953 (1998).
 - Nakajima, Y., Kawanami, O., Jin, E., Ghazizadeh, M., Honda, M., Asano, G., ... & Ferrans, V. J. (1998). Immunohistochemical and ultrastructural studies of basal cells, Clara cells and bronchiolar cuboidal cells in normal human airways. *Pathology international*, 48(12), 944-953
 - Nehru, V., Voytyuk, O., Lennartsson, J., & Aspenström, P. (2013). RhoD binds the Rab5 effector Rabankyrin-5 and has a role in trafficking of the platelet-derived growth factor receptor. *Traffic*, 14(12), 1242-1254.

- Nelson, K., Bobba, C., Ghadiali, S., Hayes Jr, D., Black, S. M., & Whitson, B. A. (2014). Animal models of ex vivo lung perfusion as a platform for transplantation research. *World journal of experimental medicine*, 4(2), 7.
- Nicodeme, E., Jeffrey, K. L., Schaefer, U., Beinke, S., Dewell, S., Chung, C. W., ... & Tarakhovsky, A. (2010). Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic. *Nature*, 468(7327), 1119-1123
- Nourshargh, S., Woodfin, A., Voisin, M. B., Bauer, M., Colom, B., Caille, D., ... & Imhof, B. A. (2011). Junctional adhesion molecule-C (JAM-C) regulates polarized neutrophil transendothelial cell migration in vivo. *Nature Immunology*
- Olsson, I. A. S., Silva, S. P. D., Townend, D., & Sandøe, P. (2017). Protecting animals and enabling research in the European Union: An overview of development and implementation of directive 2010/63/EU. *ILAR journal*, 57(3), 347-357.
- Orlova, V. V., Economopoulou, M., Lupu, F., Santoso, S., & Chavakis, T. (2006). Junctional adhesion molecule-C regulates vascular endothelial permeability by modulating VE-cadherin-mediated cell-cell contacts. *The Journal of experimental medicine*, 203(12), 2703-2714
- Otani, T., & Furuse, M. (2020). Tight junction structure and function revisited. *Trends in cell biology*, 30(10), 805-817.
- Otani, T., Nguyen, T. P., Tokuda, S., Sugihara, K., Sugawara, T., Furuse, K., ... & Furuse, M. (2019). Claudins and JAM-A coordinately regulate tight junction formation and epithelial polarity. *Journal of Cell Biology*, 218(10), 3372-3396
- Pais, R. S. D. D. (2014). *Función de IGF1 e IGF1R en el desarrollo del pulmón de ratón* (Doctoral dissertation, Universidad de Salamanca).
- Pardo-Saganta, A., Tata, P. R., Law, B. M., Saez, B., Chow, R. D. W., Prabhu, M., ... & Rajagopal, J. (2015). Parent stem cells can serve as niches for their daughter cells. *Nature*, 523(7562), 597-601.
- Pellegrini, M., Claps, G., Orlova, V. V., Barrios, F., Dolci, S., Geremia, R., ... & Nussenzweig, A. (2011). Targeted JAM-C deletion in germ cells by Spo11-controlled Cre recombinase. *Journal of cell science*, 124(1), 91-99.
- Pezzulo, A. A., Starner, T. D., Scheetz, T. E., Traver, G. L., Tilley, A. E., Harvey, B. G., ... & Zabner, J. (2011). The air-liquid interface and use of primary cell cultures are important to recapitulate the transcriptional profile of in vivo airway epithelia. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 300(1), L25-L31
- Pinkerton, K.E. *et al.* Differentiated bronchiolar epithelium in alveolar ducts of rats exposed to ozone for 20 months. *The American journal of pathology* **142**, 947-956 (1993).

- Plasschaert, L. W., Žilionis, R., Choo-Wing, R., Savova, V., Knehr, J., Roma, G., ... & Jaffe, A. B. (2018). A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. *Nature*, 560(7718), 377-381
- Plasschaert, L. W., Žilionis, R., Choo-Wing, R., Savova, V., Knehr, J., Roma, G., ... & Jaffe, A. B. (2018). A single cell atlas of the tracheal epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. *Nature*, 560(7718), 377
- Pohl, C., Hofmann, H., Moisch, M., Papritz, M., Hermanns, M. I., Dei-Anang, J., ... & Kirkpatrick, C. J. (2010). Acute cytotoxicity and apoptotic effects after I-Pam exposure in different cocultures of the proximal and distal respiratory system. *Journal of biotechnology*, 148(1), 31-37.
- Rahman, S., Sowa, M. E., Ottinger, M., Smith, J. A., Shi, Y., Harper, J. W., & Howley, P. M. (2011). The Brd4 extraterminal domain confers transcription activation independent of pTEFb by recruiting multiple proteins, including NSD3. *Molecular and cellular biology*, 31(13), 2641-2652
- Ramirez, R. D., Sheridan, S., Girard, L., Sato, M., Kim, Y., Pollack, J., ... & Minna, J. D. (2004). Immortalization of human bronchial epithelial cells in the absence of viral oncoproteins. *Cancer research*, 64(24), 9027-9034
- Randell, S. H., & Boucher, R. C. (2006). Effective mucus clearance is essential for respiratory health. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 35(1), 20-28
- Rawlins, E. L., & Hogan, B. L. (2006). Epithelial stem cells of the lung: privileged few or opportunities for many?.
- Rayner, R. E., Makena, P., Prasad, G. L., & Cormet-Boyaka, E. (2019). Optimization of normal human bronchial epithelial (NHBE) cell 3D cultures for in vitro lung model studies. *Scientific reports*, 9(1), 500
- Rock, J. R., Onaitis, M. W., Rawlins, E. L., Lu, Y., Clark, C. P., Xue, Y., ... & Hogan, B. L. (2009). Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), 12771-12775.
- Rock, J. R., Randell, S. H., & Hogan, B. L. (2010). Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Disease models & mechanisms*, 3(9-10), 545-556
- Roman, A. C., Garrido-Jimenez, S., Diaz-Chamorro, S., Centeno, F., & Carvajal-Gonzalez, J. M. (2019). Centriole positioning: not just a little dot in the cell. *The Golgi Apparatus and Centriole: Functions, Interactions and Role in Disease*, 201-221.
- Ruiz García, S., Deprez, M., Lebrigand, K., Cavard, A., Paquet, A., Arguel, M. J., ... & Zaragosi, L. E. (2019). Novel dynamics of human mucociliary differentiation

- revealed by single-cell RNA sequencing of nasal epithelial cultures. *Development*, 146(20), dev177428
- Sachs, N., Papaspyropoulos, A., Zomer-van Ommen, D. D., Heo, I., Böttinger, L., Klay, D., ... & Clevers, H. (2019). Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. *The EMBO journal*, 38(4), e100300.
 - Sakamoto, A., Matsumaru, T., Yamamura, N., Uchida, Y., Tachikawa, M., Ohtsuki, S., & Terasaki, T. (2013). Quantitative expression of human drug transporter proteins in lung tissues: Analysis of regional, gender, and interindividual differences by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical sciences*, 102(9), 3395-3406.
 - Schreiner, R., Frindt, G., Diaz, F., Carvajal-Gonzalez, J. M., Bay, A. E. P., Palmer, L. G., ... & Rodriguez-Boulan, E. (2010). The absence of a clathrin adapter confers unique polarity essential to proximal tubule function. *Kidney international*, 78(4), 382-388.
 - Seibold, M. A., Smith, R. W., Urbanek, C., Groshong, S. D., Cosgrove, G. P., Brown, K. K., ... & Reynolds, S. D. (2013). The idiopathic pulmonary fibrosis honeycomb cyst contains a mucociliary pseudostratified epithelium. *PloS one*, 8(3), e58658.
 - Selo, M. A., Sake, J. A., Kim, K. J., & Ehrhardt, C. (2021). In vitro and ex vivo models in inhalation biopharmaceutical research—advances, challenges and future perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 177, 113862.
 - Seok, J., Warren, H. S., Cuenca, A. G., Mindrinos, M. N., Baker, H. V., Xu, W., ... & Wong, W. H. (2013). Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(9), 3507-3512.
 - Shang, E., Salazar, G., Crowley, T. E., Wang, X., Lopez, R. A., Wang, X., & Wolgemuth, D. J. (2004). Identification of unique, differentiation stage-specific patterns of expression of the bromodomain-containing genes Brd2, Brd3, Brd4, and Brd4 in the mouse testis. *Gene Expression Patterns*, 4(5), 513-519.
 - Shen, L., Weber, C. R., Raleigh, D. R., Yu, D., & Turner, J. R. (2011). Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. *Annual review of physiology*, 73, 283-309
 - Shigetomi, K., Ono, Y., Inai, T., & Ikenouchi, J. (2018). Adherens junctions influence tight junction formation via changes in membrane lipid composition. *Journal of Cell Biology*, 217(7), 2373-2381
 - Sironen, A., Shoemark, A., Patel, M., Loebinger, M. R., & Mitchison, H. M. (2020). Sperm defects in primary ciliary dyskinesia and related causes of male infertility. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77, 2029-2048
 - Sleigh, M. A., Blake, J. R., & Liron, N. (1988). The propulsion of mucus by cilia. *American Review of Respiratory Disease*, 137(3), 726-741

- Spella, M., Lilis, I., & Stathopoulos, G. T. (2017). Shared epithelial pathways to lung repair and disease. *European Respiratory Review*, 26(144).
- Stauber, M. *et al.* Identification of FOXJ1 effectors during ciliogenesis in the foetal respiratory epithelium and embryonic left-right organiser of the mouse. *Developmental Biology* **423**, 170-188 (2017).
- Stauber, M., Weidemann, M., Dittrich-Breiholz, O., Lobschat, K., Alten, L., Mai, M., ... & Gossler, A. (2017). Identification of FOXJ1 effectors during ciliogenesis in the foetal respiratory epithelium and embryonic left-right organiser of the mouse. *Developmental biology*, 423(2), 170-188
- Stavridis, M. P., Lunn, J. S., Collins, B. J., & Storey, K. G. (2007). A discrete period of FGF-induced Erk1/2 signalling is required for vertebrate neural specification
- Steed, E., Rodrigues, N. T., Balda, M. S., & Matter, K. (2009). Identification of MarvelD3 as a tight junction-associated transmembrane protein of the occludin family. *BMC cell biology*, 10, 1-14
- Stonestrom, A. J., Hsu, S. C., Jahn, K. S., Huang, P., Keller, C. A., Giardine, B. M., ... & Blobel, G. A. (2015). Functions of BET proteins in erythroid gene expression. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 125(18), 2825-2834
- Stupnikov, M. R., Yang, Y., Mori, M., Lu, J., & Cardoso, W. V. (2019). Jagged and Delta-like ligands control distinct events during airway progenitor cell differentiation. *Elife*, 8, e50487.
- Switalla, S., Lauenstein, L., Prenzler, F., Knothe, S., Förster, C., Fieguth, H. G., ... & Sewald, K. (2010). Natural innate cytokine response to immunomodulators and adjuvants in human precision-cut lung slices. *Toxicology and applied pharmacology*, 246(3), 107-115.
- Tabor, H. K., Risch, N. J., & Myers, R. M. (2002). Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nature Reviews Genetics*, 3(5), 391-397
- Tadokoro, T., Wang, Y., Barak, L. S., Bai, Y., Randell, S. H., & Hogan, B. L. (2014). IL-6/STAT3 promotes regeneration of airway ciliated cells from basal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(35), E3641-E3649
- Tam, A., Wadsworth, S., Dorscheid, D., Man, S. P., & Sin, D. D. (2011). The airway epithelium: more than just a structural barrier. *Therapeutic advances in respiratory disease*, 5(4), 255-273
- Tang, M. L., Wilson, J. W., Stewart, A. G., & Royce, S. G. (2006). Airway remodelling in asthma: current understanding and implications for future therapies. *Pharmacology & therapeutics*, 112(2), 474-488

- Thompson, H. G. R., Mih, J. D., Krasieva, T. B., Tromberg, B. J., & George, S. C. (2006). Epithelial-derived TGF- β 2 modulates basal and wound-healing subepithelial matrix homeostasis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 291(6), L1277-L1285.
- Tissir, F., Qu, Y., Montcouquiol, M., Zhou, L., Komatsu, K., Shi, D., ... & Goffinet, A. M. (2010). Lack of cadherins Celsr2 and Celsr3 impairs ependymal ciliogenesis, leading to fatal hydrocephalus. *Nature neuroscience*, 13(6), 700-707
- Tomei, A. A., Choe, M. M., & Swartz, M. A. (2008). Effects of dynamic compression on lentiviral transduction in an in vitro airway wall model. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 294(1), L79-L86
- Tsao, M. S., Marguet, S., Le Teuff, G., Lantuejoul, S., Shepherd, F. A., Seymour, L., ... & Brambilla, E. M. (2015). Subtype classification of lung adenocarcinoma predicts benefit from adjuvant chemotherapy in patients undergoing complete resection. *Journal of clinical oncology*, 33(30), 3439.
- Tsao, P.N. *et al.* Notch signaling controls the balance of ciliated and secretory cell fates in developing airways. *Development (Cambridge, England)* **136**, 2297-2307 (2009).
- Tsume, M., Kimura-Yoshida, C., Mochida, K., Shibukawa, Y., Amazaki, S., Wada, Y., ... & Matsuo, I. (2012). Brd2 is required for cell cycle exit and neuronal differentiation through the E2F1 pathway in mouse neuroepithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 425(4), 762-768
- Ujiie, H., Kadota, K., Chaft, J. E., Buitrago, D., Sima, C. S., Lee, M. C., ... & Adusumilli, P. S. (2015). Solid predominant histologic subtype in resected stage I lung adenocarcinoma is an independent predictor of early, extrathoracic, multisite recurrence and of poor postrecurrence survival. *Journal of clinical oncology*, 33(26), 2877.
- Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., ... & Tsukita, S. (2006). ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell*, 126(4), 741-754
- Usami, F. M., Arata, M., Shi, D., Oka, S., Higuchi, Y., Tissir, F., *et al.* (2021). Intercellular and intracellular cilia orientation is coordinated by CELSR1 and CAMSAP3 in oviduct multi-ciliated cells. *Journal of Cell Science* 134. doi:10.1242/jcs.257006.
- Usami, F. M., Arata, M., Shi, D., Oka, S., Higuchi, Y., Tissir, F., ... & Fujimori, T. (2021). Intercellular and intracellular cilia orientation is coordinated by CELSR1 and CAMSAP3 in oviduct multi-ciliated cells. *Journal of cell science*, 134(4), jcs257006.

- van Es, J. H., Van Gijn, M. E., Riccio, O., Van Den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., ... & Clevers, H. (2005). Notch/ γ -secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature*, 435(7044), 959-963.
- Vaughan, M. B., Ramirez, R. D., Wright, W. E., Minna, J. D., & Shay, J. W. (2006). A three-dimensional model of differentiation of immortalized human bronchial epithelial cells. *Differentiation*, 74(4), 141-148
- Vijayanand, P., Durkin, K., Hartmann, G., Morjaria, J., Seumois, G., Staples, K. J., ... & Djukanović, R. (2010). Chemokine receptor 4 plays a key role in T cell recruitment into the airways of asthmatic patients. *The Journal of Immunology*, 184(8), 4568-4574.
- Vldar, E. K., Bayly, R. D., Sangoram, A. M., Scott, M. P., & Axelrod, J. D. (2012). Microtubules enable the planar cell polarity of airway cilia. *Current Biology*, 22(23), 2203-2212
- Wahl, A., De, C., Abad Fernandez, M., Lenarcic, E. M., Xu, Y., Cockrell, A. S., ... & Victor Garcia, J. (2019). Precision mouse models with expanded tropism for human pathogens. *Nature biotechnology*, 37(10), 1163-1173.
- Wallmeier, J., Al-Mutairi, D. A., Chen, C. T., Loges, N. T., Pennekamp, P., Menchen, T., ... & Omran, H. (2014). Mutations in CCNO result in congenital mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. *Nature genetics*, 46(6), 646-651
- Wang, A., Ali, A., Keshavjee, S., Liu, M., & Cypel, M. (2020). Ex vivo lung perfusion for donor lung assessment and repair: a review of translational interspecies models. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 319(6), L932-L940.
- Wang, J., & Chen, X. (2022). Junctional adhesion molecules: Potential proteins in atherosclerosis. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 9, 888818.
- Wang, W., Yang, J., Liu, H., Lu, D., Chen, X., Zenonos, Z., ... & Liu, P. (2011). Rapid and efficient reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells by retinoic acid receptor gamma and liver receptor homolog 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(45), 18283-18288.
- Whitcutt, M. J., Adler, K. B., & Wu, R. (1988). A biphasic chamber system for maintaining polarity of differentiation of culture respiratory tract epithelial cells. *In vitro cellular & developmental biology*, 24(5), 420-428
- Wohlsen, A., Martin, C., Vollmer, E., Branscheid, D., Magnussen, H., Becker, W. M., ... & Uhlig, S. (2003). The early allergic response in small airways of human precision-cut lung slices. *European Respiratory Journal*, 21(6), 1024-1032.

- Wottrich, R., Diabaté, S., & Krug, H. F. (2004). Biological effects of ultrafine model particles in human macrophages and epithelial cells in mono-and co-culture. *International journal of hygiene and environmental health*, 207(4), 353-361.
- Wu, X., Peters-Hall, J. R., Bose, S., Pena, M. T., & Rose, M. C. (2011). Human bronchial epithelial cells differentiate to 3D glandular acini on basement membrane matrix. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 44(6), 914-921.
- Xu, M., Yang, W., Wang, X., & Nayak, D. K. (2020). Lung secretoglobin Scgb1a1 influences alveolar macrophage-mediated inflammation and immunity. *Frontiers in Immunology*, 11, 584310
- Xue, J., Zhu, X., George, M. P., Myerburg, M. M., Stoner, M. W., Pilewski, J. W., & Duncan, S. R. (2011). A human-mouse chimeric model of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *The American journal of pathology*, 179(2), 745-753.
- Yang, Y., Riccio, P., Schotsaert, M., Mori, M., Lu, J., Lee, D. K., ... & Cardoso, W. V. (2018). Spatial-temporal lineage restrictions of embryonic p63+ progenitors establish distinct stem cell pools in adult airways. *Developmental cell*, 44(6), 752-761.
- Ying, Q. L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., ... & Smith, A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *nature*, 453(7194), 519-523.
- You, Y., Richer, E. J., Huang, T., & Brody, S. L. (2002). Growth and differentiation of mouse tracheal epithelial cells: selection of a proliferative population. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 283(6), L1315-L1321
- Yu, W., Fang, X., Ewald, A., Wong, K., Hunt, C. A., Werb, Z., ... & Mostov, K. (2007). Formation of cysts by alveolar type II cells in three-dimensional culture reveals a novel mechanism for epithelial morphogenesis. *Molecular biology of the cell*, 18(5), 1693-1700.
- Yu, X., Ng, C. P., Habacher, H., & Roy, S. (2008). Foxj1 transcription factors are master regulators of the motile ciliogenic program. *Nature genetics*, 40(12), 1445-1453
- Zen, K., Babbin, B. A., Liu, Y., Whelan, J. B., Nusrat, A., & Parkos, C. A. (2004). JAM-C is a component of desmosomes and a ligand for CD11b/CD18-mediated neutrophil transepithelial migration. *Molecular biology of the cell*, 15(8), 3926-3937
- Zihni, C., Mills, C., Matter, K., & Balda, M. S. (2016). Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nature reviews Molecular cell biology*, 17(9), 564-580.