



TESIS DOCTORAL

**RUTAS MOLECULARES QUE DETERMINAN EL POSICIONAMIENTO DE LOS CENTRIOLOS EN
CÉLULAS DE *DROSOPHILA* Y LA DIFERENCIACIÓN DEL EPITELIO RESPIRATORIO DE
VERTEBRADOS**

SERGIO GARRIDO JIMÉNEZ

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

2022



TESIS DOCTORAL

**RUTAS MOLECULARES QUE DETERMINAN EL POSICIONAMIENTO DE LOS CENTRIOLOS EN
CÉLULAS DE *DROSOPHILA* Y LA DIFERENCIACIÓN DEL EPITELIO RESPIRATORIO DE
VERTEBRADOS**

SERGIO GARRIDO JIMÉNEZ

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

**LA CONFORMIDAD DEL DIRECTOR DE LA TESIS CONSTA EN EL ORIGINAL EN
PAPEL DE ESTA TESIS DOCTORAL**

Fdo. José María Carvajal González

2022

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
-------------------	---

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN CAPÍTULO I

1. Centriolos, centrosomas y cuerpos basales.....	9
1.1. Estructura de los centriolos y cuerpos basales.....	11
1.2. Posicionamiento de los centrosomas y cuerpos basales durante la interfase.....	14
2. Polaridad Celular.....	16
2.1. Polaridad Apical/Basolateral.....	17
2.2. Polaridad Celular Planar (PCP).....	18
2.3. La ruta de PCP y su conexión con el citoesqueleto.....	24
3. La ruta de Fz-PCP y el posicionamiento de los centriolos en <i>Drosophila</i>.....	27

OBJETIVOS CAPÍTULO I

Objetivos Capítulo I.....	33
---------------------------	----

RESULTADOS CAPÍTULO I

1. Estrategia para el análisis de fenotipos de PCP.....	39
2. Validación de las líneas de <i>Drosophila</i> con ARNi para los efectores de PCP.....	41
3. Métodos para el análisis de polarización de los centriolos.....	47
4. Las células con defectos de PPE no presentan alteraciones en la polaridad de los centriolos.....	49
5. La polimerización de actina es necesaria para la adquisición de la polaridad de los centriolos.....	53
6. Desarrollo del método RCPD para el estudio de la distribución de los centriolos.....	56
7. Las células con defectos de PPE no presentan alteraciones en la polaridad de los centriolos utilizando RCPD.....	59
8. El bloqueo de la polimerización de actina altera el posicionamiento de los centriolos empleando RCPD.....	61

9. La distribución de los centriolos en células defectivas para miembros de la ruta de Fz-PCP no está asociada a la orientación de las quetas de actina.....	63
10. La ruta de Ft/Ds PCP está implicada en la polaridad de los centriolos en <i>Drosophila</i>	65

DISCUSIÓN CAPÍTULO I

Discusión Capítulo I.....	71
---------------------------	----

CONCLUSIONES CAPÍTULO I

Conclusiones Capítulo I.....	79
------------------------------	----

CAPÍTULO II

INTRODUCCIÓN CAPÍTULO II

1. Desarrollo y configuración del epitelio respiratorio.....	85
1.1. Células Basales.....	89
1.2. Células Secretoras.....	90
1.3. Células Multiciliadas.....	92
2. Rutas moleculares que median la diferenciación de Células Multiciliadas.....	92

OBJETIVOS CAPÍTULO II

Objetivos Capítulo II.....	97
----------------------------	----

RESULTADOS CAPÍTULO II

1. Análisis <i>in silico</i> de factores de transcripción de que median la diferenciación de células multiciliadas.....	103
2. Caracterización del cultivo <i>in vitro</i> de células basales de la tráquea de ratón....	105
3. Los niveles de p53 varían a lo largo de la diferenciación.....	108
4. P53 sufre modificaciones postraduccionales a lo largo de la diferenciación.....	109
5. Los niveles de la ubiquitina ligasa MDM2 varían durante la diferenciación.....	111
6. MDM2 se expresa mayoritariamente en células multiciliadas.....	112

7. La expresión de otras E3-Ubiquitina ligasa no se ve enriquecida en las distintas poblaciones celulares.....	113
8. La modulación de los niveles de p53 y MDM2 afecta a la diferenciación de las células basales de las vías respiratorias:	
8.1. Silenciamiento de p53.....	115
8.2. Silenciamiento de MDM2.....	118
8.3. Sobreexpresión de p53 WT y p53 R175H.....	120
9. MDM2 regula los niveles de p53 durante la diferenciación.....	122
10. La regulación de MDM2 sobre p53 promueve la diferenciación celular en el sistema respiratorio murino.....	125
11. p53 bloquea la diferenciación de las células multiciliadas.....	128
12. El tratamiento con AMG232 y Nutlin3a provoca defectos en la formación de los cilios.....	129
13. La modulación de los niveles de p53 afecta a la densidad celular, pero no altera la integridad del epitelio respiratorio.....	131
14. El fenotipo producido por la inhibición de la interacción MDM2/p53 se revierte tras la retirada del fármaco.....	134
15. La inhibición de la interacción MDM2/p53 no afecta a las células una vez diferenciadas.....	137
16. La interacción MDM2/p53 regula la proliferación de las células progenitoras de las vías respiratorias.....	139
17. La interacción MDM2/p53 regula el ciclo celular.....	143
18. La inhibición de la interacción MDM2/p53 no incrementa los niveles de apoptosis ni senescencia celular.....	144
19. La interacción MDM2/p53 regula la diferenciación de las células basales de las vías respiratorias humanas.....	145
20. El tratamiento con Nutlin3a reduce la densidad celular en los cultivos del epitelio respiratorio humano.....	148
21. MDM2 regula la proliferación de células basales en vías respiratorias humanas.....	150

DISCUSIÓN CAPÍTULO II

Discusión capítulo II.....	153
----------------------------	-----

CONCLUSIONES CAPÍTULO II

Conclusiones capítulo II.....	163
-------------------------------	-----

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Métodos en *Drosophila melanogaster*

1.1. Cría y mantenimiento de las moscas.....	169
1.2. Cruces y recolección de pupas.....	169
1.3. Líneas de <i>Drosophila</i> utilizadas.....	170
1.4. Obtención de alas de <i>Drosophila</i>	173
1.5. Tratamiento con Citocalasina D.....	174
1.6. Inmunofluorescencias en alas de <i>Drosophila</i>	175
1.7. Adquisición y procesamiento de imágenes de microscopía.....	176
1.8. Métodos para el análisis de la distribución de centriolos.....	177

2. Modelo murino

2.1. Obtención de las células progenitoras de tráquea de ratón.....	180
2.2. Cultivo primario de células de tráquea. Expansión y diferenciación.....	181
2.3. Cultivos 3D: Organoides de tráquea de ratón.....	183

3. Células de bronquio humano

3.1. Obtención y cultivo de células progenitoras de bronquio humano.....	184
3.2. Organoides de células de bronquio humano.....	185

4. Tratamientos en cultivos celulares.....

5. Silenciamiento de proteínas en cultivos celulares.....

5.1. Generación del vector lentiviral. Clonación.....	186
5.2. Producción de partículas lentivirales.....	189
5.3. Transducción con lentivirus y selección de los cultivos celulares.....	191

6. Sobreexpresión de p53 en cultivos primarios.....

7. Inmunofluorescencias en células de las vías respiratorias.....

8. Adquisición y análisis de imágenes de microscopía.....

9. Análisis de proteínas mediante <i>immunoblotting</i> (Western Blot)	
9.1. Preparación de los extractos proteicos. Lisado.....	195
9.2. Cuantificación de los extractos proteicos.....	195
9.3. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SAS-PAGE)....	196
9.4. Electrotransferencia en húmedo.....	196
9.5. Marcaje con anticuerpos y revelado de las membranas.....	197
10. Análisis de los niveles de expresión por PCR cuantitativa	
10.1. Extracción de ARN.....	198
10.2. Retrotranscripción.....	199
10.3. PCR cuantitativa.....	199
11. Secuenciación masiva de transcritos.....	201
12. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	202
13. Medida de apoptosis, ciclo celular y senescencia.....	203
14. Ensayo de la integridad de la monocapa celular.....	204
15. Ensayo de <i>Doubling Time</i>.....	204
16. Medida de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER).....	205
17. Medida del batido de los cilios.....	205
18. Análisis estadístico.....	205
 BIBLIOGRAFÍA	
 Bibliografía.....	 207

TABLA DE ABREVIATURAS*			
ABP	<i>Average Basal Body Position</i>	DRSC	<i>Drosophila RNAi Screening Center</i>
AEC	<i>Alveolar Epithelial Cell</i>	EDTA	Etilendiaminotetraacético
ADN	Ácido desoxirribonucleico	En	<i>Engrailed</i>
ADNc	ADN complementario	EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
ALI	<i>Air-Liquid Interface</i>	FBS	Suero fetal bobino
APF	<i>After Pupae Formation</i>	GTPasa	Guanosina trifosfatasa
APS	Persulfato amónico	HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
AP/BL	Apical / Basolateral	HRP	<i>Horseadish peroxidase</i> / Peroxidasa de rábano
ARN	Ácido ribonucleico	IG	Inmunoglobulina
ARNi	ARN de interferencia	IF	Inmunofluorescencia
ARNm	ARN mensajero	KD	<i>Knock Down</i>
ATP	Adenosín trifosfato	Luc	Luciferasa
BD	<i>Basic Domain</i>	MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
BSA	Albúmina de suero bobino	MPC	Material Pericentriolar
CB	Células basales	MTECs	<i>Mouse Tracheal epithelial cells</i>
CC	Células caliciformes		
CMC	Células multiciliadas	MTOC	<i>Microtubule Organizing Centers</i>
CS	Células Secretoras	NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Co-IP	Co-Inmunoprecipitación	O.N.	<i>Over-Night</i>
CPLANE	<i>Ciliogenesis and Planar Polarity Effectors</i>	Nub	<i>Nubbin</i>
Cyt D	Citocalasina D	PAGE	Electroforesis de gel de poliacrilamida
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol	PBS	Tampón salino de fosfato
DEP	Dominio Dsh-EGL-10- <i>Pleckstri</i>	PBS-t	PBS-Triton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	PCP	Polaridad Celular Planar
DMSO	Dimetil sulfoxido	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

DNAsa	Desoxiribonucleasa	PPE	<i>Planar Polarity Effectors</i>
Dpp	<i>Decapentaplegic</i>	PEI	Polietilenimina
P/S	Penicilina / Estreptomicina	TEMED	Tetrametiletilendiamina,
RCPD	<i>Representative Polarized Centriole Distribution</i>	TGS	Tampón Tris-Glicina-SDS
RNCD	<i>Representative Non-Polarized Centriole Distribution</i>	TM	<i>Transmembrane</i>
SDS	Dodecil Sulfao Sódico	TPM	Transcritos por millón
SEM	<i>Scanning Electroni Microscopy</i>	UAS	<i>Up-stream Activating Sequence</i>
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>	Ubx	Ultrabitorax
RNAsa	Ribonucleasa	Vc-a	Vena cruzada anterior
TAD	Transactivating domain	Vc-p	Vena cruzada posterior
TEER	<i>Transepithelial Resistance</i>	VDRC	<i>Vienna Drosophila RNAi Center</i>
TBE	Tampón Tris-Borato-EDTA	WB	<i>Western-Blot</i>
TBS	Tampón salino de Tris	WT	<i>Wild Type</i>

*Los términos que no se emplean en castellano no se muestran traducidos.

RESUMEN

A lo largo del desarrollo de los organismos pluricelulares tienen lugar, de forma simultánea, multitud de procesos que se encuentran estrechamente regulados, y en los que la alteración de esta regulación provoca graves defectos, afectando a la viabilidad de los individuos. Entre estos procesos, el posicionamiento de los orgánulos en el interior celular o un adecuado balance entre las poblaciones celulares que conforman distintos tejidos juegan un papel esencial en el desarrollo y la morfogénesis.

Concretamente, el correcto posicionamiento de orgánulos como los centriolos es clave en la división celular orientada o el movimiento coordinado de los cilios. Estudios previos demostraron que la ruta de polaridad celular planar (Fz-PCP) juega un importante papel en el establecimiento de estos patrones posicionales. En el presente trabajo profundizamos en esta regulación a través del estudio del papel de los conocidos como Efectores de PCP, así como el papel del citoesqueleto de actina en la regulación de la polaridad de los centriolos. Además, estudiamos también el papel de otra vía de PCP conocida como Ft/Ds-PCP.

Por otro lado, la señalización celular mediada por proteínas como p53 ha demostrado ser clave para el correcto desarrollo de organismos pluricelulares. Miembros de la familia de p53 como p73 y p63 juegan un papel clave en la diferenciación del epitelio respiratorio, sin embargo, la función de p53 en este proceso es ampliamente desconocida. En base a esto, nos proponemos caracterizar el papel de P53 en la diferenciación del epitelio respiratorio.

ABSTRACT

Throughout the development of multicellular organisms, a multitude of processes that are closely regulated take place simultaneously, and in which the alteration of this regulation causes serious defects, affecting the viability of individuals. Among these processes, the positioning of organelles inside the cell or an adequate balance between the cell populations that make up different tissues play an essential role in development and morphogenesis.

Specifically, the correct positioning of organelles such as centrioles is key in targeted cell division or coordinated movement of cilia. Previous studies demonstrated that the planar cell polarity pathway (Fz-PCP) plays an important role in establishing these positional patterns. In the present work we delve into this regulation through the study of the role of what are known as PCP effectors, as well as the role of the actin cytoskeleton in the regulation of centriole polarity. In addition, we have also studied the role of another PCP pathway known as Ft / Ds-PCP.

On the other hand, cell signaling mediated by proteins such as p53 has proven to be key to the correct development of multicellular organisms. Members of the p53 family such as p73 and p63 play a key role in the differentiation of the respiratory epithelium, however, the role of p53 in this process is largely unknown. Based on this, we propose to characterize the role of P53 in the differentiation of the respiratory epithelium.

INTRODUCCION CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Los centriolos constituyen una de las estructuras celulares más reconocibles y conservadas a lo largo de la evolución, y están presentes en la gran mayoría de células eucariotas, desde fibroblastos hasta neuronas¹. Su relevancia fisiológica se hace patente al observar el papel de estos orgánulos en procesos tan diversos como la división y la migración celular, la transducción de señales o el movimiento coordinado de estructuras celulares como los cilios. Además de la estructura de los centriolos, su tamaño, número y posicionamiento son esenciales en el desarrollo y la homeostasis de los organismos pluricelulares^{2, 3}. En vertebrados, las alteraciones en alguna de estas características provocan importantes defectos en el desarrollo, y son la causa de enfermedades como el síndrome de Meckel, la microcefalia o diversos tipos de cáncer^{4, 5}, por lo que es esencial conocer las rutas moleculares que regulan procesos como el control del tamaño y número de centriolos en cada célula, así como su disposición en el interior celular. En el proceso en el que una célula en interfase, con una pareja de centriolos, pasa a poseer centenares de ellos y cómo éstos se posicionan en el interior celular existen aún grandes interrogantes que trataremos de abordar en este trabajo.

Centriolos, centrosomas y cuerpos basales

Los centriolos se encuentran localizados en el citoplasma y están compuestos por microtúbulos organizados en nueve tripletes dispuestos a modo de cilindro, rodeando a su vez a una pareja de microtúbulos central, formando lo que comúnmente se conoce como estructura 9+2 (Figura 1 a). Además, en las células en interfase, los centriolos están presentes en un número fijo, concretamente dos por célula, de los cuales uno de ellos procede de la célula previa a la división, el denominado centriolo madre, y otro se sintetiza *de novo*, el centriolo hija, que se dispone ortogonal al primero. Estos dos centriolos, junto a una red de proteínas adyacente, denominada material pericentriolar (MPC), constituye el centrosoma, también conocido como centro organizador de microtúbulos (*Microtubule Organizing Centers*, MTOCs) por su papel central en la regulación de estos elementos del citoesqueleto durante la interfase⁶ (Figura 1 b).

En lo relativo a su tamaño, cada centriolo presenta un diámetro de aproximadamente 200nm y una longitud que varía entre 100 y 450nm, dependiendo del tipo celular. Este tamaño convierte al centriolo en una de las estructuras proteicas más grandes de la célula, sin embargo, se encuentra por debajo del poder de resolución real de los microscopios ópticos. Por este motivo, la complejidad estructural del centriolo no se apreció hasta que aparecieron los primeros microscopios electrónicos⁷. El análisis de la estructura de los centriolos puso de manifiesto su homología con otra estructura celular, el cuerpo basal de los cilios^{8,9}. Desde ese momento, multitud de trabajos se han centrado en dilucidar la organización estructural de los centriolos y cuerpos basales de los cilios, estrechamente relacionadas^{10,11}.

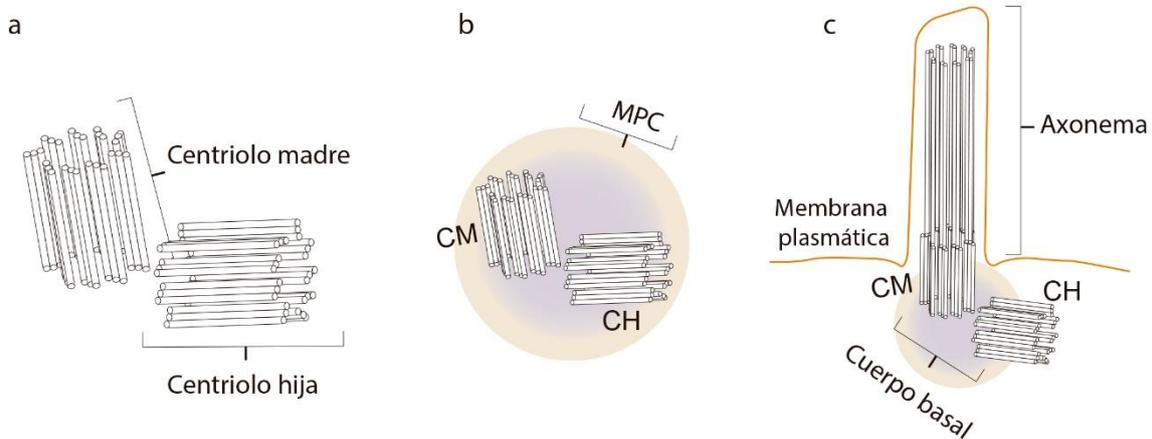


Figura 1: Centriolos, centrosoma y cuerpo basal. El centriolo madre (CM) forma parte del centrosoma (b) junto al material pericentriolar (MPC) y del cuerpo basal de los cilios (c). Formando un ángulo de 90° se encuentra el centriolo hijo (CH).

Los cilios, conocidos también como flagelos en algunos tipos celulares, son prolongaciones citoplasmáticas basadas en microtúbulos, y cuyas funciones son principalmente motrices, aunque participan también en la recepción de estímulos extracelulares. En los cilios, el esqueleto de tubulina se denomina axonema, y funciona como andamio de una proyección de la membrana plasmática que emerge de un centriolo madre situado en la base del cilio, denominado cuerpo basal¹² (Figura 1 c). Durante la formación de los cilios, los centriolos se anclan en la membrana plasmática apical, y el centriolo madre sirve como punto de elongación de los microtúbulos del axonema. Mientras que en el cuerpo basal la disposición de los microtúbulos es idéntica a la de los centriolos, nueve tripletes rodeando una pareja central, en las células de

mamífero podemos distinguir dos tipos de cilios en función de la estructura y disposición de los microtúbulos del axonema: el cilio primario, con nueve parejas de microtúbulos y sin doblete central (9+0), cuya función es fundamentalmente la recepción de señales extracelulares¹³; y el cilio motil, donde las nueve parejas de microtúbulos rodean a un doblete central, con funciones en la movilidad celular o de fluidos sobre la superficie de las células¹⁴.

Estructura de los centriolos y cuerpos basales

Como hemos mencionado anteriormente, los centriolos son orgánulos no membranosos basados en microtúbulos, de modo que se encuentran mayoritariamente compuestos por tubulina. Pese a la gran conservación evolutiva que hemos comentado, existen variaciones entre distintos grupos de organismos. En vertebrados, los microtúbulos que conforman los centriolos se disponen en nueve tripletes en torno a un eje central y siguiendo una simetría radial, en una estructura que recuerda a la de una turbina (Figura 1 a). En *Drosophila*, sin embargo, los centriolos de las células somáticas son más pequeños y están compuestos por nueve dobletes de microtúbulos en la misma disposición (Figura 2 a, c), mientras que en *C. elegans*, la estructura es aún más simple, y el eje central se encuentra rodeado por nueve microtúbulos individuales¹⁵. Veremos con más detalle la estructura y composición de los centriolos en *Drosophila*.

Centriolos y centrosomas en *Drosophila*

Drosophila melanogaster ha sido desde mediados del siglo pasado uno de los organismos modelo más utilizados en biología del desarrollo y genética, por lo que actualmente se cuenta con un amplio conocimiento acumulado acerca de su biología. Gracias a ello, tanto la estructura como la composición proteica de sus centriolos y centrosomas están ampliamente descritas. Además, el papel dual del centriolo no sólo como componente del centrosoma sino también como cuerpo basal para el andamiaje de cilios y flagelos implica que las alteraciones ocurridas en este orgánulo provocan un gran impacto en el desarrollo y la fisiología de los organismos. Estas alteraciones pueden ser modelizadas en *Drosophila*.

Los centriolos de las células de *Drosophila*, pese a seguir el mismo esquema básico, difieren en composición y estructura en función de los distintos tejidos y estados del desarrollo¹⁶. Tanto en el estado embrionario como en las células en cultivo, el tamaño de los centriolos oscila entre 180 y 200nm tanto en longitud como en anchura y está compuesto por nueve dobletes de microtúbulos (figura 2 c). Por otro lado, en los espermatocitos, los centriolos pueden llegar a alcanzar los 900nm y su estructura es más similar a los centriolos en mamíferos, 9+2.

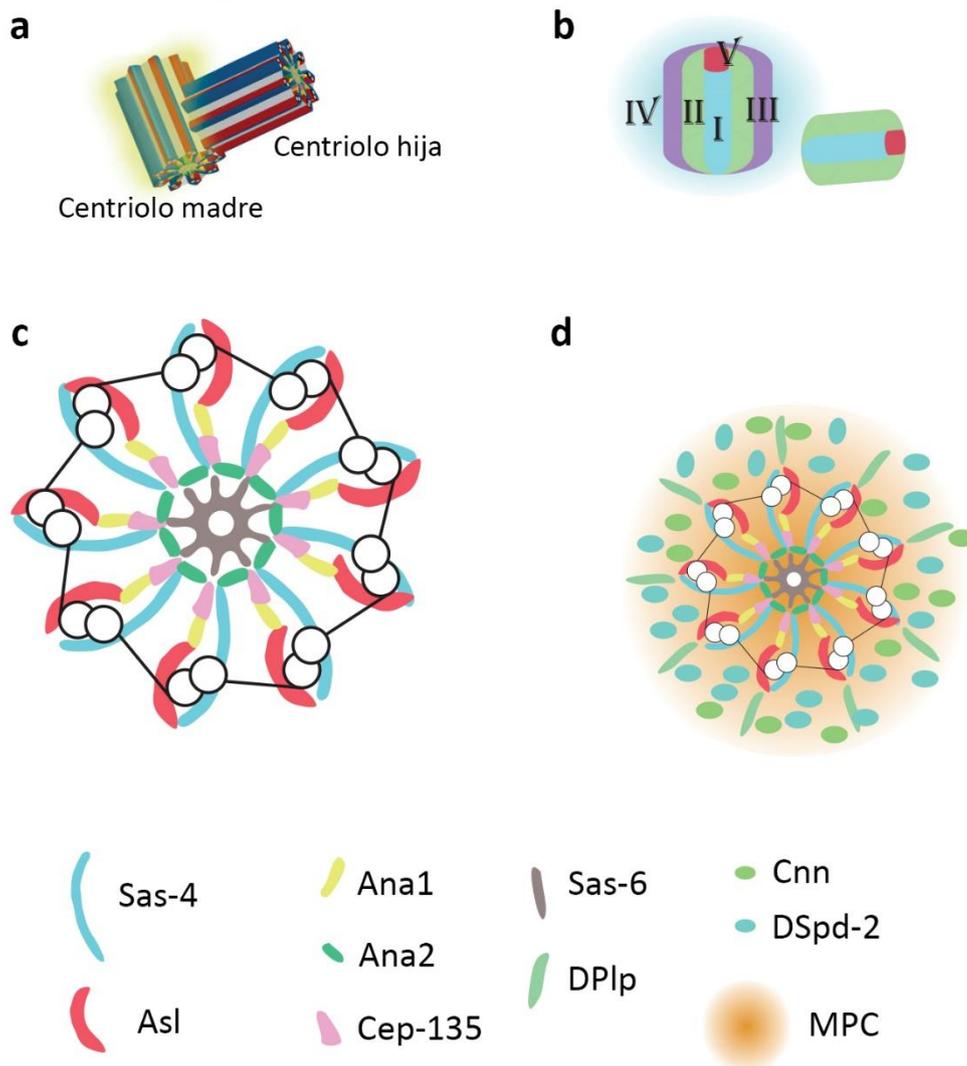


Figura 2: Organización del centrosoma en *Drosophila*. Los centriolos madre e hija se disponen ortogonalmente (a). Para facilitar el estudio de la arquitectura del centriolo, éste puede dividirse en regiones concéntricas (b). (c) Sección transversal del centriolo de una célula somática en *Drosophila*. (d) Las proteínas periféricas de la estructura del centriolo interactúan con el material pericentriolar (PCM).

Para facilitar el estudio del centrosoma de las células somáticas de *Drosophila*, podemos dividir el centriolo en zonas concéntricas (Figura 2 b). En la zona I, la más interna y que sirve como eje de la estructura radial, encontramos la proteína Sas-6, una proteína en hélice superenrollada que dimeriza para formar el núcleo central del centriolo¹⁶, que se esquematiza en la figura 2 c. Esta proteína no sólo sirve como anclaje para el resto de las proteínas, sino que juega un papel esencial en la duplicación del centriolo¹⁷. Sas-6 interacciona con Ana2, también en la zona I para formar la primera estructura conocida como rueda de carro interna. Además, se ha demostrado que Sas-6 (*Spindle assembly abnormal 6*) interacciona con Cep135 (*Centrosomal Protein 135*), quedando ésta proyectada hacia el exterior de la zona I (Figura 2 c). En *Chlamydomonas*, individuos mutantes en el gen homólogo a Cep135 muestran pérdida del flagelo¹⁸.

La zona II del centriolo está fundamentalmente formada por la proteína Sas-4, que actúa como conexión entre la zona I y los microtúbulos, de modo que interacciona con Ana2 y con los dímeros de tubulina α/β ¹⁹. Desplazándonos hacia el exterior se encuentra la proteína Pericentrina (DPlp), exponiendo su extremo N-terminal hacia el MPC, donde colocaliza con Centrosomina (Cnn)²⁰ (Figura 2 d). En esta misma región del centriolo se encuentran otras dos proteínas, Plk4 (*Polo Like Kinase 4*), una quinasa implicada en la duplicación del centriolo madre y el número de centriolos por célula, y Asl (*Asterless*), relacionada con la regulación del tamaño del centriolo^{21, 22}. La zona IV se constituye únicamente durante la mitosis, y es más extensa que la zona III, aunque básicamente se compone de las mismas proteínas, además de γ -tubulina. La última zona, la zona V, se encuentra únicamente en extremo de cada centriolo más alejado del núcleo, lo que se conoce como extremo distal. En este extremo se encuentra la proteína CP110 (*Centrosomal Protein 110*), implicada en la regulación del tamaño y la elongación del centriolo, así como la elongación del cilio²³.

Una vez descrita la estructura de los centriolos en *Drosophila*, nos centraremos en otro parámetro esencial para el correcto desarrollo de los organismos pluricelulares: el posicionamiento de los centrosomas en el interior celular, así como las rutas moleculares que regulan dicho posicionamiento. Al igual que ocurre con la estructura general de los centriolos, su posicionamiento está estrechamente regulado y conservado a lo largo de la evolución, y juega un papel clave en procesos como la división

celular orientada o el posicionamiento de estructuras como los cilios en células altamente especializadas, como las células multiciliadas²⁴.

Posicionamiento de centrosomas y cuerpos basales durante la interfase

En las células no polarizadas como los fibroblastos, el centrosoma se localiza en el centro de la célula, cerca del núcleo, desde donde actúa dirigiendo la nuclearización de los microtúbulos en su papel como MTOC²⁵.

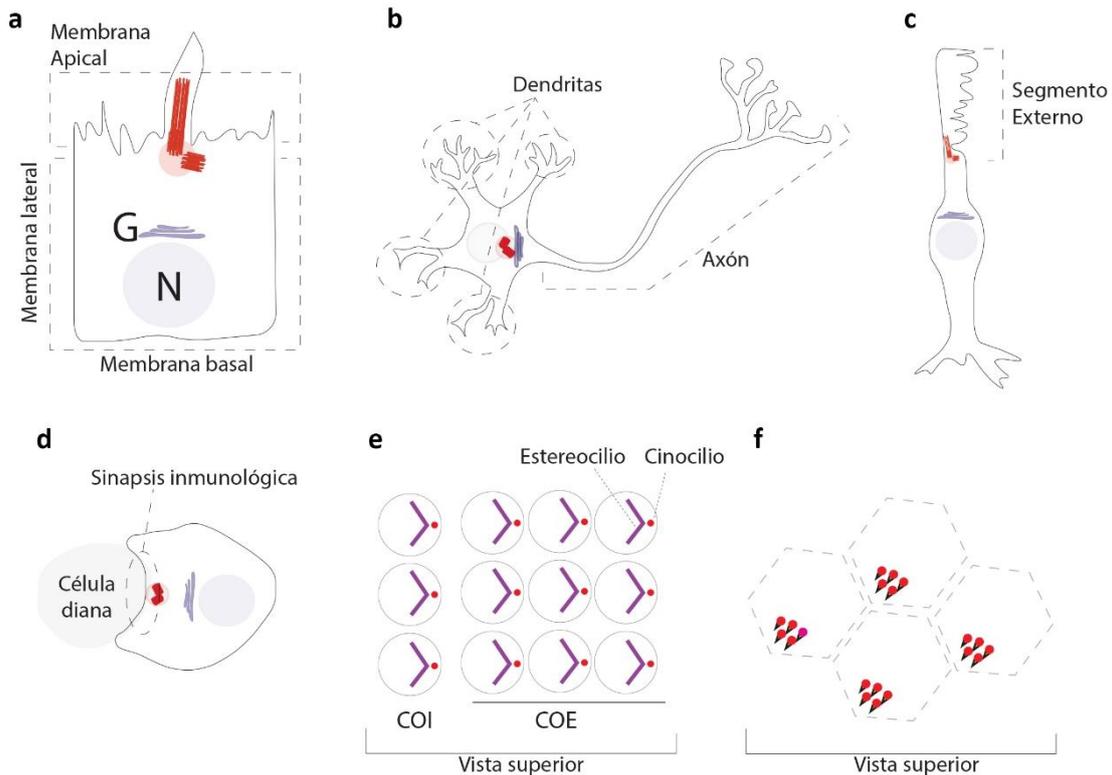


Figura 3: Posicionamiento polarizado de centriolos y cuerpos basales en distintos tipos celulares. En las células multiciliadas de las mucosas, como por ejemplo el sistema respiratorio, el centrosoma actúa como cuerpo basal de los cilios, y se sitúa en la región apical de las células (a). En neuronas y fotorreceptores, los centriolos se sitúan en la base de los axones (b, c). En las células del sistema inmune, el centrosoma se localiza junto a la sinapsis inmunológica (d), y en las células sensoriales del oído interno y externo, en la región distal, actuando como cuerpo basal del cinocilio (e). En las células endimarias (f) los cuerpos basales se posicionan de forma coordinada. G Golgi, N núcleo, COI células del oído interno, COE células oído externo.

A pesar de esto, en la mayor parte de los epitelios de las mucosas, como los conductos intestinales o las vías respiratorias, los centrosomas de las células multiciliadas se encuentran marcadamente polarizados, situándose cerca de la superficie apical²⁶ (Figura 3 a). En otros tipos celulares especializados, como las neuronas o los fotorreceptores, los centriolos se localizan en la base del axón^{27, 28} (Figura

3 b, c), mientras que en las células del sistema inmune, el centrosoma se dispone en la sinapsis inmunológica, junto a la membrana que contacta con la célula diana²⁹ (Figura 3 d). En las células del oído interno, el cuerpo basal de los cinocilios se posiciona en la periferia de la célula, polarizado distalmente³⁰ (Figura 3 e). Por último, en las células endodiales que tapizan los ventrículos del sistema nervioso y que mueven el líquido cefalorraquídeo, los cuerpos basales se orientan de manera coordinada, dirigiendo así el batido de los cilios en un único sentido³¹ (Figura 3 f).

La importancia del correcto posicionamiento de los centriolos en los distintos tipos celulares se pone de manifiesto en la gran variedad de procesos en los que está implicado, así como en la gran conservación evolutiva de su regulación. Debido a esto, profundizar en las rutas moleculares que gobiernan la polarización de los centriolos es fundamental para comprender tanto la fisiología como los estados patológicos originados por defectos en estas rutas de señalización. En este sentido, en los últimos años se han realizado avances significativos en el conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan el posicionamiento de los centrosomas y cuerpos basales, poniéndose de manifiesto la importancia de las rutas de polaridad celular y la implicación del citoesqueleto en este proceso^{32, 33}. En los siguientes apartados, abordaremos estos mecanismos de polaridad celular, detallando las distintas rutas moleculares descritas y su relación con el posicionamiento de los centriolos.

Debido a la dificultad que supone extrapolar procesos de polaridad de tejidos en placas de cultivo, han sido necesarios estudios *in vivo* para determinar la función de las proteínas que intervienen en estas rutas. En este sentido, *Drosophila* se ha posicionado como uno de los modelos de estudio más empleado en las vías que modulan la polaridad celular. Concretamente, algunos tejidos de *Drosophila* como el epitelio de las alas han demostrado ser modelos realmente útiles, pues la disposición de las células que componen dichos tejidos conforma epitelios planos que permiten la localización subcelular de estructuras y proteínas implicadas en los distintos sistemas de polaridad. En los siguientes apartados trataremos de describir los mecanismos de polaridad celular identificados en *Drosophila*, haciendo referencia a sus ortólogos en vertebrados cuando sea necesario.

Polaridad celular

Durante el desarrollo de los organismos pluricelulares, la coordinación celular que permite el correcto posicionamiento de orgánulos, células y tejidos es esencial para una morfogénesis correcta. En este sentido, distintas rutas de señalización informan a las células de su posición tridimensional y su relación respecto a las células vecinas, impulsándolas a orientar estructuras celulares como cilios, vesículas de secreción, fotorreceptores, o centriolos. Atendiendo a los distintos ejes de simetría que se establecen a lo largo del desarrollo, podemos clasificar los sistemas de polaridad celular en dos categorías: la polaridad celular planar (PCP), referida al alineamiento coordinado de las células a lo largo de un tejido plano como los epitelios, y polaridad apical/basolateral (AP/BL), que ordena los componentes subcelulares en relación a su disposición vertical³⁴.

Ambos tipos de polaridad se concretan en la distribución diferencial de complejos de proteínas, fosfolípidos o elementos del citoesqueleto, y son de gran relevancia en la coordinación de células especializadas de los epitelios³⁵. En la figura 4 se esquematiza la disposición de las células a lo largo de un epitelio plano (a), así como los dos tipos de polaridad a los que están sometidas las células que componen los epitelios (b).

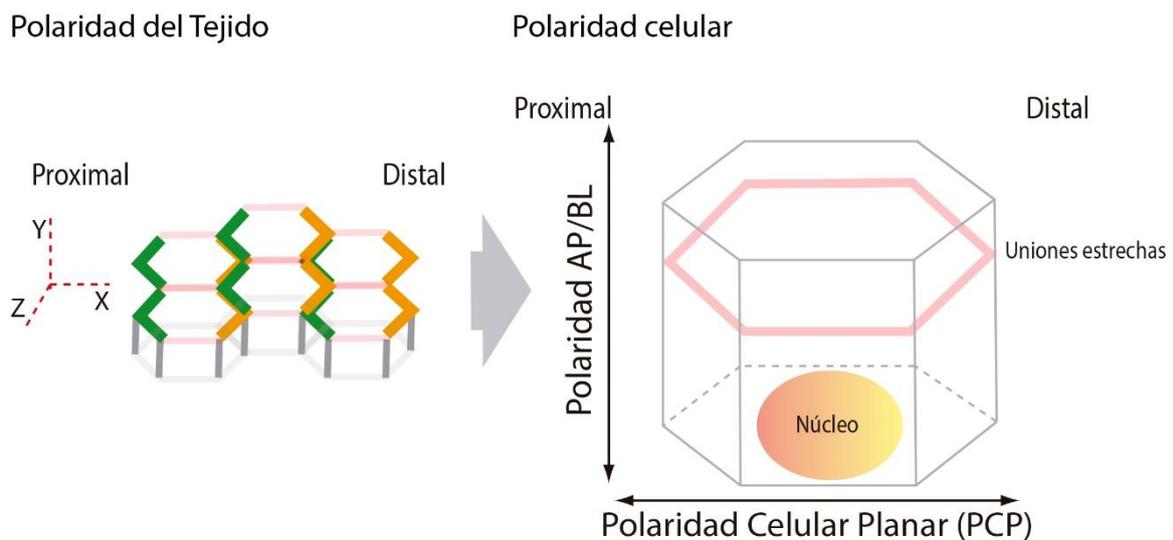


Figura 4: Esquema de los sistemas de polaridad en células epiteliales. (a) Disposición de las células en un epitelio, donde la región distal de cada célula contacta con la región proximal de la célula vecina. (b) Representación esquemática de una célula epitelial donde se observan los distintos complejos de proteínas implicadas en polaridad celular planar (PCP) así como la segregación de estructuras como el núcleo o las uniones estrechas en el eje apical-basolateral (AP/BL).

Polaridad Apical/Basolateral (AP-BL)

En las células epiteliales, la polaridad apical/basolateral hace referencia a la formación de dos dominios de membrana distintos y separados: la membrana apical, en contacto con el entorno extracelular y la membrana basal, anclada a la lámina basal o matriz extracelular. El establecimiento de estos dos dominios provoca la distribución asimétrica de proteínas, fosfolípidos en la membrana plasmática u orgánulos celulares³⁶. Esta distribución asimétrica es esencial en la regulación de funciones como el transporte direccional de iones en las células epiteliales o la secreción de vesículas en las células secretoras de las distintas glándulas³⁷.

En las últimas décadas se han realizado avances en el esclarecimiento de las rutas moleculares que modulan el establecimiento de la polaridad AP/BL identificándose, al menos, tres complejos de proteínas que intervienen en esta ruta, esquematizados en la figura 5. El principal, el complejo Par (*Partitioning defective protein*), está constituido por las proteínas Par3, Par6 y la proteína quinasa C atípica (aPKC)³⁸, e interactúan con la GTPasa Cdc42, que ancla el complejo en la región apical de las células³⁹. Este complejo proporciona información posicional durante las primeras etapas del desarrollo, y es clave en la distribución asimétrica de proteínas que provoca la división celular orientada, proceso que ocurre, por ejemplo, en la regeneración de los epitelios, donde las células basales se dividen asimétricamente, orientando la célula que se diferenciará hacia la región distal, mientras que la célula que permanecerá indiferenciada se sitúa en la zona basal⁴⁰. El segundo complejo de polaridad AP/BL es el formado por las proteínas Crumbs, Pals1 (Sturdust en *Drosophila*) y PATJ (*Pals1-associated tight junction*), cuya función está restringida a células epiteliales, y está implicado en la formación de las uniones estrechas entre células que permiten el establecimiento de la barrera epitelial⁴¹. Por último, el tercer complejo es el constituido por las proteínas Scribble, Disc large (Dlg) y Lethal giant larvae (Lgl), que están localizadas en la membrana basal de las células epiteliales⁴², y que establecen con los dos complejos apicales interacciones inhibitorias (Figura 5), promoviendo así su segregación y la correcta polaridad AP/BL en las células epiteliales⁴³.

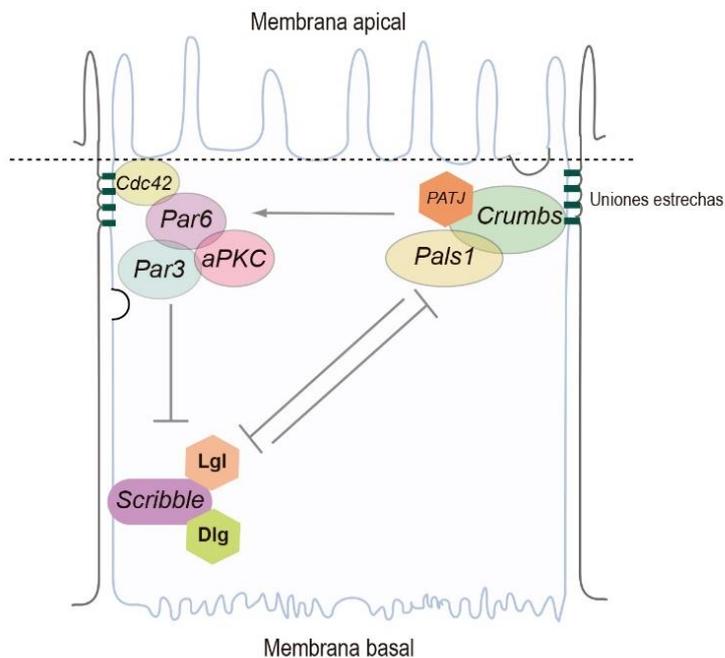


Figura 5: Complejos que regulan la polaridad Apical/Basolateral. Los tres principales complejos proteicos establecen entre sí interacciones inhibitorias.

La polaridad apical/basolateral se ha relacionado con el posicionamiento de los centrosomas a través de la proteína Par6, implicada en el reclutamiento apical de proteínas que constituyen los centriolos⁴⁴. Además, se ha demostrado que el movimiento apical de los centrosomas durante la polarización de los epitelios es un proceso dependiente de Par3, y que embriones de *C. elegans* defectivos para esta proteína presentan alteraciones en la localización de los cilios⁴⁵. Por último, el complejo Par regula también el posicionamiento de los centrosomas a través de su interacción con NuMa (*nuclear mitotic apparatus*), Pins y proteínas G, desempeñando un papel fundamental en la división celular asimétrica durante el desarrollo. Esta ruta está implicada en el movimiento apical del cilio primario, y defectos en la proteína Pins afectan a la migración del cinocilio en las células de la cóclea^{46, 47}.

Polaridad Celular Planar (PCP) en *Drosophila*

Diversos estudios realizados en los últimos años han relacionado el posicionamiento de los centriolos y los cuerpos basales con un segundo mecanismo de polaridad, ortogonal a la ya descrita AP/BL, la denominada polaridad celular planar (PCP)^{34, 48}. Esta compleja ruta molecular coordina la polarización de las células a lo largo del plano, y juega un papel esencial en el establecimiento de los patrones corporales, lo que queda de manifiesto en su alto grado de conservación evolutiva³⁴. Existen además

dos cascadas de señalización que regulan esta polaridad celular planar, la denominada ruta de Frizzled-PCP (Fz-PCP) y la ruta de Fat-PCP (Ft-PCP), que actúan de forma simultánea y coordinada durante el desarrollo⁴⁹.

La señalización de las rutas de PCP, al igual que la polaridad AP/BL, también está basada en la distribución asimétrica de complejos de proteínas, y regula cambios morfológicos mediante la exclusión mutua de estos complejos, localizados en regiones opuestas en la membrana de las células. En *Drosophila*, la ruta de Fz-PCP está regulada por los elementos transmembranales Frizzled (Fz), Van Gogh (Vang, Vangl en vertebrados) y Flamingo (Fmi, Celsr en vertebrados), y los componentes citoplasmáticos Dishevelled (Dsh, Dvl en vertebrados), Diego (Dgo) y Prickle (Pk) (Figura 6), además de los conocidos como efectores de PCP, cuya función abordaremos más adelante y entre los que se encuentran Inturned (In), Fuzzy (Fy) y Fritz (Frtz, Wdpcp en vertebrados)^{50, 51}. Por otro lado, la ruta de Ft-PCP está compuesta por dos proto-cadherinas, Fat (Ft) y Dachous (Ds), y la quinasa Four-jointed (Fj), que coordina la interacción de estas proteínas entre membranas adyacentes⁵²

Para comprender las interacciones moleculares entre los miembros que conforman la ruta de Fz-PCP en *Drosophila*, esquematizados en la figura 6, es conveniente describir estos elementos:

- ❖ Frizzled: Se trata de un receptor de membrana perteneciente a la familia de los receptores de siete dominios transmembranales (7-TM) acoplados a proteínas G. En *Drosophila*, que cuenta con dos proteínas Frizzled, Fz1 está implicado en la señalización de PCP, mientras Fz2 señala en la ruta canónica de Wnt/ β -catenina. Intracelularmente, Fz1 recluta e interacciona con la proteína citosólica Dsh, mientras que en su región extracelular se produce una interacción con la proteína Vang, localizada en la célula vecina⁵³. En vertebrados encontramos hasta 10 isoformas que sirven como receptores para la ruta de Wnt y que median la regulación de la transcripción génica en su vía canónica, y el establecimiento de PCP en su vía no canónica⁵⁴.

- ❖ Dishevelled: Es una proteína citoplasmática que contiene diversos dominios de interacción proteína-proteína como DIX o PDZ o DEP, y que modula su actividad mediante procesos de fosforilación/desfosforilación, ejerciendo un importante papel en la señalización celular⁵⁵. En vertebrados se han identificado diversas isoformas, como DVL1, DVL2 y DVL3⁵⁶.

- ❖ Van Gogh: Es un receptor de membrana del complejo proximal perteneciente a la familia de receptores de 4 dominios transmembrana (4-TM). En mamíferos encontramos dos isoformas, Vangl1 y Vangl2^{57, 58}.

- ❖ Flamingo: Se trata de una proteína de membrana perteneciente también a la familia 7-TM. Se encuentra enriquecida en las regiones proximal y distal, interaccionando con los complejos de PCP, aunque también está presente en las uniones estrechas a lo largo de todo el contorno celular⁵⁹. En ratón se han identificado las isoformas CELSR1, CELSR2 y CELSR3. Se ha demostrado que el dominio situado en el extremo C terminal, citosólico, interacciona con el citoesqueleto de actina⁶⁰

- ❖ Prickle: Es una proteína citosólica que presenta tres dominios LIM, dominios estructurales compuestos por dedos de zinc contiguos, y que están presentes en proteínas que interaccionan con el citoesqueleto. En vertebrados encontramos las isoformas PK1, PK2 y PK3⁶¹.

- ❖ Diego: Proteína citosólica que interacciona tanto con Frizzled, reclutándose en la membrana distal, como con Dsh. Además, la interacción Fz-Dgo parece ser clave para promover el reclutamiento de Fmi. En vertebrados encontramos a su homólogo Inversina (inv)⁶².

La ruta de Fz-PCP se establece a través de la segregación asimétrica de los complejos de proteínas formados por Fz-Dsh-Fmi, localizado en la región distal de cada célula, y el complejo constituido por Vang-Pk-Fmi, que se sitúa en la cara proximal (Figura 6). Esta distribución proximal-distal de los complejos de proteínas genera patrones que se propagan a lo largo de los epitelios, y son especialmente relevantes en procesos como la gastrulación, el cierre del tubo neural y la morfogénesis^{63, 64}. La segregación diferencial de los complejos se refuerza mediante interacciones negativas entre ellos en el interior celular, mientras que la comunicación célula-célula estabiliza las interacciones entre Vang y Fz⁶¹.

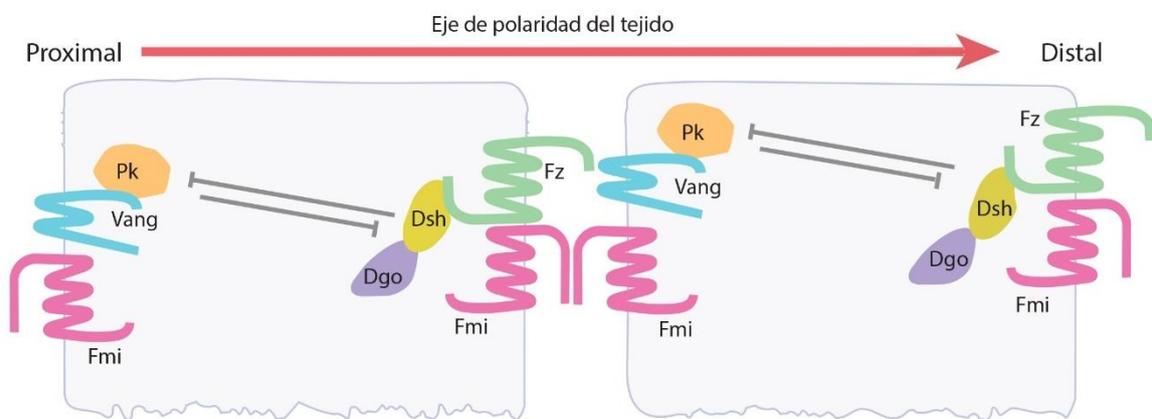


Figura 6: Representación esquemática de la disposición de los complejos de proteínas en la ruta de Fz-PCP. La membrana distal de cada célula contacta con la membrana proximal de la célula vecina, donde se producen interacciones entre Fz-Vang que estabilizan los complejos. Intracelularmente, la segregación de los complejos se produce mediante interacciones inhibitorias entre los elementos citosólicos.

En el interior de las células existen interacciones inhibitorias entre ambos complejos de proteínas, de forma que Vang-Pk impide la formación del complejo Fz-Dsh a través de la represión y disminución de la estabilidad de Dsh^{65, 66}. Concretamente, Pk actúa secuestrando e inhibiendo la fosforilación de la proteína citosólica Dsh, y debido a que Vang direcciona a Pk en la región proximal, es aquí donde ésta puede ejercer su acción inhibitoria, impidiendo la formación del complejo Fz-Dsh⁶⁷. En el lado opuesto, Dgo antagoniza los efectos de Pk sobre Dsh, favoreciendo su estabilidad y permitiendo así el establecimiento del complejo Fz-Dsh en la cara distal.

En el entorno extracelular, y a diferencia de lo expuesto anteriormente, se observa una interacción positiva entre los complejos proximal y distal, de forma que se estabilizan entre sí. En estas interacciones juegan un papel esencial las proteínas de

membrana, que, acopladas en los complejos opuestos entre dos células vecinas, estabilizan y transducen las señales posicionales de PCP. Los resultados obtenidos en diversos estudios indican que Wnt regula el establecimiento de PCP a través de la modulación de estas interacciones intercelulares Fz-Vang, de modo que el grado de interacción entre estas proteínas varía en un gradiente de Wnt a lo largo de los tejidos^{68, 69}. Además de estos mecanismos, los componentes del núcleo de PCP están notablemente regulados entre sí a través de sus niveles de expresión, de tal forma que la ausencia o la sobreexpresión de algunas de las proteínas anteriormente descritas se manifiesta en la pérdida de la polaridad de membrana y la disposición ectópica del resto de componentes de PCP⁷⁰.

En vertebrados, y concretamente en las células multiciliadas que tapizan epitelios como las vías respiratorias o los ventrículos cerebroespinales, la ruta de Fz-PCP ha sido relacionada con el posicionamiento de los centriolos y cuerpos basales, y juega un papel esencial en la orientación del movimiento de los cilios⁷¹. Los miembros de la ruta de PCP se distribuyen en estas células multiciliadas de forma homóloga a la descrita para *Drosophila*, y algunos elementos como Vangl1 han demostrado ser esenciales en posicionamiento de los cuerpos basales, utilizándose incluso como marcador de esta población celular debido a sus elevados niveles de expresión⁷². Además, defectos en la expresión de DVL en células multiciliadas del tracto respiratorio provocan una pérdida del patrón polarizado de proteínas, afectando a la dirección del flujo de moco debido a defectos en el anclaje de los cuerpos basales en la membrana apical⁷³. En otros órganos, como en el cerebro, miembros de la ruta de Fz-PCP como CELSR2/3, VANGL2 o DVL están implicados en la polarización de los cilios en las células endociliares, y su alteración provoca enfermedades como la hidrocefalia^{48, 74}. El papel esencial de la ruta de Fz-PCP en el posicionamiento de los centriolos y cuerpos basales en vertebrados se pone de manifiesto en el hecho de que multitud de patologías han sido relacionadas con alteraciones en los niveles de expresión o la distribución de los miembros de esta ruta⁷⁵.

Como hemos mencionado anteriormente, además de la ruta de Fz-PCP, el establecimiento de la polaridad celular planar está mediado por otra cascada de señalización, la conocida como ruta de Ft/Ds-PCP. Esta ruta de polaridad está basada en la interacción entre las protocadherinas Fat (Ft) y Dachsous (Ds), y está regulada además

por la proteína quinasa Four-jointed (Fj)⁷⁶. La señalización dependiente de Ft/Ds-PCP abarca señales globales, que determinan la distribución de distintos tipos celulares, tejidos y órganos, y que genera el patrón estructural del organismo, y locales, que orientan individualmente a las células con respecto a sus vecinas. El establecimiento de los patrones globales de polaridad está regulado por la distribución asimétrica de Fj, que se expresa mayoritariamente en la región distal del organismo, y de Ds, enriquecido en la zona proximal⁷⁷ (Figura 7). Las interacciones entre los miembros de la ruta se basan en que Ds actúa como ligando de Ft, inhibiendo su función y provocando así un gradiente de actividad Ft en la región distal⁷⁸ (Figura 7 b). Intracelularmente, Ds recluta a la proteína citosólica Dachsh, que activa la respuesta transcripcional tanto de la ruta canónica de Hippo, que participa en la morfogénesis, como en la ruta Ft/Ds-PCP⁷⁹ (Figura 7 a).

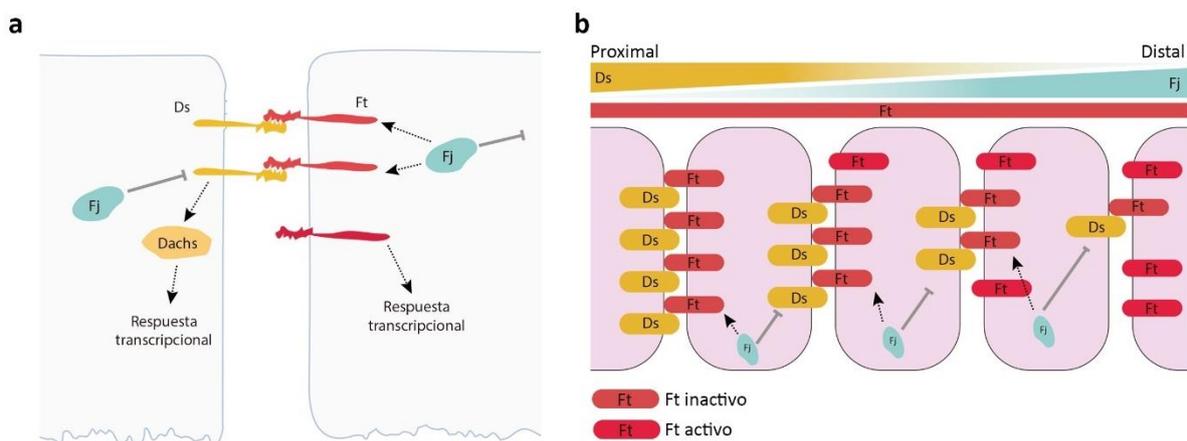


Figura 7: Esquema de la ruta Ft/Ds-PCP. Esta ruta regula el establecimiento de la polaridad planar dentro de cada célula (a) y a lo largo de los epitelios planos, a través de gradientes de expresión y actividad de los miembros de la ruta (b).

En *Drosophila* se ha propuesto que la ruta Ft/Ds-PCP interviene en la organización de los microtúbulos, polarizando distalmente las vesículas de membrana enriquecidas en Fz-Dsh-Fmi⁸⁰, aunque no existe consenso acerca de este hallazgo, pues la localización de los componentes de la ruta Ft/Ds y Fz-PCP difieren durante el desarrollo⁸¹. La ruta de Ft/Ds-PCP también está presente en vertebrados, en los que se han descrito cuatro isoformas de Fat (FAT 1-4), y dos de Ds (DS1 y DS2), y se ha demostrado que una de ellas, FAT4, es esencial para la división celular orientada⁵². Además, defectos en la expresión de FAT4 en embriones de ratón provocan atrofia en los túbulos renales⁸². La ruta Ft/Ds-PCP parece estar implicada en la morfogénesis de

ciertos órganos como los riñones, ya que ratones mutantes en otro miembro de esta ruta identificado en vertebrados, DACH1, presentan también alteraciones en estos órganos⁸³. A pesar de estos hallazgos, el papel de la ruta de polaridad Ft/Ds-PCP en el posicionamiento de los centrosomas y cuerpos basales, tanto en vertebrados como en invertebrados, es aún una incógnita.

El citoesqueleto en el posicionamiento de los centriolos y cuerpos basales

Diversos estudios han relacionado la posición de los centrosomas y cuerpos basales con elementos del citoesqueleto como los filamentos de actina, los microtúbulos o proteínas motoras como la miosina y dineína⁸⁴. En los epitelios que presentan células multiciliadas, la actina apical incrementa la superficie que permite el anclaje de los cilios, y está también implicada en el interespaciado de los cuerpos basales, poniendo de manifiesto la conexión entre estas estructuras y el citoesqueleto de actina⁸⁵. De acuerdo con esto, el tratamiento con un inhibidor de la polimerización de los filamentos de actina, la citocalasina D, provoca defectos en la migración de los cuerpos basales de los cilios en las células epiteliales de vertebrados⁸⁶. Por otro lado, se ha demostrado que una de las principales estructuras de los cilios, el pie basal, interacciona estrechamente con el citoesqueleto de tubulina en un proceso que determina la orientación de las batidas de los cilios, y en el que está implicada la proteína ODF2 (*Outer Dense Fibers 2*)⁸⁷. Todos estos hallazgos revelan un papel clave del citoesqueleto en el posicionamiento orientado de los centrosomas y cuerpos basales.

La ruta de PCP y su conexión con el citoesqueleto

La ruta de Fz-PCP fue descubierta inicialmente en *Drosophila* debido a defectos en estructuras visibles en la cutícula de las células epiteliales de las alas y patas⁸⁸. Concretamente, individuos defectivos en miembros de la ruta de PCP exhiben una reorientación de estas estructuras, denominadas quetas o tricomas, que están compuestas por filamentos de actina y microtúbulos estables⁸⁹. En las células epiteliales del ala de *Drosophila*, una vez que los componentes de PCP están completamente establecidos, las quetas de actina se proyectan en la membrana apical, orientándose hacia la región distal de cada célula (Figura 8) en un proceso dependiente de las rutas polaridad celular planar. La composición de estos elementos celulares, basada en

componentes del citoesqueleto, y su alteración en mutantes PCP reveló un nexo entre ambos sistemas que fue detallado posteriormente⁹⁰.

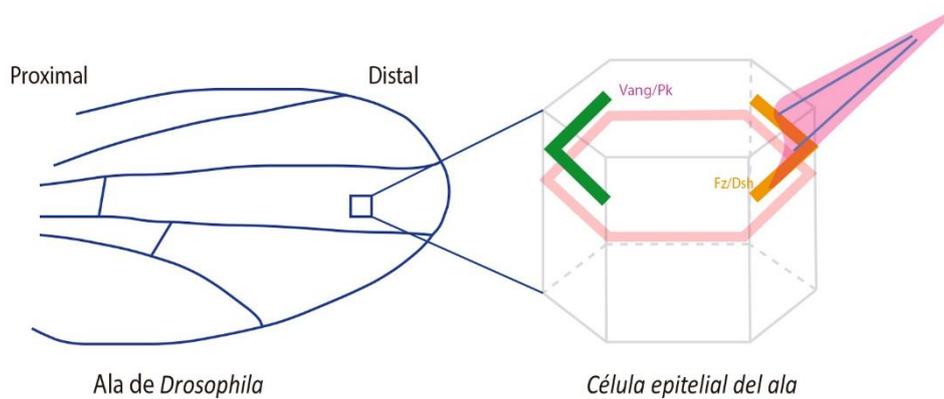


Figura 8: Esquema del posicionamiento de la queta de actina en las células epiteliales del ala de *Drosophila*.

Como hemos mencionado anteriormente, en algunos órganos como las alas de *Drosophila* adulta, los fenotipos ligados a defectos en la señalización por PCP se manifiestan en la orientación de las quetas. En este sentido, se ha descrito un conjunto de proteínas relacionadas con la regulación del citoesqueleto de actina que interacciona con los elementos de la ruta de PCP, y que se han denominado efectores de polaridad celular planar (*Planar Polarity Effectors, PPE*)⁹¹. Entre estas proteínas encontramos miembros de la familia de las forminas (proteínas con dominios de unión a actina) como Mwh (del inglés *Multiple wing hair*), Inturned (In, INTU en vertebrados), Fuzzy (Fy, FUZ en vertebrados) y Fritz (*WD repeat-containing and planar cell polarity effector protein*, WDPCP en vertebrados), que se encuentran enriquecidas en la región proximal de las células polarizadas, interaccionando con el complejo Vang/Pk^{92,93}. Estas proteínas, cuya localización está restringida al dominio proximal de las células epiteliales, actúan inhibiendo la polimerización de actina en esta región (Figura 9 a), y es por esto por lo que defectos en la localización de los complejos de PCP modifican el posicionamiento de estas proteínas y promueven la formación ectópica de las quetas de actina (Figura 9 b)⁹⁴. En la región distal, en cambio, las GTPasas pequeñas de la familia de Rho como Cdc42, Rac1 y RhoA regulan el proceso de polimerización de actina⁹⁵, localizándose distalmente gracias a la interacción con Dsh⁹⁶. Las alteraciones en estos efectores de polaridad celular planar se traducen en células con más de una queta de actina, en el

caso de pérdida de función de Mwh, In, Fy o Fritz, o ganancia de función de las GTPasas de Rho (Figura 9 c), mientras que células defectivas para estas GTPasas no presentan quetas de actina^{94, 97}.

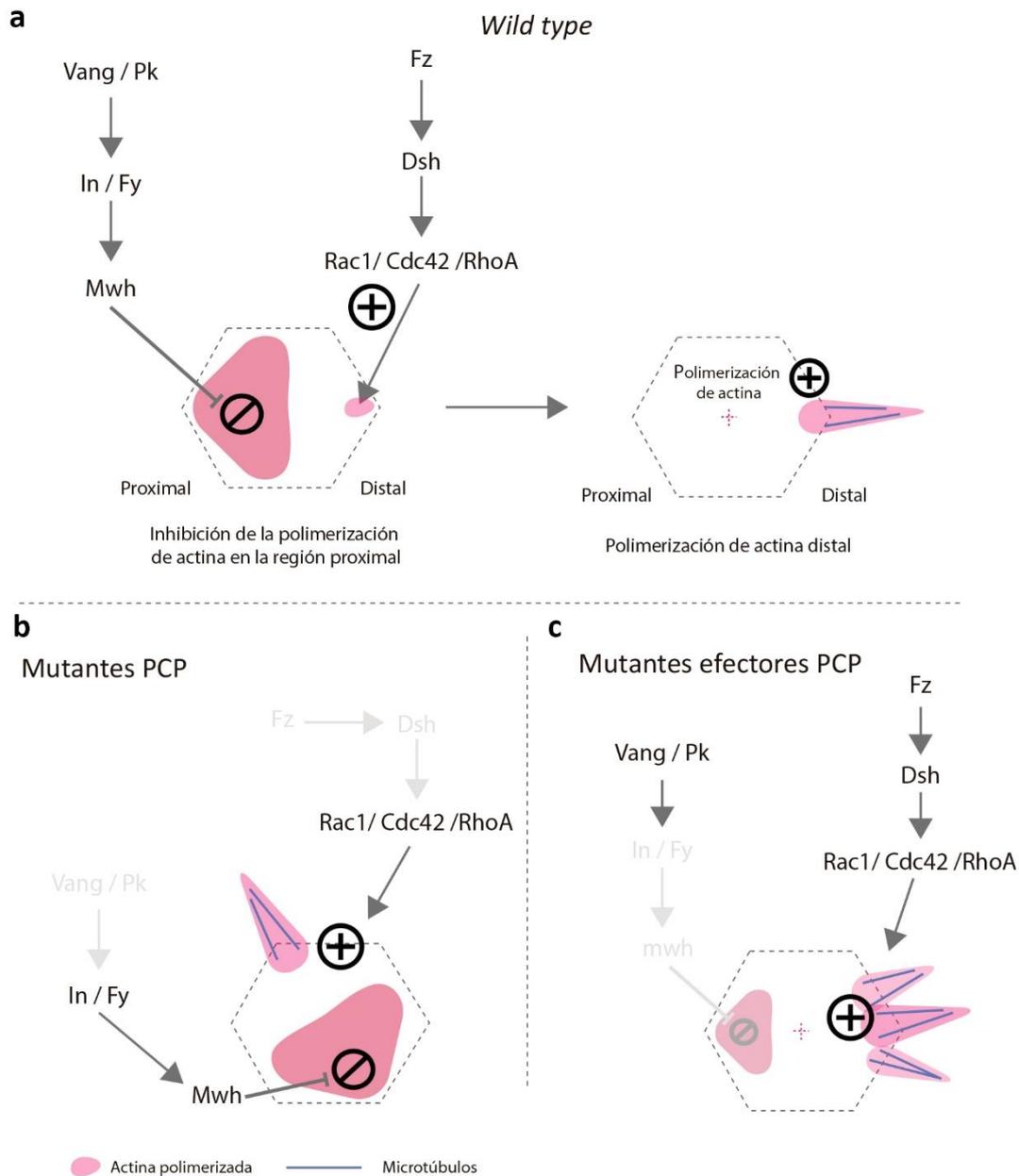


Figura 9: Esquema de la regulación de la polimerización de actina localizada en el proceso de formación de las quetas. (a) En las células silvestres Vang recluta a In, Fy y Mwh en la región proximal, donde inhiben la polimerización de actina. En la zona distal de las células se proyecta la queta de actina, gracias a las GTPasas de la familia de Rho. (b) En mutantes PCP, la pérdida de la polaridad provoca el crecimiento ectópico de las quetas de actina. (c) Mutantes en los efectores de PCP que inhiben la polimerización distal de actina generan fenotipos de quetas múltiples, aunque conservando la orientación distal.

Las conexiones moleculares entre la vía Fz-PCP y las GTPasas de la familia Rho se han descrito, además de en *Drosophila*, en modelos como *Xenopus* o vertebrados. En vertebrados, los efectores de polaridad celular planar se engloban en el complejo CPLANE (*Ciliogenesis and planar polarity effectors*), y uno de sus elementos, FUZ, ha sido relacionado con la ciliogénesis y el transporte direccionado de proteínas en el cilio. Concretamente, ratones mutantes para FUZ presentan defectos en el tubo neural y alteraciones en la señalización de la ruta Hedgehog debidas al ensamblaje defectivo del cilio primario⁹⁸. Además, en este mismo estudio demostraron que FUZ interviene en la ciliogénesis de las células multiciliadas del epitelio respiratorio y su anclaje en la membrana apical. La relación entre la ruta de PCP y el complejo CPLANE ha sido estudiada en profundidad en vertebrados, donde además se ha relacionado con el posicionamiento de los cuerpos basales de los cilios. En este sentido, se ha demostrado que DVL es esencial para el posicionamiento de los cuerpos basales en un mecanismo dependiente de Rho, que orienta en el plano el pie basal para producir el batido direccionado de los cilios en las células multiciliadas⁹⁹.

En su conjunto, estos estudios revelan un importante papel de los miembros del núcleo de señalización de polaridad celular planar, así como de los PPE, en la migración orientada de los cuerpos basales en células de vertebrados, y aunque fueron inicialmente descritos en *Drosophila*, su función en el posicionamiento de los centriolos más allá de las células multiciliadas ha comenzado a estudiarse en los últimos años. A este esclarecimiento ha contribuido notablemente el trabajo previamente publicado en nuestro laboratorio¹⁰⁰, que sirve como punto de partida para este capítulo, y que detallaremos a continuación.

La ruta de Fz-PCP y el posicionamiento de los centriolos en *Drosophila*

Los hallazgos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que, a lo largo del desarrollo de las células epiteliales del ala de *Drosophila*, los centriolos se posicionan progresivamente en la zona distal de cada célula (Figura 10). Esta migración hacia la región distal, que ocurre de forma simultánea al desarrollo de las quetas de actina, reveló un mecanismo de polarización de los centriolos en el que podrían estar implicadas las rutas de polaridad celular planar.

Para estudiar el posicionamiento de estructuras subcelulares como los centriolos es necesario delimitar primero el contorno celular, lo que se consiguió con el marcaje de la proteína Fmi (Figura 10 b'), que como hemos mencionado con anterioridad, se encuentra enriquecida en los dominios proximal y distal, además de en las uniones estrechas de las células epiteliales⁵⁹. La posición de los centriolos fue obtenida a través del marcaje de la proteína centriolar Sas-4 (Figura 10 b''), y se empleó un método cuantitativo que permitió analizar este posicionamiento a lo largo del desarrollo del epitelio del ala. De forma resumida, cada célula marcada fue dividida en cuatro cuadrantes, analizando el cuadrante en el cual se encontraba el centriolo. Esta cuantificación permitió comparar entre distintas condiciones experimentales.

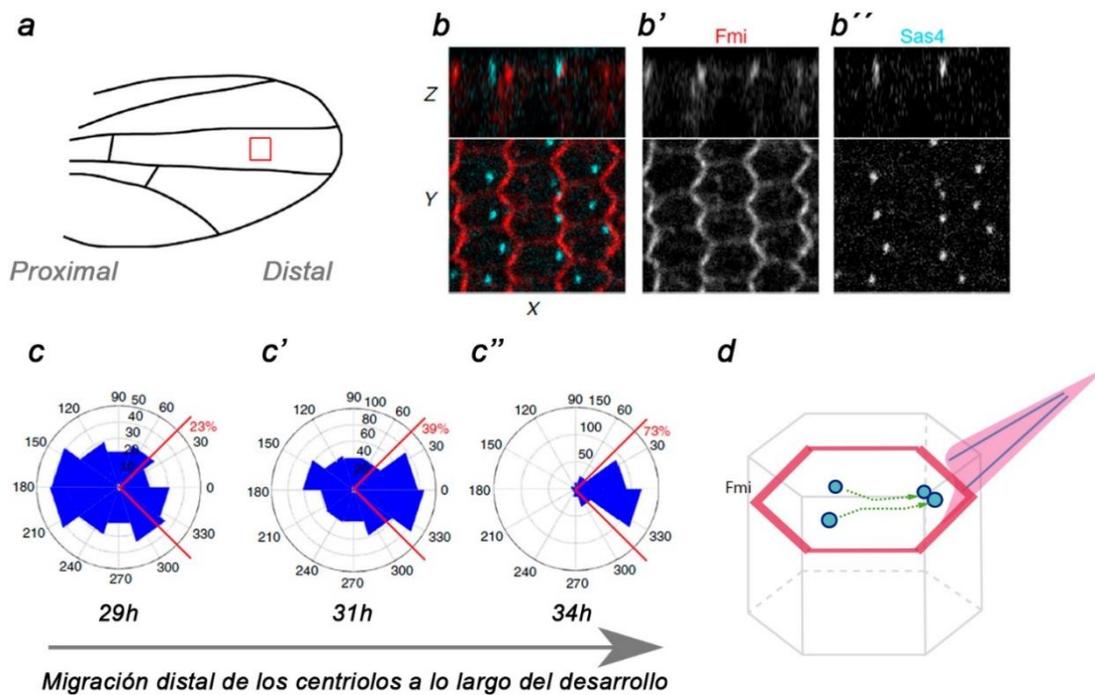


Figura 10: Migración distal de los centriolos en el desarrollo de las células del ala de *Drosophila*. Utilizando como modelo el epitelio del ala de *Drosophila* (a) y mediante el marcaje de la proteína Fmi para delimitar el contorno celular (b') y Sas-4 para marcar los centriolos (b''), se analizó el posicionamiento de los centrosomas a lo largo del desarrollo tras 29, 31 y 34h tras la formación de la pupa a 25°C (c-c''). (d) Representación esquemática de la migración distal de los centriolos en las células del ala de *Drosophila*.

Los resultados de distribución de centriolos obtenidos tras analizar las células en distintas etapas del desarrollo del ala fueron representados en diagramas de rosetas, en los que se resalta el cuadrante distal de las células (entre -45° y $+45^\circ$), donde los centriolos se van posicionando a medida que avanza el desarrollo del órgano (Figura 10 c-c''). En este trabajo se orientó la región distal del tejido y de las células hacia el lado derecho, tanto de las imágenes de microscopía como en las cuantificaciones y esquemas

de las figuras. En el panel d de la figura 10 se esquematiza el proceso de migración de los centriolos en las células del epitelio del ala.

El análisis de la migración polarizada de los centriolos a lo largo del desarrollo, junto con los datos de vertebrados detallados anteriormente, sugerían una posible regulación de las rutas de polaridad celular planar en esta migración. Como hemos descrito previamente, la alteración en la localización o la expresión de los miembros de la ruta de PCP se manifiesta en la pérdida de la orientación de las quetas de actina (Figura 9 b). Para determinar si defectos en los niveles de expresión de distintos miembros de la ruta de señalización de Fz-PCP provocaban una alteración en la distribución de los centriolos, se utilizaron técnicas de ARN de interferencia para el bloqueo de la expresión de Fmi (Figura 11 c-c'''), además de la sobreexpresión de Pk (Figura 11 e-e''') y Fz (Figura 11 g), y se analizó el posicionamiento de los centriolos en estas condiciones, comparándolo con células silvestres (Figura 11 a-a''')

Estos experimentos revelaron que la distribución de los centriolos en las células defectivas para miembros del núcleo de señalización de PCP se encontraba alterada, reduciéndose la abundancia de centriolos en el cuadrante distal, como se muestra en los gráficos de roseta de los paneles d, f y h de la figura 11 en comparación con las células silvestres (paneles a, i). De esta forma, el trabajo realizado previamente en nuestro laboratorio permitió demostrar que el posicionamiento de los centriolos está regulado por la ruta de Fz-PCP. Además, comprobaron que la distribución distal de los centriolos está relacionada con la orientación de las quetas de actina, ya que en individuos mutantes para una isoforma de la proteína Prickle, cuyo fenotipo se manifiesta en la inversión de las quetas de actina, los centriolos se disponían también orientados hacia la zona proximal (Figura 11 e, f) poniendo así de manifiesto la existencia de una conexión entre el desarrollo de esta estructura y la polarización de los centriolos.

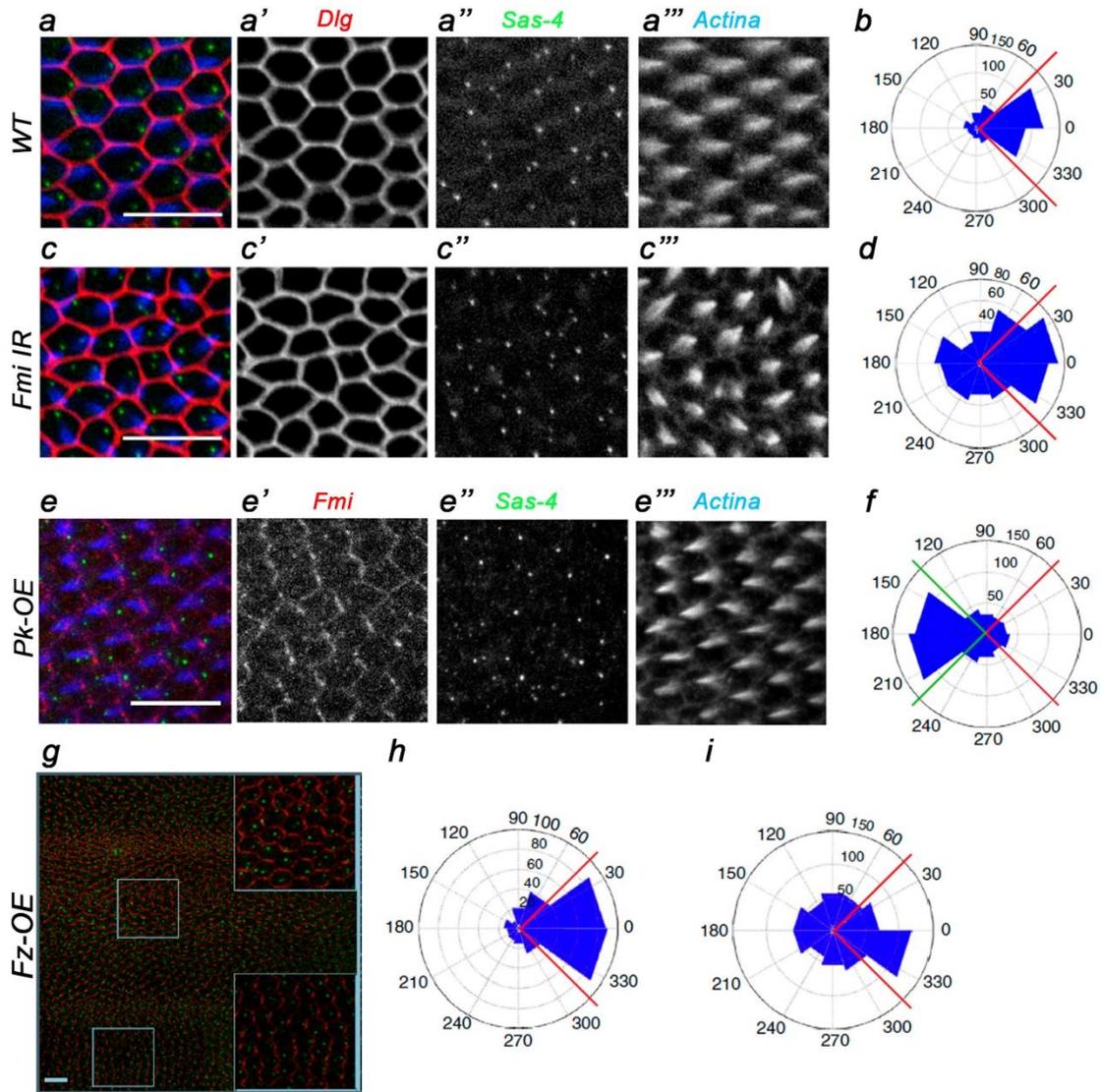


Figura 11: La polarización distal de los centriolos está regulada por la ruta de Fz-PCP. Mediante el marcaje de inmunofluorescencia de la proteína Disc large (Dlg, a', c') y la proteína centriolar Sas-4 (a'', c'') se cuantificó el posicionamiento de los centrosomas en las células del ala de *Drosophila* 32-34h tras la formación de la pupa (b, d) en individuos silvestres (a, b) y defectivos para la proteína Fmi (c, d). El marcaje de actina (a''', c''', e''') permitió identificar las células con alteración de la polaridad celular. En el caso de sobreexpresión de Pk (e, f) y Fz (g) el marcaje con Fmi (e') y Sas-4 (e'') permitió la cuantificación del posicionamiento de los centriolos en células silvestres (h) y células defectivas (f, i).

Tras comprobar que el posicionamiento de los centrosomas depende de la ruta de Fz-PCP, y en base a los datos en vertebrados que conectan la polarización de los cuerpos basales con el complejo CPLANE, se analizó si en células mutantes para *Mwh*, cuyo silenciamiento provoca la formación de varias quetas de actina en cada célula (Figura 9 c) la distribución de los centriolos se encontraba alterada. Los resultados de este experimento sugerían una leve disminución de la polarización de los centriolos (Figura 12 a-b), que aparecieron menos enriquecidos en el cuadrante distal en comparación con los individuos silvestres.

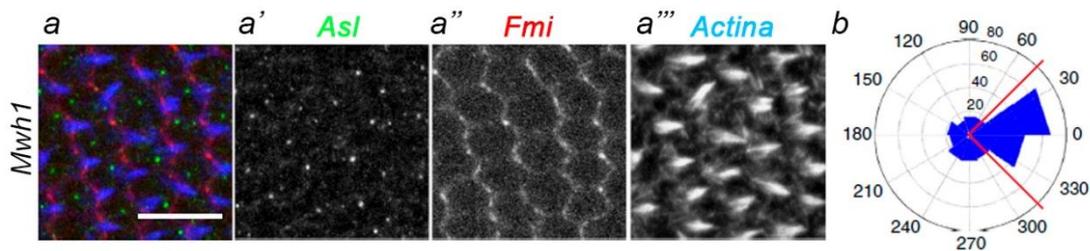


Figura 12: La polarización distal de los centriolos se ve alterada en las células defectivas para *Mwh*. Mediante el marcaje de inmunofluorescencia de las proteínas *Asl* (a') *Fmi* (a'') y *Actina* (a'''), se analizó el posicionamiento distal de los centriolos de *Drosophila*, representado en el gráfico de roseta (b).

Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron concluir que la polarización distal de los centriolos se encuentra regulada por la ruta de Fz-PCP, y que defectos en la misma provocan alteraciones en el posicionamiento de estos orgánulos. Además, se comprobó que en individuos mutantes para *Mwh*, la polarización de los centriolos se encontraba afectada¹⁰⁰. A pesar del conocimiento arrojado por este estudio, el papel del resto de efectores de PCP y el citoesqueleto de actina en el posicionamiento orientado de los centriolos en *Drosophila* aún no han sido esclarecidos. Además, puesto que el establecimiento de la polaridad celular planar está mediado por dos cascadas de señalización, cabría esperar una posible implicación de la ruta de Ft/Ds-PCP en la polarización de los centriolos, algo que aún no ha sido abordado.

En base a estos hallazgos, en este trabajo nos propusimos profundizar en la relación entre los efectores de la ruta de PCP y el posicionamiento coordinado de los centriolos, estudiando también el papel de la polimerización de actina en este proceso. Además, desarrollamos novedosos sistemas de cuantificación para analizar el papel de los PPE y el citoesqueleto de actina en la migración de estos orgánulos. Por último, en este capítulo nos propusimos identificar si, además de la ruta de Fz-PCP, el proceso de polarización distal de los centriolos está también regulado por la ruta de Ft/Ds-PCP.

OBJETIVOS CAPÍTULO I

Objetivos Capítulo I

En los organismos pluricelulares, el posicionamiento de los orgánulos en el interior celular es clave para la correcta función fisiológica de células, tejidos y órganos. Como cabría esperar, este proceso no ocurre de forma aleatoria, y está estrechamente regulado por distintas rutas de señalización, conocidas como rutas de polaridad celular. En este sentido, el posicionamiento y orientación de los centriolos es fundamental para una morfogénesis adecuada, pues están implicados en procesos tan diversos como la división celular orientada o el movimiento coordinado de los cilios en el epitelio de las vías respiratorias o los ventrículos del sistema nervioso.

En base a esto, profundizar en las rutas moleculares que gobiernan el posicionamiento de los centriolos es clave para comprender tanto la fisiología como los estados patológicos originados por defectos en las mismas. Debido a la dificultad que supone recrear los procesos de polaridad celular planar en placas de cultivo, *Drosophila melanogaster* se ha posicionado como uno de los modelos más empleados en el estudio de la polaridad celular planar.

Datos previos obtenidos en nuestro laboratorio han demostrado que, en las células del ala de *Drosophila*, el posicionamiento apical de los centriolos se encuentra regulado por la ruta de polaridad celular planar Fz-PCP. En base a estos datos, en el presente capítulo nos planteamos profundizar en la implicación de las rutas de polaridad celular planar en la migración polarizada de los centriolos. Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar el papel de los efectores de polaridad celular planar (PPE) en la migración polarizada de los centriolos en las células del epitelio del ala de *Drosophila*.
2. Analizar la implicación del citoesqueleto de actina en la migración orientada de los centriolos mediante el empleo de drogas que impiden su polimerización.

3. Estudiar el papel de la ruta de polaridad Ft/Ds-PCP en la regulación de la distribución de los centriolos en células de *Drosophila*.

RESULTADOS CAPÍTULO I

RESULTADOS CAPÍTULO I

En base a los hallazgos obtenidos previamente en nuestro laboratorio, descritos en el apartado de introducción, en este capítulo nos propusimos profundizar en la relación entre los efectores de la ruta de polaridad celular planar (PPE) y la migración coordinada de los centriolos, abordando también el papel del citoesqueleto de actina en este proceso. Además, nos propusimos estudiar si la polarización distal de los centriolos está también regulada por la ruta de Ft/Ds-PCP, algo que hasta ahora no ha sido descrito.

Como hemos mencionado en la introducción, algunos tejidos de *Drosophila* como el epitelio de las alas son de gran utilidad a la hora de estudiar la localización de estructuras y proteínas implicadas en los distintos sistemas de polaridad, pues la disposición de las células que componen estos tejidos conforma epitelios planos con ejes de polaridad claramente definidos, y con estructuras como las quetas de actina, orientadas distalmente. En el presente capítulo utilizamos este modelo de estudio para analizar el posicionamiento de los centriolos en células con alteraciones en efectores de PCP. Para lograr estos objetivos desarrollamos novedosos sistemas de cuantificación que permitieron analizar el posicionamiento de estos orgánulos en diversas condiciones experimentales.

Estrategia para el análisis de fenotipos de PCP

Para estudiar el posicionamiento de los centriolos en las células defectivas para los distintos efectores y miembros de la ruta de polaridad celular planar, empleamos el sistema de expresión GAL4/UAS, que permite la transcripción dirigida de secuencias de ARN de interferencia en regiones concretas del ala de *Drosophila*, haciendo posible comparar entre células silvestres y afectadas por el silenciamiento en alas de un mismo individuo. Como se detalla en el apartado de materiales y métodos (Figura M.1), este sistema de expresión está basado en el cruce de líneas de moscas que portan un determinado gen (o, como en nuestro caso, una secuencia de ARN de interferencia, ARNi) bajo la secuencia activadora UAS (*Up-stream Activating Sequence*) con individuos que presentan el activador transcripcional GAL4. En la descendencia del cruce, este activador transcripcional reconoce a las regiones UAS y promueve la transcripción de las

secuencias que se encuentran bajo su regulación. Para dirigir la expresión del activador transcripcional Gal4 a un determinado tejido o región de un órgano, éste se puede poner bajo la regulación de un promotor específico de ese tejido, lo que denominamos *driver*, de modo que la expresión de la secuencia de ARN de interferencia queda también restringida a esa región.

En esta tesis se utilizaron líneas de *Drosophila* portadoras de secuencias de ARN de interferencia bajo la región activadora UAS, que fueron cruzadas con la línea Gal4 bajo el *driver* *Decapentaplegic* (Dpp). La descendencia de estos cruces, esquematizados en el panel a de la figura RI.1, presenta alas en las que la transcripción de las secuencias UAS-ARNi tiene lugar en la región comprendida entre las venas longitudinales L3 y L4, sin afectar al resto del órgano (Figura RI.1 b). Esta estrategia fue utilizada tanto para los efectores de PCP (PPE) como para los miembros del núcleo de señalización de PCP.

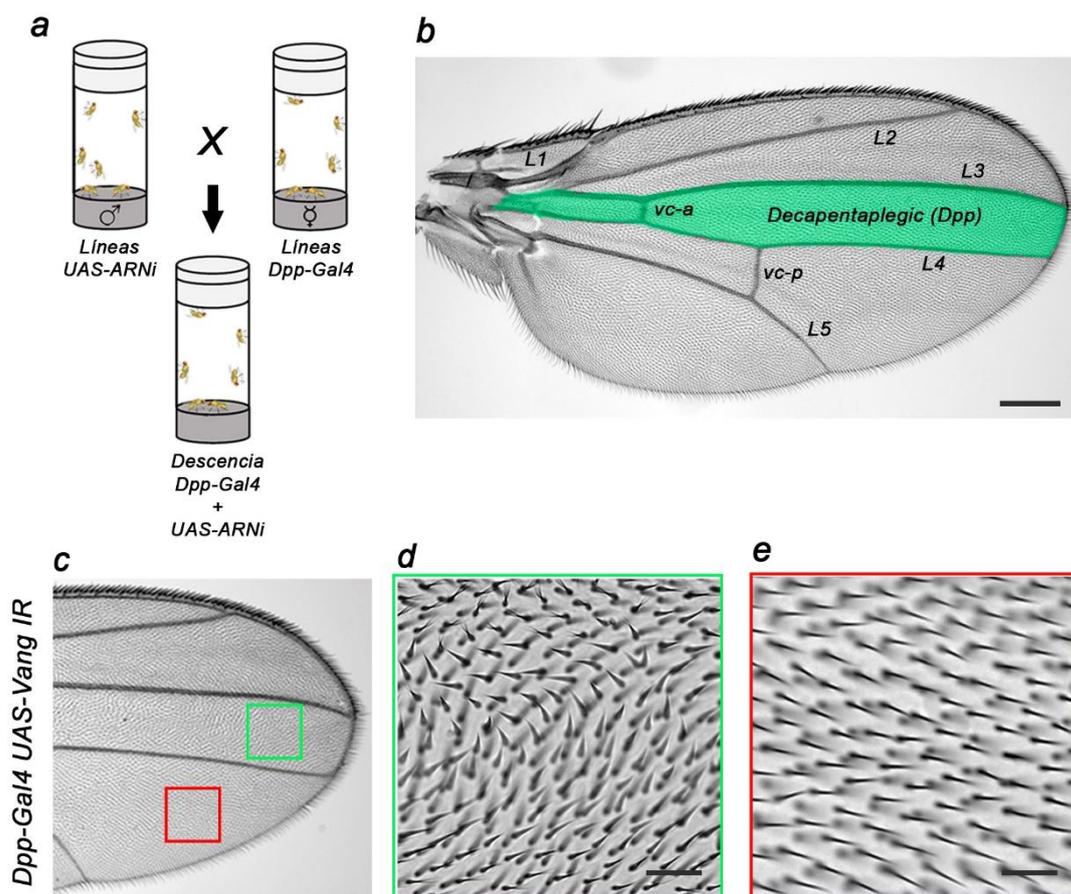


Figura RI.1: Estrategia para el empleo de líneas de *Drosophila* con secuencias de ARN de interferencia frente a proteínas reguladoras y efectoras de PCP. Esquema de los cruces entre las líneas con secuencias UAS-ARNi y líneas Dpp-Gal4 (a). Imagen de un ala de *Drosophila* adulta en la que se resalta en verde el dominio de expresión del *driver* Gal4 (b). Imagen de un ala afectada por el silenciamiento de la proteína Vang en el dominio Dpp (c). Detalle de una región dentro del dominio Dpp (d), y fuera del mismo (e). L1-5: Venas longitudinales, vc-a: vena cruzada anterior, vc-p: vena cruzada posterior. La barra de escala en b representa 250µm y en d, e 20µm.

En los paneles inferiores de la figura RI.1 se muestra un ejemplo de la estrategia utilizada. Como hemos descrito en la introducción, la alteración en los niveles de expresión de proteínas implicadas en el núcleo de señalización de PCP se manifiesta en las células del epitelio del ala de *Drosophila* en la pérdida de orientación de las quetas de actina. En este ejemplo se utilizó una línea de moscas portadora de una secuencia ARN de interferencia frente a la proteína Vang, que fue cruzada con la línea Dpp-Gal4, dirigiendo el efecto de esta interferencia sólo a la región comprendida entre las venas L3 y L4 (Figura RI.1 c). El aumento de esta zona, señalada en la figura con un recuadro verde, muestra una clara alteración en la polaridad de las quetas, que aparecen formando remolinos o incluso orientadas hacia la zona proximal (Figura RI.1 d). Cuando analizamos las quetas en las células no afectas por el ARN de interferencia, fuera del dominio Dpp (recuadro rojo), comprobamos que la orientación de éstas no se encuentra alterada (Figura RI.1 e). Esta estrategia nos permitió comparar el posicionamiento de los centriolos en células defectivas para elementos de la ruta de PCP con el de las células silvestres en un mismo individuo.

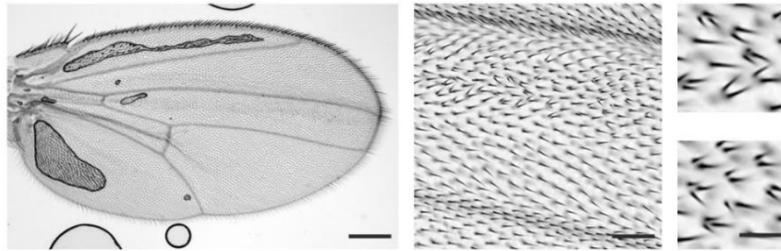
Validación de las líneas de *Drosophila* con ARNi para los efectores de PCP

Una vez definida la estrategia para modular los niveles de expresión de los miembros de la ruta de PCP en las células del ala de *Drosophila*, pasamos a validar el nivel de afectación generado empleando las líneas comerciales portadoras de secuencias de ARN de interferencia disponibles para los distintos PPE. Esta primera aproximación nos permitió seleccionar aquellas líneas que provocaron fenotipos más robustos para el posterior análisis del posicionamiento de los centriolos.

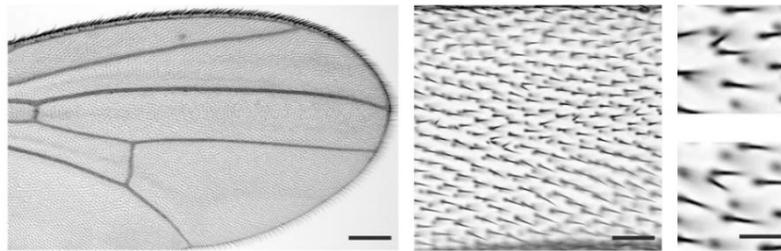
Como hemos detallado en la introducción, los defectos en los efectores de PCP se manifiestan en el desarrollo de múltiples quetas de actina en cada célula del ala de *Drosophila*. Siguiendo la aproximación anteriormente descrita, las líneas comerciales portadoras de ARN de interferencia para los efectores de PCP Fritz, Inturned, Fuzzy y Mwh fueron cruzadas con la línea Dpp-Gal4. Las pupas se incubaron a 29°C, temperatura a la cual el sistema de expresión UAS-Gal4 provoca mayor intensidad del fenotipo. Las alas de los individuos adultos de la descendencia fueron observadas bajo el microscopio óptico. Se utilizaron líneas que contenían distintas secuencias de interferencia para el

mismo gen, con el objetivo de seleccionar aquellas que provocasen una mayor intensidad en el fenotipo de quetas múltiples.

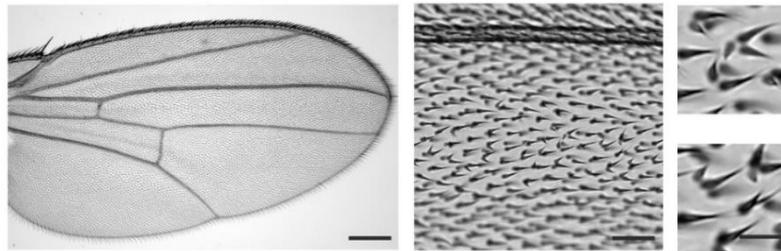
a *dpp> Fritz-IR (103611/KK) 29°C*



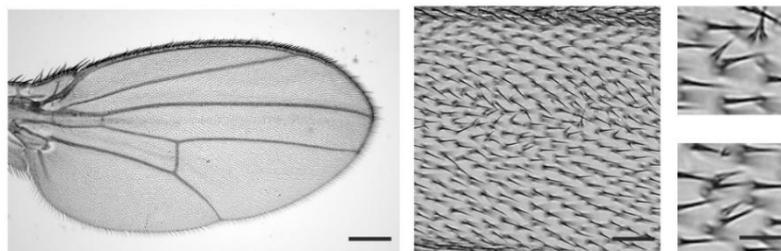
b *dpp> Fritz-IR (40088/GD) 29°C*



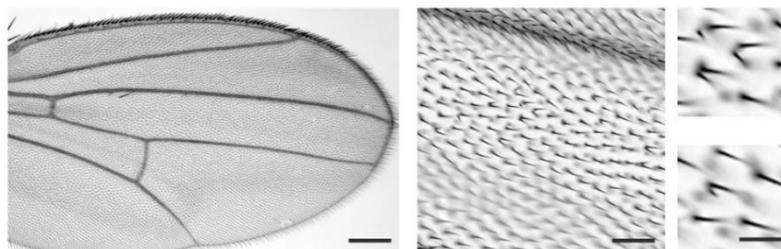
c *dpp> In-IR (27252/GD) 29°C*



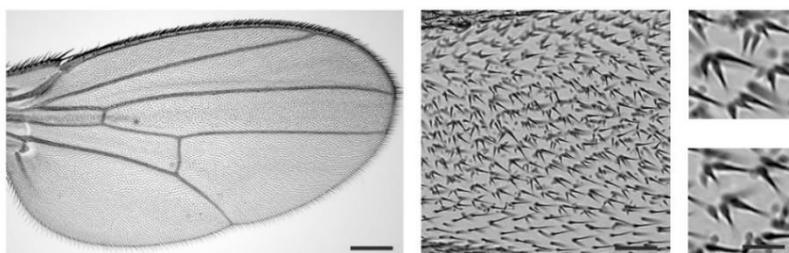
d *dpp> In-IR (103407/KK) 29°C*



e *dpp> Fuzzy-IR (108550/KK) 29°C*



f *dpp> Mwh-IR (41514/GD) 29°C*



g *dpp> Mwh-IR (45265/GD) 29°C*

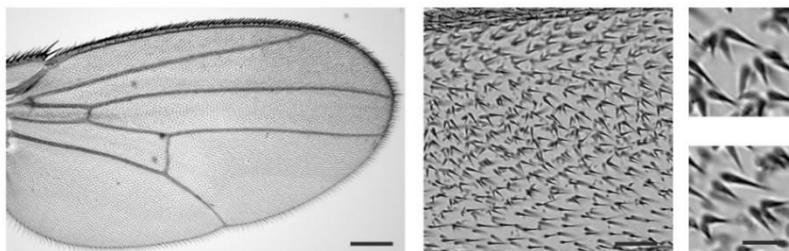


Figura RI.2: Análisis del fenotipo provocado por el silenciamiento de los efectores de PCP en células del dominio Dpp de alas de ejemplares adultos. A la izquierda de cada panel se muestra el aspecto general del ala (la barra de escala representa 250µm), en la zona central se observa un detalle del dominio Dpp (barra de escala 20µm), y a la derecha de cada panel se muestra un aumento mayor de las quetas de actina (barra de escala 4µm). Se utilizaron líneas con ARN de interferencia frente a Fritz (a, b), Inturned (c, d), Fuzzy (e) y Mwh (f, g).

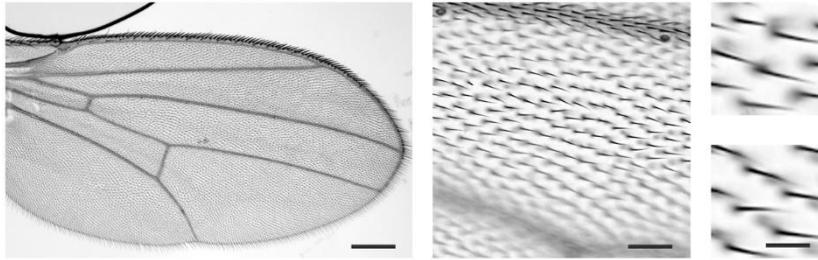
En la figura RI.2 se muestran imágenes de las alas de la descendencia de los cruces entre líneas UAS-ARNi y Dpp-Gal4. Para cada línea de *Drosophila* utilizada se muestra una imagen del aspecto general del órgano completo, un aumento del dominio Dpp, para comprobar el fenotipo de quetas múltiples, y dos detalles de las células a un mayor aumento. El silenciamiento del efector de PCP Fritz, para el que se utilizaron dos líneas distintas (Figura RI.2 a, b), provocó un fenotipo de quetas múltiples en el dominio Dpp de la descendencia de ambos cruces, sin embargo, el nivel de afectación obtenido utilizando la línea 103611/KK (Figura RI.2 a) fue más robusto, encontrando un mayor número de células con quetas múltiples que en el cruce de la línea 40088/GD (Figura RI.2 b). En el caso del silenciamiento de la proteína Inturned (Figura RI.2 c, d), las alas de la descendencia presentaban varias células con quetas múltiples dispersas dentro del dominio Dpp. Una de las líneas utilizadas frente a esta proteína, la 103407/KK, provocó un estrechamiento del dominio Dpp, y defectos en la vena cruzada anterior (vc-a), como podemos observar en el panel d de la figura RI.2. Este efecto puede ser causado por la muerte de las células tras el silenciamiento de Inturned. El análisis de las alas con defectos en la expresión de Fuzzy (Figura RI.2 e) mostró muy pocas células con quetas

múltiples en el dominio Dpp, mientras que el silenciamiento de Mwh, para el que también se utilizaron dos líneas distintas, provocó fenotipos muy robustos en ambas, como se muestra en los paneles f y g de la figura R1.2, donde podemos observar células con hasta tres y cuatro quetas de actina.

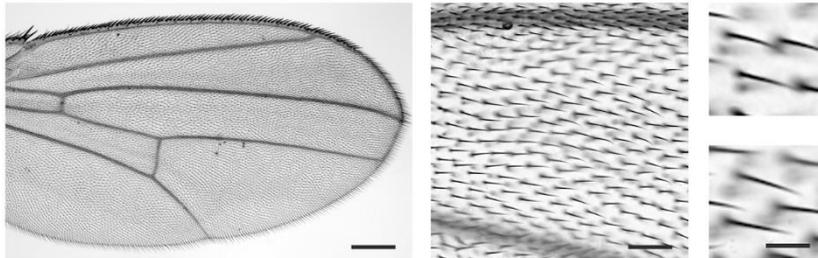
Los resultados obtenidos en este experimento demostraron que el silenciamiento de los efectores de PCP utilizando líneas de *Drosophila* con ARN de interferencia frente a Fritz, Inturned, Fuzzy y Mwh provocan fenotipos de quetas de actina múltiples. Los fenotipos más robustos fueron obtenidos utilizando las líneas 103611/KK para Fritz, y 41514/GD y 45265/GD para Mwh, que fueron empleadas para el posterior análisis del posicionamiento de los centriolos.

Además de los efectores de PCP anteriormente estudiados, como hemos descrito en la introducción, las alteraciones en las GTPasas de la familia de Rho, que modulan el citoesqueleto de actina, provocan fenotipos de quetas múltiples, y su localización celular está mediada por las rutas de PCP¹⁰¹. Esta familia está compuesta por miembros como Rho A, Rac1, Cdc42, la proteína quinasa asociada a Rho (Drok), y Daam1. En base a estos datos, decidimos estudiar el efecto del silenciamiento de estas proteínas en el posicionamiento de los centriolos de *Drosophila*, para lo que utilizamos la misma aproximación anteriormente descrita, comprobando el nivel de afectación fenotípica en los cruces con las distintas líneas comerciales de ARNi disponibles.

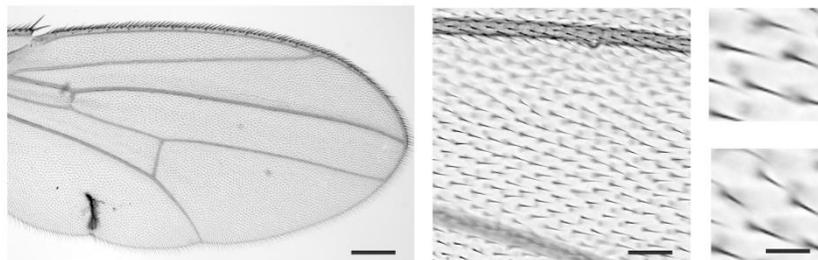
a *dpp* > *Rho-IR* (107502/KK)



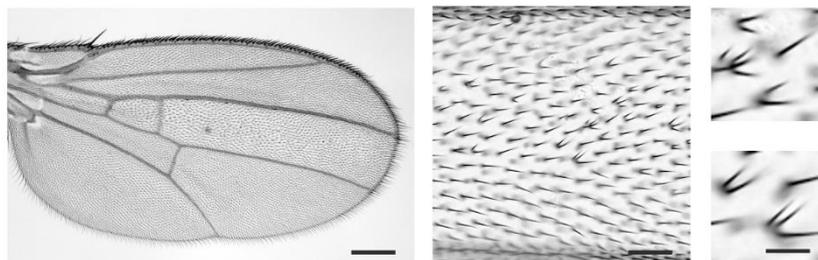
b *dpp* > *Rho-IR* (51952/GD)



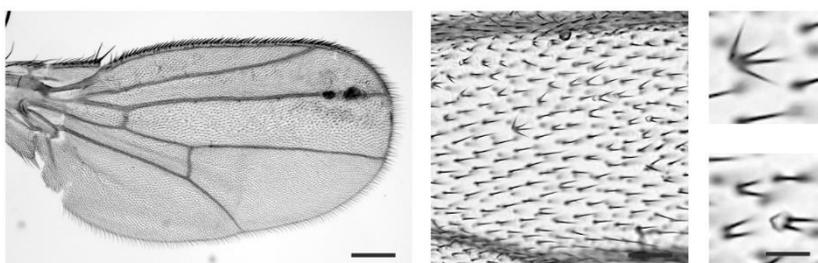
c *dpp* > *Rac1-IR* (49247/GD)



d *dpp* > *Drok-IR* (3793/GD)



e *dpp* > *Drok-IR* (104675/KK)



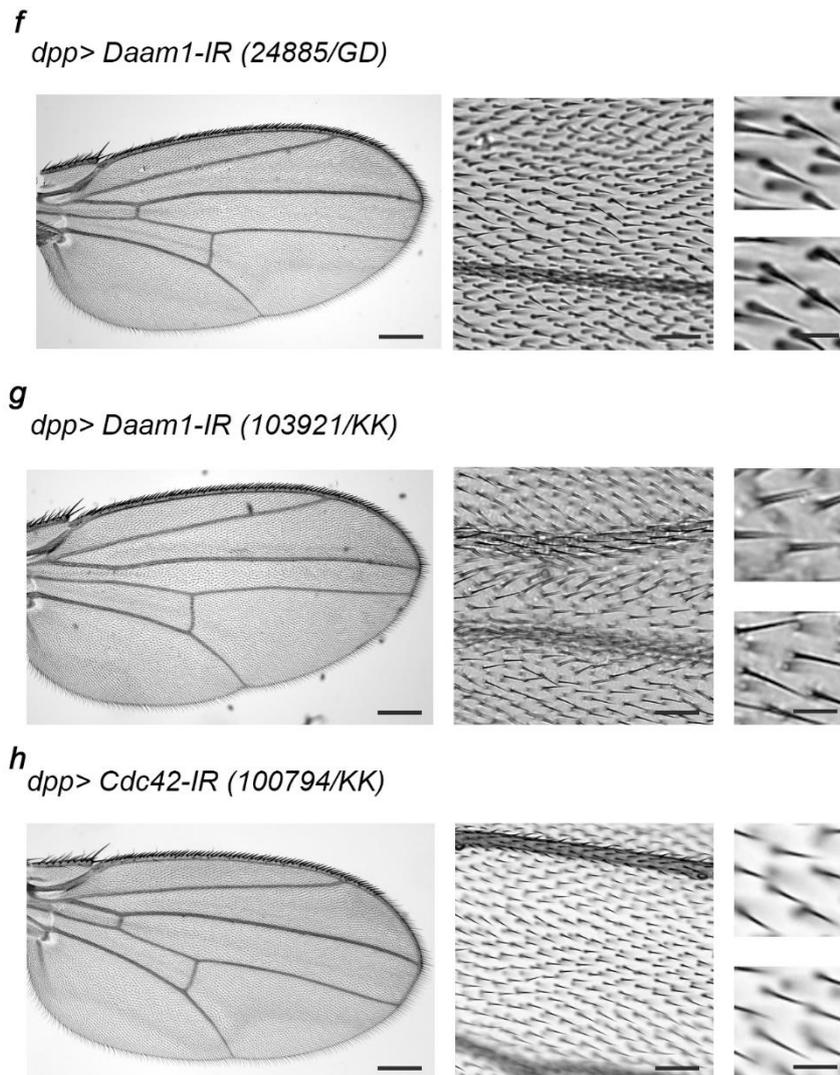


Figura RI.3: Análisis del fenotipo provocado por el silenciamiento de las GTPasas de la familia de Rho en el dominio Dpp de alas de ejemplares adultos. En cada panel se muestra a la izquierda una imagen del aspecto general del ala (barra de escala 250 μ m), en la zona central, un detalle del dominio Dpp (barra de escala 20 μ m), y a la derecha un aumento mayor de las quetas de actina (barra de escala 4 μ m). Se utilizaron líneas con ARN de interferencia frente a Rho (a, b), Rac1 (c), Drok (d, e), Daam1 (f, g) y Cdc42 (h).

Una vez realizados los cruces, analizamos los fenotipos provocados por el silenciamiento de las proteínas GTPasas de la familia de Rho. El silenciamiento de Rho, para el que se utilizaron dos líneas distintas, no ocasionó células con quetas de actina múltiples en dominio Dpp, como se muestra en los paneles a y b de la figura RI.3, resultado que también fue obtenido en el caso del silenciamiento de Rac1 (Figura RI.3 c). La descendencia de los cruces con líneas portadoras de secuencias de ARNi frente a Drok, en cambio, sí mostró fenotipos robustos de múltiples quetas de actina, como podemos observar en las imágenes de mayor aumento de los paneles d y e de la figura RI.3. Además de este fenotipo, los ejemplares defectivos para Drok también

presentaban notables alteraciones en el dominio Dpp, que se observan en las imágenes del ala completa, como el aumento del tamaño de esta región, posiblemente provocado por la hipertrofia de las células afectadas, y el crecimiento ectópico de una tercera vena cruzada en el caso de los cruces con la línea 3793/GD (Figura RI.3 d), además del crecimiento de tumores en dominio Dpp en el caso de la línea 104675/KK (Figura RI.3 e). El silenciamiento de la proteína Daam1 no ocasionó células con múltiples quetas de actina (Figura RI.3 f, g), aunque sí observamos un notable estrechamiento en el dominio Dpp, y la pérdida de la vena cruzada anterior en el caso de las alas del cruce con la línea 103921/KK (Figura RI.3 g). Por último, el silenciamiento de Cdc42 tampoco provocó fenotipo de quetas múltiples, ni ninguna alteración aparente del tejido (Figura RI.3 h).

Los resultados del análisis de fenotipos ocasionados por el silenciamiento de los moduladores de actina de la familia de Rho demostraron que el bloqueo de la expresión de la quinasa de Rho, Drok provoca el desarrollo de células con quetas de actina múltiples. El silenciamiento del resto de GTPasas estudiadas en este experimento no provocó este fenotipo.

Una vez analizados los fenotipos en adulto, seleccionamos las líneas 103611/KK (Fritz), 41514/GD y 45265/GD (Mwh) y 3793/GD y 104675/KK (Drok), y la incubación de las pupas a 29°C para analizar el papel de los PPE y los moduladores del citoesqueleto de actina en el posicionamiento de los centriolos.

Métodos para el análisis de polarización de centriolos

De manera general, para caracterizar el posicionamiento de un centriolo en el interior celular es necesario marcar el centriolo y el contorno de la célula que lo contiene. El posicionamiento de los centriolos puede analizarse mediante el marcaje y seguimiento de la proteína centriolar Sas4 (Figura RI.4 c). En nuestro caso, utilizamos una línea de *Drosophila* que contenía la construcción Sas4-GFP, que se expresaba en todas las células del individuo, además del *driver* Dpp-Gal4, para dirigir así el silenciamiento de las proteínas de interés en células con los centriolos marcados. Para delimitar el contorno celular empleamos el marcaje de la proteína Flamingo, localizada en las uniones adherentes de las células (Figura RI.4 b). Por último, la identificación del fenotipo de quetas múltiples se realizó mediante el marcaje de los filamentos de actina

mediante el uso de faloidina conjugada con fluoróforos (Figura RI.4 d). Del mismo modo que en el trabajo previo desarrollado en nuestro laboratorio, en las imágenes de microscopía, cuantificaciones, y esquemas de las figuras, la región distal de las células y tejidos se orientó siempre hacia el lado derecho. Una vez marcados los distintos elementos celulares, se utilizaron dos métodos cuantitativos diferentes que se exponen brevemente a continuación, y que se describen con más detalle en el apartado de materiales y métodos.

El primero de ellos, el método ABP (*Average Basal Body Position*), mide la polarización mediante la distancia del centriolo al centroide de la célula, siendo -1 la coordenada más proximal de la célula, 0 el centroide celular, y 1 la coordenada más distal, como se esquematiza en el panel e de la figura RI.4. Utilizando un software específico calculamos la media de estos valores en un conjunto de células, y comparamos así la polarización de los centriolos en zonas afectadas y no afectadas por el silenciamiento de las dianas analizadas. Los valores más altos (más cercanos a 1) representan centriolos polarizados distalmente, mientras que los valores cercanos a 0 representarían centriolos no polarizados. Valores más cercanos a -1 indican centriolos polarizados proximalmente.

En el segundo método, el método Q (del inglés *Quartile*), las células se dividen en cuatro cuadrantes o cuartiles, y cada centriolo es asignado a un cuartil (Q1-Q4) determinado en función de su posición, como se muestra en el esquema recogido en el panel f de la figura RI.4. Posteriormente se cuantifica el número de centriolos presentes en cada cuartil para una población de células. Los resultados obtenidos de las cuantificaciones empleando estos dos métodos nos permitió comparar entre poblaciones de células afectadas por el silenciamiento y silvestres.

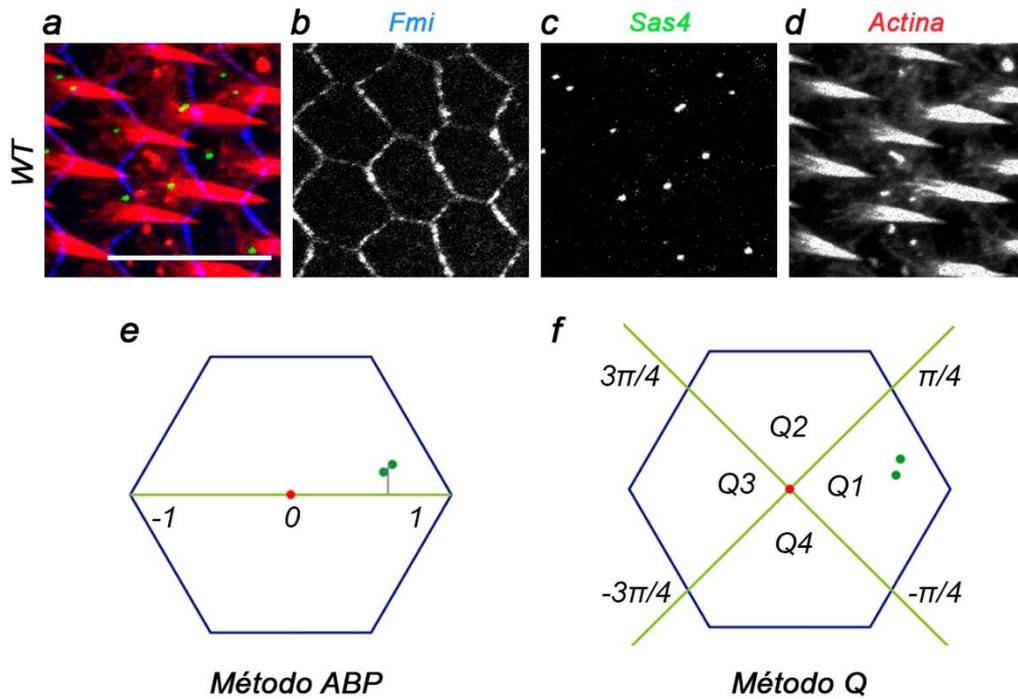


Figura R1.4: Métodos para la cuantificación de la distribución de los centriolos en células de *Drosophila*. Para delimitar el contorno celular se utilizó el marcaje de la proteína Flamingo (azul en a y gris en b), para los centriolos, Sas4 (verde en a y gris en c), y para las quetas se empleó el marcaje de actina polimerizada (rojo en a y gris en d). El método ABP se esquematiza en el panel e y el método Q en el f. La barra de escala en a representa $10\mu\text{m}$.

Las células con defectos de PPE no presentan alteraciones en la polaridad de los centriolos

Tras seleccionar las líneas de *Drosophila* con ARN de interferencia que provocaron fenotipos robustos de quetas de actina múltiples, realizamos los cruces entre éstas y la línea Sas4-GFP/Dpp-Gal4, para así evaluar la posición de los centriolos con los métodos de cuantificación anteriormente descritos. Las líneas utilizadas en este experimento fueron las seleccionadas en el análisis de fenotipos anterior: Fritz (103611/KK), Mwh (41514/GD) y Drok (3793/GD). Las pupas procedentes de estos cruces se colectaron e incubaron a 29°C durante 28,5h, tiempo determinado previamente en nuestro laboratorio, en el cual las quetas de actina se desarrollan totalmente, y los centriolos se encuentran completamente polarizados. Tomando como referencia el momento de la recolección de las pupas, denominamos los diferentes tiempos de incubación como APF (*After Pupae Formation*). Posteriormente se realizó la inmunofluorescencia para Fmi y el marcaje de actina para detectar las quetas.

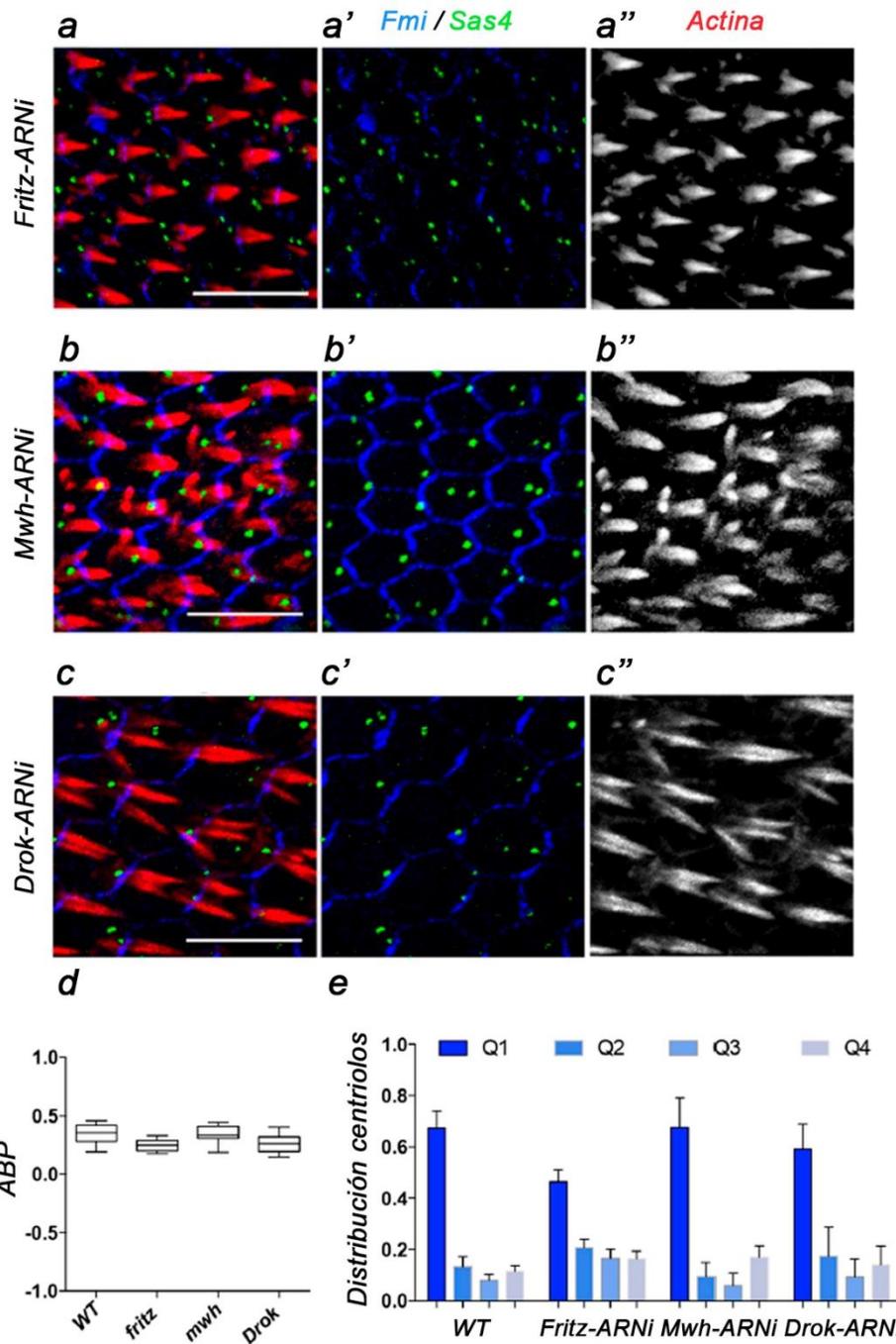


Figura R1.5: Análisis de la polarización de los centriolos en células con fenotipos de quetas múltiples producidos por el silenciamiento de los PPE. Las imágenes de microscopía confocal muestran las proteínas Sas4-GFP (en verde en los paneles a', b', c'), la inmunodetección de Fmi (azul en a', b', c') y el marcaje de actina (a'', b'', c''). Las alas fueron procesadas 28,5h APF y la distribución de los centriolos fue analizada mediante el método ABP (d) y mediante el método Q (e). La barra de escala representa 10µm.

Se adquirieron imágenes mediante microscopía confocal del dominio Dpp y de regiones del ala no afectadas por el silenciamiento. En la figura R1.5 se muestra un ejemplo de las imágenes adquiridas para cada PPE analizado: Fritz (Figura R1.5 a-a''), Mwh (Figura R1.5 b-b'') y Drok (Figura R1.5 c-c''). El marcaje de actina que se muestra en

los paneles a'', b'' y c'' nos permitió identificar las células que presentaban fenotipo de quetas múltiples. Como podemos comprobar en el panel a'', el silenciamiento de Fritz provocó el desarrollo de quetas dobles en células dispersas dentro del dominio Dpp, sin embargo, el silenciamiento de Mwh y Drok generó fenotipos más robustos, con gran cantidad de células con dos y tres quetas (Figura RI.5 b'', c'').

Los resultados de la cuantificación de la polarización de los centriolos utilizando el método ABP se muestran en el panel d de la figura RI.5. Esta cuantificación demostró que, al contrario de lo esperado, las células con fenotipo de múltiples quetas de actina provocado por el silenciamiento de los PPE Fritz, Mwh y Drok no presentaban alteraciones en la polarización distal de los centriolos, y los valores obtenidos no fueron significativamente distintos a los de las células no afectadas. Por el contrario, utilizando el método Q para determinar la distribución de los centriolos en los distintos cuartiles, comprobamos que en el caso del silenciamiento de Fritz sí existía una leve, aunque estadísticamente significativa, reducción de la distribución de los centriolos en el Q1 cuando lo comparamos con las células no afectadas (Figura RI.5 e). En consonancia con el método ABP, el método Q mostró que no existían diferencias entre la distribución de los centriolos de las células con fenotipos de pelos múltiples en el silenciamiento de Mwh y Drok (Figura RI.5 d, e).

Además, la observación de la longitud de las quetas de actina en las imágenes del experimento anterior nos permitió determinar que, en las células afectadas por el silenciamiento de Fritz, el tamaño de éstas era considerablemente menor al compararlas con las células no afectadas, resultado que podemos observar al comparar los paneles a y c de la figura RI.5. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio, en los cuales se mostraba la progresiva polarización de los centriolos a lo largo del desarrollo, nos preguntamos si la reducción de la distribución de centriolos en el Q1 de las células con el ARNi para Fritz podía estar debida a un retraso en el desarrollo de estas células. Para resolver esta pregunta, cuantificamos la distribución de los centriolos en alas de Fritz-ARNi con distintos tamaños de quetas de actina en el dominio Dpp (Figura RI.6 a-f), y comparamos a través del método Q la polarización de los centriolos en los distintos grupos de células en función de su tamaño. Como se muestra en el panel g la figura RI.6, a medida que las quetas de actina

incrementan su tamaño, lo que se corresponde con el avance en el desarrollo de las células del epitelio del ala, los centriolos se enriquecen en el Q1 (Figura RI.6 h). Este resultado explicaría el leve defecto en la polarización de los centriolos obtenido en el experimento anterior como un retraso en el desarrollo provocado por el silenciamiento de Fritz, y no como una regulación directa de este PPE en la polaridad de los centriolos.

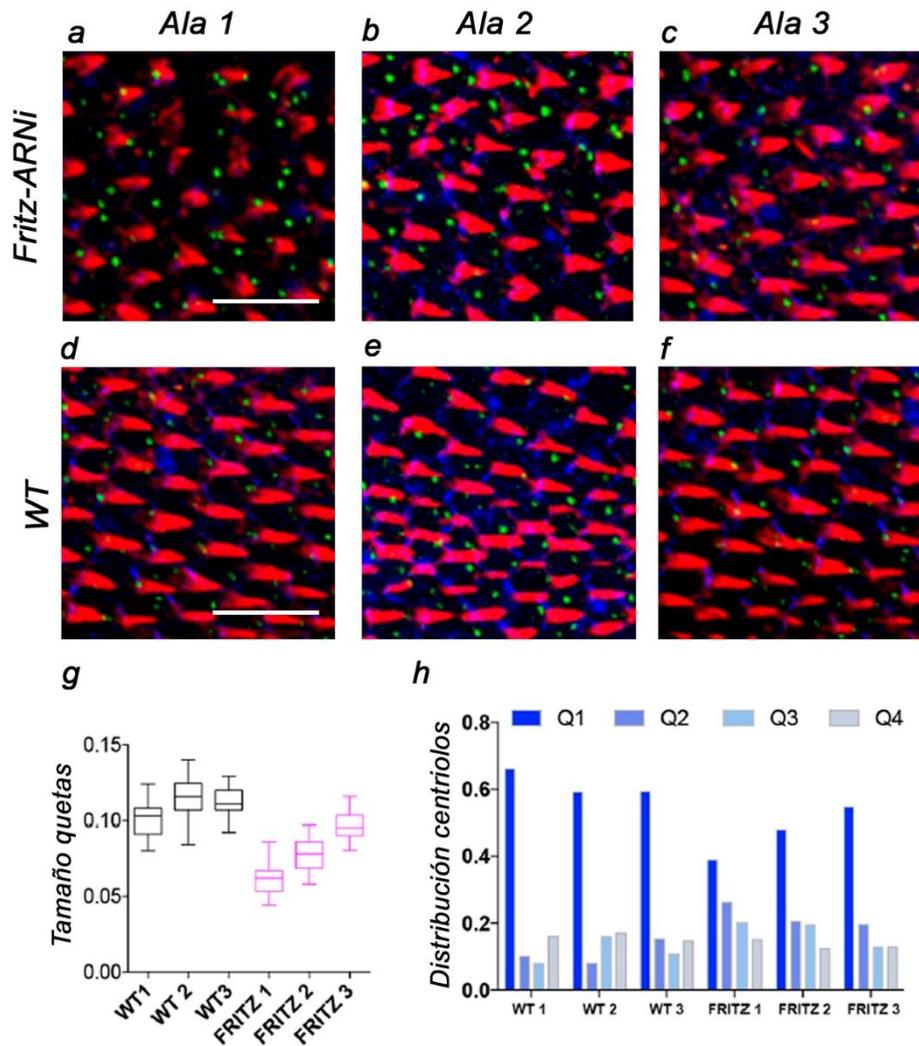


Figura RI.6: Análisis del tamaño de las quetas de actina en células silenciadas para Fritz. Las imágenes de microscopía confocal muestran las proteínas Sas4-GFP (en verde en los paneles a-f), la inmunodetección de Fmi (en azul) y el marcaje de actina (en rojo). La cuantificación del tamaño de las quetas de actina se representa en el panel g, y la cuantificación de la distribución de los centriolos siguiendo el método Q en el panel h.

Este mismo retraso en el desarrollo celular podría explicar el resultado obtenido en nuestro laboratorio en el mutante de Mwh, que mostraba una leve disminución de la polarización de los centriolos al compararlo con los individuos silvestres, como se muestra en la figura 12 de la introducción.

Además del retraso en el desarrollo de las células del epitelio del ala de *Drosophila*, en base a las imágenes adquiridas para la cuantificación de la polaridad en áreas defectivas para la quinasa *Drok* observamos que las células con múltiples quetas de actina presentaban un tamaño mayor que las células no afectadas de la misma región del ala (Figura RI.7 a-c). Un análisis más detallado nos permitió comprobar que este incremento en el tamaño celular era mayor en las células con 3 o más quetas de actina, mientras que las células con 2 quetas presentaban un tamaño intermedio, resultado que se obtuvo en ambas líneas con ARNi para *Drok* (Figura RI.7 d).

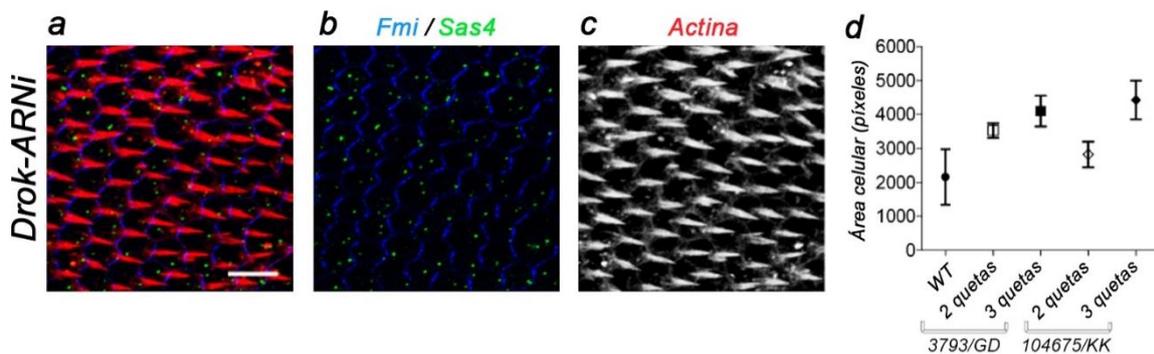


Figura RI.7 Análisis del tamaño celular en células defectivas para *Drok*. Las imágenes de microscopía confocal muestran las proteínas Sas4-GFP (en verde en los paneles a-c), la inmunodetección de Fmi (en azul) y el marcaje de actina (en rojo). La cuantificación del área de las células se muestra en el panel d. La barra de escala representa 10µm.

Estos datos en su conjunto indican que las alteraciones en la expresión de los efectores de PCP que provocan defectos en la polimerización de actina, a pesar de provocar un retraso en el desarrollo o un incremento en el tamaño celular, no afectan a la posición final del centriolo, que se localiza en la región distal también en las células con múltiples quetas.

La polimerización de actina es necesaria para la adquisición de la polaridad de los centriolos

Una vez comprobado que los efectores de PCP que regulan la formación de las quetas de actina no están implicados en la polarización distal de los centriolos, nos preguntamos si la polimerización de actina es necesaria para esta polarización.

Para resolver esta pregunta, decidimos realizar un cultivo *in vitro* de pupas de *Drosophila*, con el fin de optimizar las condiciones de cultivo en las cuales las células del epitelio del ala completasen su desarrollo, formándose las quetas de actina y la

polarización distal de los centriolos. Para ello, tras la disección de las pupas 25h después de su formación, éstas fueron cultivadas en medio de células de insecto SSM3 (Sigma), poniendo a punto las condiciones de incubación de 10h a una temperatura de 29°C, tiempo en el cual el 30-40% de las alas se desplegaban completamente y generaban las quetas de actina. Una vez determinadas las condiciones de cultivo, las alas fueron fijadas y realizamos inmunofluorescencias para la proteína centriolar Asterless (Asl), para marcar los centriolos, y la cadherina Flamingo, para determinar el contorno celular, además de marcar la actina con faloidina para comprobar la presencia de las quetas apicales. En el panel a de la figura RI.8 podemos ver el estado del epitelio del ala en el momento de la recolección de las pupas, 25h después de su formación, cuando aún no se han formado las quetas de actina, y los centriolos no están polarizados. En el panel b se muestra una sección de un ala incubada *in vitro* durante 10h, que desarrolló correctamente las quetas como se observa en el marcaje de actina, similar al de las alas de pupas no diseccionadas e incubadas durante 28,5h, que nos sirvió como control (Figura RI.8 c).

Después de los marcajes, utilizamos los métodos ABP y Q para la cuantificación de la polarización distal de los centriolos en nuestro sistema de cultivo *in vitro*. Los resultados obtenidos mediante el método Q mostraron que las pupas cultivadas a 29°C durante 25h y posteriormente 10h en medio SSM3 (25+10) presentaban una reducción en la polarización, aunque aún existía un claro enriquecimiento de los centriolos en el Q1 en comparación con las células de pupas cultivadas durante 25h (Figura RI.8 e). La distribución de centriolos obtenida para las pupas cultivadas *in toto* durante 28,5h fue la misma que la detallada en los experimentos anteriores para las células *WT*, encontrando más del 75% de los centriolos en el Q1. Los resultados obtenidos empleando el método ABP siguieron la misma tendencia, encontrando en las pupas 25+10 una polarización intermedia entre la de 25h y 28,5 (Figura RI.8 f).

Una vez establecido un sistema de cultivo *in vitro* que permitió un desarrollo parcial de las alas de pupas de *Drosophila*, con la consiguiente polarización distal de los centriolos, decidimos utilizar la toxina Citocalasina D (Cyt D), que bloquea la polimerización de la actina e impide la formación de los filamentos y las quetas. En nuestros cultivos *in vitro*, tratamos las pupas con 5ng/ μ l de Cyt D durante 10h, y como

podemos observar en el panel d de la figura RI.8, en estas condiciones las células del ala no desarrollan las quetas de actina.

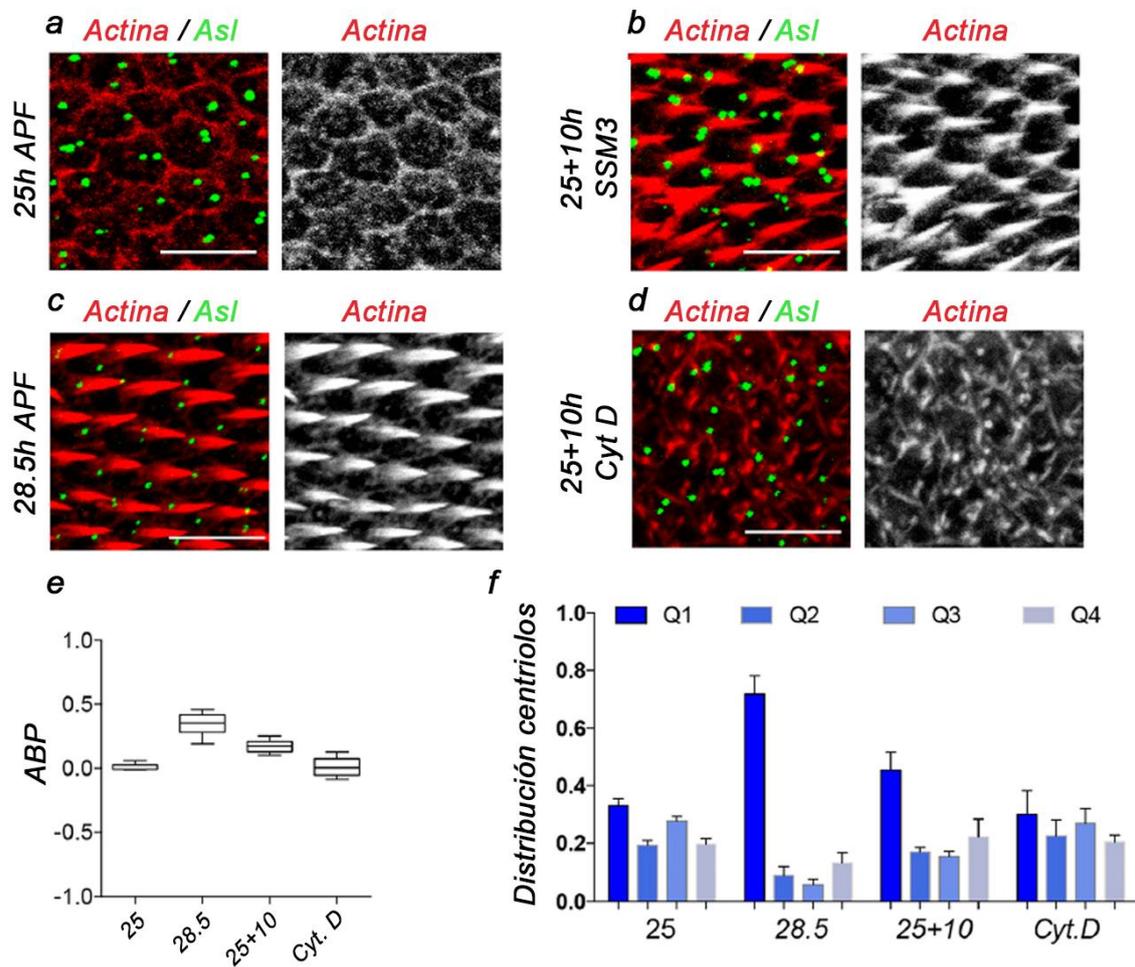


Figura RI.8: Estudio de la polarización de los centriolos tras la inhibición de la polimerización de actina. Las imágenes de microscopía confocal muestran el marcaje de Asl (en verde en los paneles a-d), y actina (en rojo en a-d). El panel a muestra una sección del ala en el momento de la recolección de las pupas, 25h APF. En el panel b se muestra una sección del ala desarrollada *in vitro* en medio SSM3 durante 10h, tras ser colectada 25h APF. El desarrollo de las quetas en este sistema se asemeja al de las alas colectadas tras 28,5h (panel c). El tratamiento con Citocalasina D bloqueó por completo la formación de quetas de actina (d). La cuantificación de la distribución de los centriolos se realizó siguiendo el método ABP en el panel (e) y el método Q (f). La barra de escala en a-d representa 10µm.

Comparamos después la distribución de los centriolos en estas condiciones con la de las células de pupas diseccionadas tras 25h, 28,5h y 25+10 horas de incubación en medio SSM3. La cuantificación de la distribución de los centriolos de células tratadas con Cyt D, que se muestra en el panel e (método ABP) revela un valor cercano a 0, al igual que en las células colectadas antes de la formación de las quetas, lo que demostraría una distribución no polarizada de estos orgánulos. Estos resultados se corresponden con los obtenidos utilizando el método Q (Figura RI.8 f) que muestran también una

distribución similar de los centriolos en todos los cuadrantes de la célula, reflejando una ausencia de polarización en presencia de Citolasina D.

Los resultados obtenidos en este experimento demuestran que la polimerización de actina es necesaria para la correcta polarización de los centriolos en las células de las alas de *Drosophila*, y que el bloqueo de esta polarización con citocalasina D provoca una pérdida de la distribución de los centriolos en la región distal.

Desarrollo del método RCPD para el estudio de la distribución de los centriolos

Los resultados obtenidos en los apartados anteriores mostraron que, aunque los defectos en la expresión de los efectores de PCP y los miembros de la ruta de las GTPasas de actina no alteran el posicionamiento de los centriolos, la polimerización de actina sí es necesaria para la correcta polarización distal. En base a estos resultados, decidimos investigar más detalladamente la distribución distal de los centriolos en las células defectivas para los PPE que generaron fenotipos robustos de quetas múltiples de actina. Para ello, desarrollamos un nuevo método cuantitativo de análisis de la distribución de centriolos que permitía estudiar el posicionamiento de estos orgánulos con mayor nivel de detalle, acercándose más a la distribución real que ocurre en las células de *Drosophila*.

Este nuevo método de cuantificación, que denominamos sistema RCPD, del inglés **Representative Polarized Centriole Distribution**, está basado en el desarrollo de una librería de imágenes de células con centriolos bien posicionados (*WT*, 28,5h APF), generando así un mapa de densidad de posiciones únicas de centriolos acumulados sobre una célula modelizada, que representa la distribución *wild type* de los centriolos en las células epiteliales del ala de *Drosophila* (Figura RI.9 a-d). Este mapa de densidad puede ser segmentado utilizando líneas imaginarias concéntricas, a lo largo de las cuales la probabilidad de encontrar un centriolo es la misma, a las que denominamos isolíneas (Figura RI.9 e-g). Estas isolíneas encierran en su interior una determinada probabilidad de encontrar centriolos que puede ser comparada entre distintas condiciones experimentales. Como vemos en el panel f de la figura RI.9, a medida que la isolínea encierra un área menor (isolíneas 1-7), la probabilidad de encontrar un centriolo disminuye de forma lineal. De esta forma, para un número determinado de células

estudiadas, la distribución de centriolos cubierta por cada isolínea puede confrontarse con la librería *wild type*, obteniendo así un ratio observado/esperado, ($R_{0,05}$) que será próximo a 1 en el caso de células con los centriolos polarizados, y menor que 1 si los centriolos no se encuentran polarizados correctamente. En el panel g de la figura RI.9 se muestra un ejemplo del incremento de la significancia a media que aumenta el número de células analizadas. Además, generamos también otra librería de imágenes para desarrollar un sistema de cuantificación equivalente en las células *WT* que aún no habían desarrollado las quetas de actina (25h APF), con el fin de discernir entre distribuciones aleatorias de los centriolos o bloqueos de la migración de éstos en la zona central de la célula, sistema al que denominamos RNCD (*Representative Non-Polarized Centriole Distribution*) (Figura RI.9 h-j).

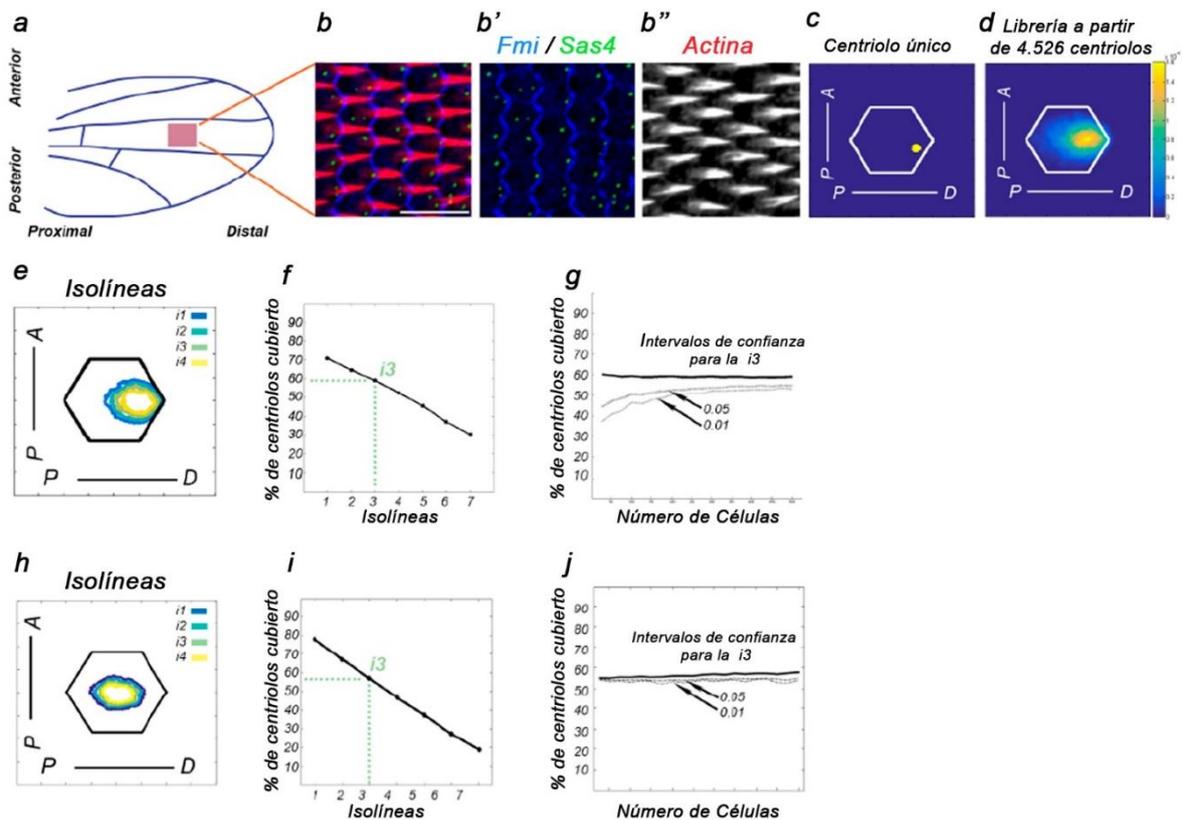


Figura RI.9: Sistema RPCD y RNCD para el análisis de la distribución de los centriolos. En los paneles a-b'' se esquematiza la primera etapa del desarrollo del sistema RPCD, el marcaje con Fmi (azul en b, b'), Sas4-GFP (verde en b, b') y actina (rojo en b, gris en b''). En el panel c se muestra el análisis del posicionamiento del centriolo en una célula única y en el panel d se observa el mapa de densidad de centriolos generado a partir de 4.526 células analizadas en pupas colectadas 28,5h APF. La distribución de los centriolos puede segmentarse en distintas isolíneas, en las que la probabilidad de encontrar un centriolo es la misma (e). En el panel f se muestra el porcentaje de centriolos cubierto por las distintas isolíneas en células *wild type*, y en el panel g un ejemplo del incremento de la significancia cuando se analiza un mayor número de células. El sistema RNCD fue desarrollado siguiendo la misma aproximación en células de pupas colectadas 25h APF (h-j). La barra de escala en el panel b representa 10µm.

Una vez desarrollado el sistema de cuantificación RPCD, decidimos comprobar su utilidad en distintas condiciones experimentales previamente analizadas, con el fin de valorar la correspondencia entre los modelos anteriormente descritos. En este sentido, comparamos la ratio obtenida de la distribución de los centriolos en las células de alas colectadas antes de la formación de las quetas de actina (25h APF) con la que se obtuvo de células completamente desarrolladas (28,5h APF). Añadimos además una condición, cuantificando por separado las células que a 25h presentaban incipientes quetas de actina (25h APF-Q).

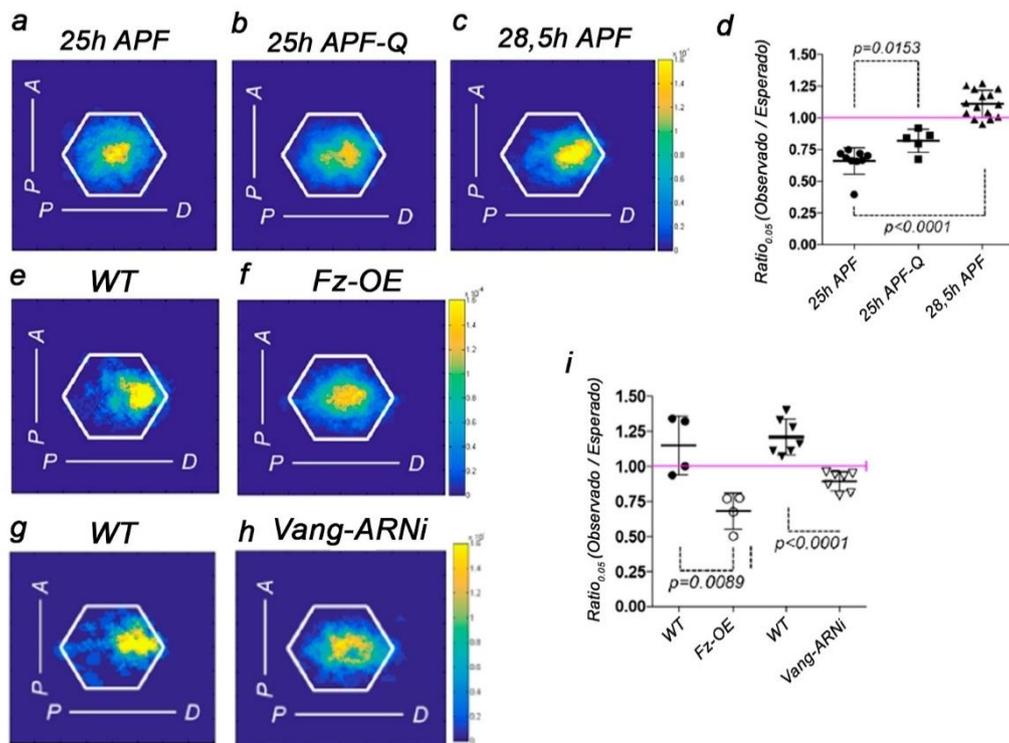


Figura RI.10: Validación del sistema de cuantificación RPCD. Se muestran los mapas de densidad de células del ala de pupas colectadas 25h APF sin quetas (a), con quetas incipientes (25h APF-Q, panel b), y 28,5h APF. En el panel d se muestra la cuantificación del ratio observado/esperado de alas en las condiciones anteriores. El panel f muestra el mapa de densidad de centriolos en células que sobreexpresan Fz, y el panel h en células defectivas para Vang, que se compararon con los de células silvestres (panel e, g). La cuantificación del ratio observado/esperado se representa en el panel i.

Como se muestra en la figura RI.10, cuando las pupas son colectadas 25h después de su formación, los centriolos aparecen centrados en la célula (panel a), y el ratio observado/esperado es inferior a 1 (panel d), mientras que en las células en las que las quetas de actina se han desarrollado por completo, 28,5h APF, los centriolos se polarizan distalmente, lo que podemos observar en el mapa de densidad del panel c y la cuantificación del ratio, cercano a 1 (Figura RI.10 d). En las células de las pupas

colectadas 25h APF que presentaban quetas de actina incipientes, los centriolos se sitúan en una posición intermedia (Figura RI.10 b, d). Los resultados obtenidos empleando nuestro método mostraron que la aparición de las quetas en células *WT* va acompañada de una clara migración de los centriolos desde el centro hacia la región distal de las células, lo que se corresponde con un incremento en la ratio observado/esperado.

Además de estudiar la distribución de los centriolos en la dinámica de la formación de las quetas de actina, decidimos validar el método en células que presentaban alteraciones en la expresión de miembros de la ruta de PCP que demostraron generar un fenotipo de pérdida de la orientación de las quetas. Para ello, analizamos el posicionamiento de los centriolos en células que sobreexpresaban *Frizzled* (*Fz-OE*), que se muestran en el panel f de la figura RI.10, y con ARN de interferencia para *Vang*-ARNi (Figura RI.10 h). Los resultados de este nuevo análisis, representados en el panel i de la figura RI.10 muestran un claro descenso del ratio observado/esperado cuando se comparan con el de las células silvestres, y se corresponden con las cuantificaciones obtenidas previamente en nuestro laboratorio, mostrando una alteración en la polarización de los centriolos cuando se modifican los niveles de expresión de miembros de la ruta de PCP.

Las células con defectos de PPE no presentan alteraciones en la polaridad de los centriolos utilizando RCPD

Tras comprobar la utilidad del sistema RCPD para estudiar la polaridad de los centriolos tanto en el desarrollo de las células del ala como en condiciones de alteración de proteínas de PCP, decidimos utilizarlo en las líneas de ARNi para los PPE que presentaron fenotipos robustos de quetas múltiples. Empleamos las líneas de *Fritz* (103611/KK), *Mwh* (41514/GD), y *Drok* (3793/GD (1) y 104675/KK (2)) (Figura RI.11).

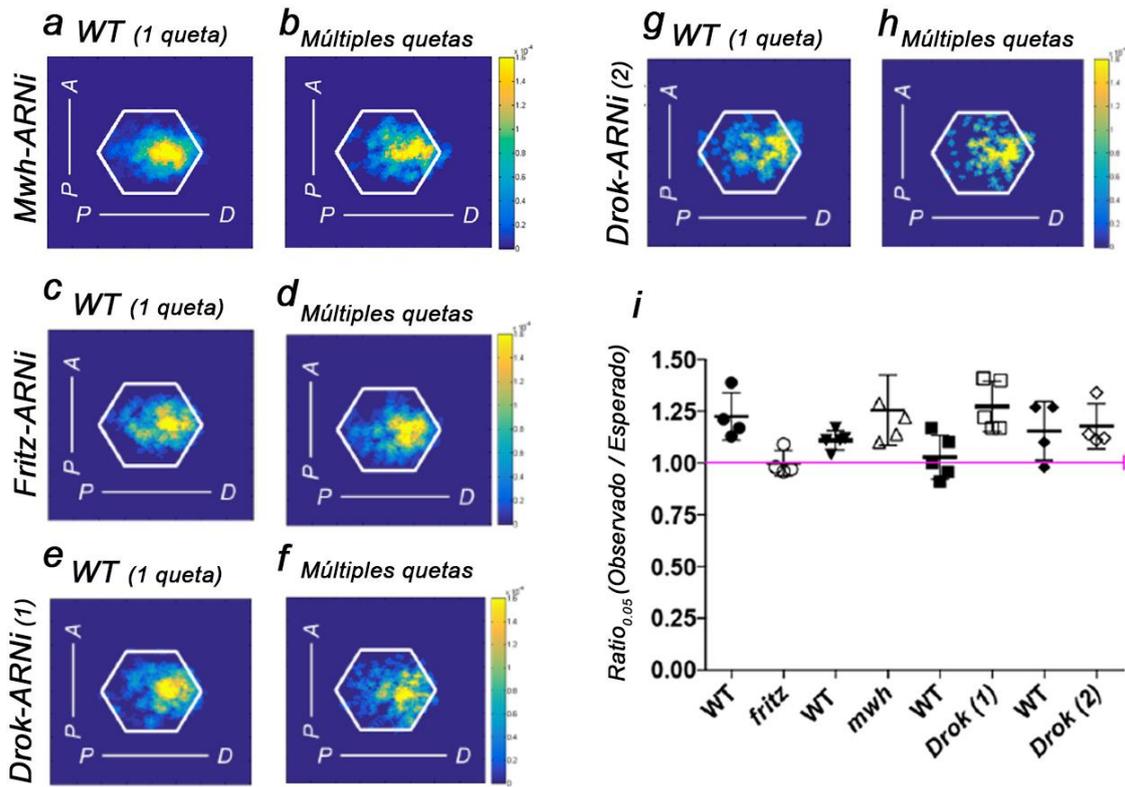


Figura RI.11: Análisis de la distribución de los centriolos mediante el método RPCD. Se muestran los mapas de densidad de células del dominio Dpp con una queta (paneles a, c, e y g) y con quetas múltiples (paneles b, d, f y g). Los PPE analizados fueron Mwh (a, b), Fritz (c, d), Drok (1) (e, f) y Drok (2) (g, h). En el panel i se muestran las cuantificaciones de los ratios observado/esperado en estas condiciones.

En este caso, la librería *WT* de centriolos se comparó con la distribución encontrada en las células del dominio Dpp que presentaban una única queta de actina o más de una. En la figura RI.11 se muestran los mapas de densidad de centriolos en las células con una única queta de actina (paneles a, c, e y g) y los de aquellas que presentaban quetas múltiples (paneles b, d, f y h). Empleando el sistema de cuantificación RPCD para analizar la distribución de los centriolos en ambos grupos de células, no se encontraron cambios en la polarización distal de estos orgánulos, siendo el ratio de centriolos observado/esperado superior a 1 en todos los casos, como se muestra en la gráfica del panel i de la figura RI.11. Como ocurre en las cuantificaciones utilizando el método Q, en el caso de Fritz observamos diferencia entre las células con una única queta y las células con quetas múltiples, que posiblemente se deba al retraso en la migración distal de los centriolos. (Figura RI.11 i). Los resultados obtenidos se correspondieron con los encontrados en las cuantificaciones con los métodos Q y ABP, y confirman que la alteración de los efectores de PCP que generan múltiples quetas de actina no afecta al posicionamiento distal de los centriolos.

El bloqueo de la polimerización de actina altera el posicionamiento de los centriolos empleando RPCD

Una vez aplicado el sistema RPCD a las células defectivas para los efectores de PCP, decidimos utilizar este método para analizar la distribución de los centriolos cuando bloqueamos la polimerización de actina con citocalasina D. En esta ocasión, la posibilidad de estudiar la polarización de los centriolos con mayor detalle nos permitió obtener resultados más ajustados sobre la alteración del posicionamiento de estos orgánulos y su relación con el citoesqueleto de actina.

Cuando aplicamos el sistema RPCD en nuestras condiciones de desarrollo de pupas *in vitro* tratadas con citocalasina D observamos diferencias notables en los mapas de densidad de centriolos al ser comparados con los obtenidos en el resto de las condiciones experimentales. Así, como se muestra en el panel b de la figura RI.12, la distribución de los centriolos en las células de pupas crecidas en presencia de citocalasina D aparece mucho más dispersa y no polarizada que en las muestras cultivadas en medio SSM3 sin citocalasina (Figura RI.12 a), y más aún que las alas envejecidas *in vivo* durante 28.5h. En el panel c de la figura RI.12 se muestra la cuantificación del ratio observado/esperado en estas condiciones experimentales, observándose un valor menor que 1 para las células de pupas con 25h de desarrollo y para las células tratadas con Citocalasina D, mientras que en las células de alas envejecidas durante 28,5h este ratio fue superior a 1, y las cultivadas *in vitro* en medio SSM3 presentaban un valor intermedio.

A diferencia del resultado obtenido para las células desarrolladas durante 25h, donde los centriolos se posicionan en el centro de la célula, en el tratamiento con Citocalasina D no encontramos zonas de las células con una mayor presencia de centriolos. Para profundizar más en este nuevo fenotipo, decidimos emplear el sistema RNCD, que utiliza una librería de posiciones de centriolos generada a partir de células no polarizadas (Figura RI.9 h-j), para determinar si el posicionamiento de los centriolos en estas condiciones es similar al de las células obtenidas a 25h APF, cuando se inicia el tratamiento con citocalasina. En esta ocasión, comparamos los mapas de densidad obtenidos en diferentes condiciones de alteración de la polaridad (25h APF, Fz-OE y Vang-ARNi) con los obtenidos en el tratamiento de citocalasina D. Utilizando el método

RNCD, si los centriolos se encuentran concentrados en el centro de la célula, el ratio observado/esperado será cercano a 1, mientras que si los centriolos están marcadamente polarizados, o su distribución es dispersa por todo el área celular, el ratio será menor que 1. Los resultados obtenidos, representados en el panel d de la figura RI.12 muestran que el ratio observado/esperado para las células tratadas con citocalasina D es significativamente menor que 1, y menor que el resto de las condiciones experimentales, lo que nos confirmó que el bloqueo de la polimerización de actina provoca una dispersión de los centriolos en el interior celular. Por último, realizamos tratamientos cortos (1h) con citocalasina D antes y después del desarrollo de las quetas, para comprobar si el posicionamiento restringido de los centriolos permanecía fijo o se veía alterado cuando se desorganiza el citoesqueleto de actina. Teniendo en cuenta los mapas de densidad de centriolos obtenidos (Figura RI.12 e, f), así como la cuantificación de los ratios observado/esperado (Figura RI.12 panel g), comprobamos que el bloqueo de la polimerización de actina provoca la dispersión de los centriolos en la célula, aunque éstos ya se hayan posicionado distalmente.

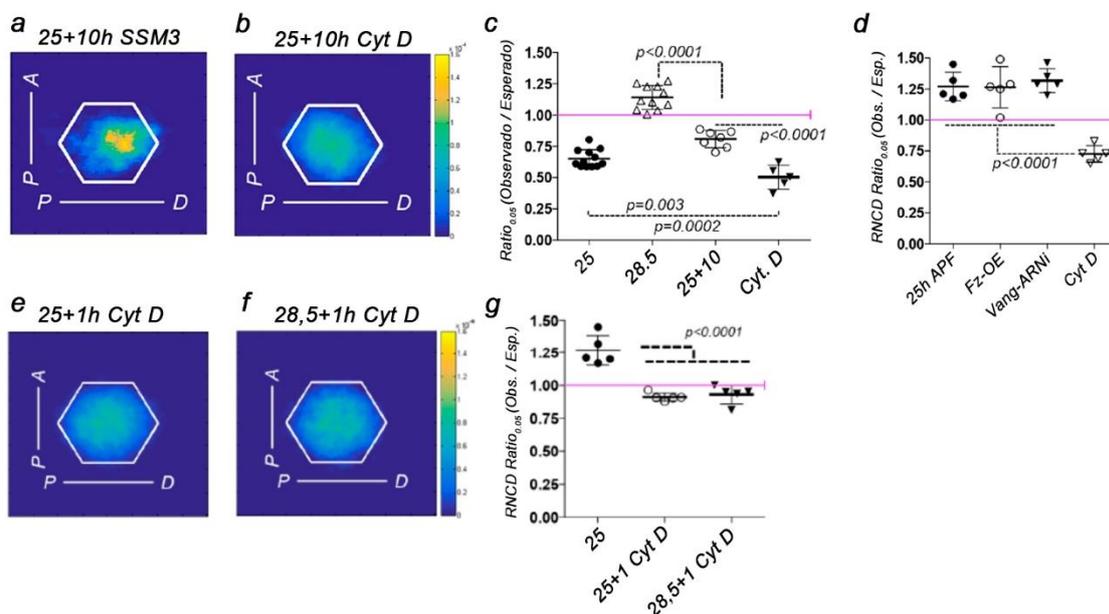


Figura RI.12: Análisis de la distribución de los centriolos en el tratamiento con Citocalasina D utilizando el método RPCD y RNCD. Se muestra el mapa de densidad de los centriolos en células de pupas colectadas 25h APF e incubadas 10h en medio SSM3 (a) y tratadas con citocalasina D (b). El panel c muestra la cuantificación del ratio observado/esperado empleando el sistema RPCD en células tras 25h y 28,5h de incubación, e incubadas *in vitro* en presencia o ausencia de citocalasina D. El panel d muestra la cuantificación del ratio utilizando el sistema RNCD para comparar la distribución centrada o dispersa en distintas condiciones experimentales. Se muestran también los mapas de densidad de centriolos en células tratadas con Cyt D durante 1h tras su recolección (e) o una vez formadas las quetas de actina (f). La cuantificación del ratio observado/esperado en estas condiciones se muestra en el panel g.

En su conjunto, los resultados obtenidos del análisis de la distribución de los centriolos utilizando los sistemas RPCD y RNCD mostraron que el citoesqueleto de actina es esencial para la polarización de los centriolos y su posicionamiento y migración a lo largo del desarrollo de las células epiteliales de *Drosophila*.

La distribución de los centriolos en células defectivas para miembros de la ruta de Fz-PCP no está asociada a la orientación de las quetas de actina

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, que ponen de manifiesto el papel esencial del citoesqueleto de actina en el posicionamiento de los centriolos, decidimos investigar si la polimerización de esta proteína es suficiente para la correcta distribución de los centriolos dentro de las células. Puesto que, tanto el posicionamiento de los centriolos como el núcleo de polimerización de las quetas de actina ocurre en la región distal de las células epiteliales, nos preguntamos si en condiciones de alteración en la polaridad celular, los centriolos seguían situándose en el núcleo de crecimiento de las quetas o si, por el contrario, la posición de ambas estructuras no se encontraba relacionada, hipótesis que se esquematiza en los paneles a y b de la figura RI.13. Para resolver esta pregunta, utilizamos dos líneas de *Drosophila* empleadas en experimentos anteriores: las que sobreexpresaban Frizzled (ganancia de función) y otra con ARN de interferencia para Vang (pérdida de función) que, como hemos visto anteriormente, generaron fenotipos en los cuales el desarrollo de las quetas no se veía afectado, pero sí su orientación. Utilizando estas líneas defectivas, decidimos analizar el nivel de correspondencia (que denominaremos coocurrencia) entre los centriolos y las quetas de actina, comparándolo con el obtenido de células silvestres.

El análisis se llevó a cabo mediante el desarrollo de un software de procesamiento de imágenes similar al que se utilizó para generar el sistema RPCD. Inicialmente, partiendo de imágenes obtenidas tras el triple marcaje de las estructuras analizadas (Fmi para los bordes celulares, actina para las quetas y Sas4 para los centriolos, figura RI.13 c-c'') se generó una máscara para marcar la base de las quetas de actina y los bordes celulares (Figura RI.13 d, e). Posteriormente, se utilizó un rectángulo de área definida (150x20 píxels) que se hizo rotar utilizando como eje el centroide de cada célula, como se esquematiza en los paneles f y g de la figura RI.13. Empleando nuestro software se superpusieron las imágenes de fluorescencia de Sas4 y

la máscara con la base de las quetas, además del rectángulo definido, y se comprobó, para cada célula analizada de una determinada condición, si el centriolo y la base de la queta de actina coincidían dentro del rectángulo en alguna de sus posiciones. En caso de coincidencia, a la célula analizada se le otorgó un valor de 1, mientras que, si el centriolo y la base del pelo de actina no coinciden dentro del rectángulo, el valor otorgado fue 0. Calculamos después la media de los valores obtenidos para un número n de células, coocurrencia que fue comparada entre muestras de cada condición, y se representa en el panel h de la figura RI.13.

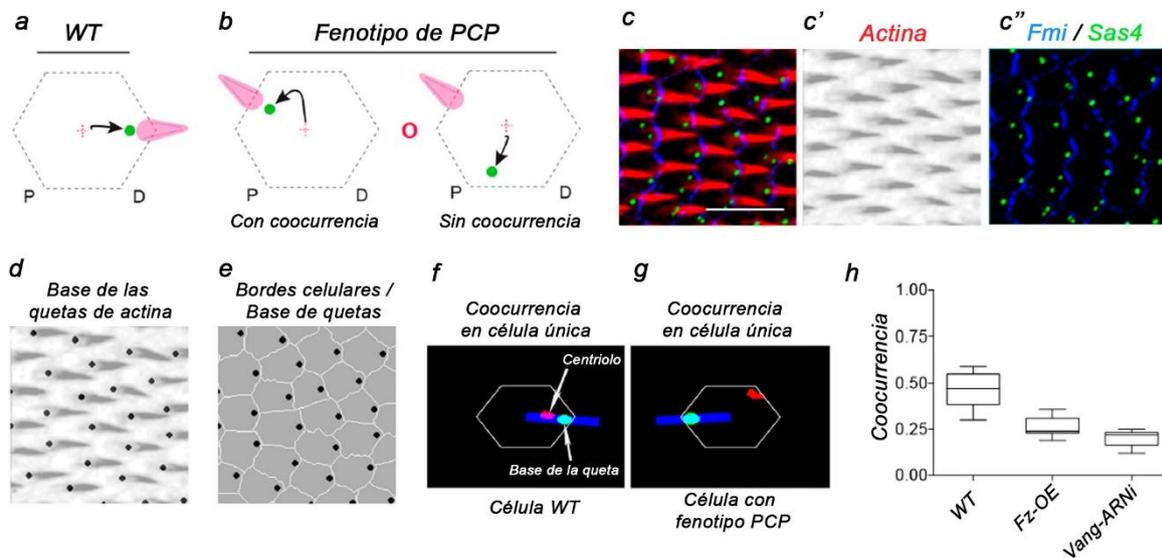


Figura RI.13: Análisis de la coocurrencia de los centriolos y las quetas de actina. Se esquematiza el proceso de migración distal de los centriolos en las células del ala de *Drosophila* (a). En el panel b se muestra un esquema de las hipótesis de migración de los centriolos conectados a la base de la queta de actina (izquierda) o desconectados de ella (derecha). Mediante el marcaje de Fmi (azul en c y c''), actina (rojo en c, gris en c') y Sas4-GFP (verde en c y c'') se generó una máscara para localizar la base de la queta de actina (d) y los bordes celulares (e). En el panel f se muestra un esquema de la coocurrencia encontrada entre la base de las quetas y los centriolos en células silvestres, mientras que en g se muestra el mismo esquema para células con fenotipo de PCP. La cuantificación de la coocurrencia se muestra en el panel h. La barra de escala en el panel c representa 10 μ m.

Tras analizar la coocurrencia en nuestras líneas defectivas para proteínas de la ruta de PCP (Fz-OE y Vang-ARNi), y compararlas con la de las células silvestres comprobamos que, en ambas condiciones, los centriolos pierden la capacidad de localizarse en la base de las quetas de actina, disminuyendo significativamente la correspondencia entre ambas estructuras (Figura RI.13 h). La coocurrencia media obtenida para las células silvestres fue del 46%, mientras que, para la línea Fz-OE y Vang-ARNi fue del 26% y del 20% respectivamente. Los resultados obtenidos indican que, en condiciones de ganancia o pérdida de función de miembros de la ruta de PCP, el centriolo no se sitúa en el núcleo de crecimiento de las quetas de actina. Estos datos,

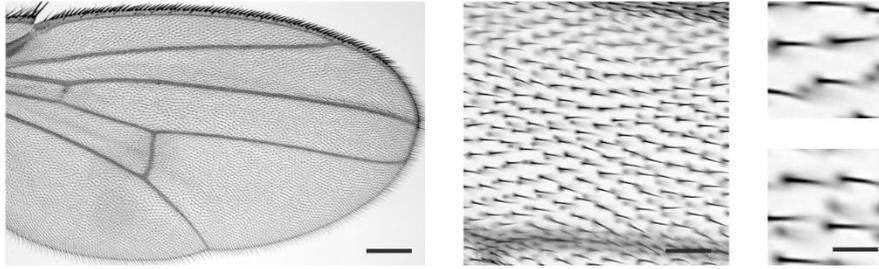
junto a los obtenidos en el tratamiento con citocalasina D, nos permiten concluir que el citoesqueleto de actina es necesario, pero no suficiente, para la correcta polarización distal de los centriolos en las células del ala de *Drosophila*.

La ruta de Polaridad Celular Planar Ft/Ds-PCP está implicada en la polaridad de los centriolos en *Drosophila*

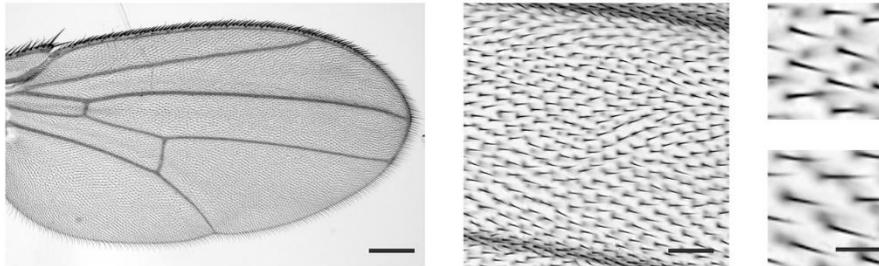
Como hemos abordado en la introducción, además de la ruta de Fz-PCP, la Polaridad Celular Planar está mediada por otra cascada de señalización, la conocida como ruta de Fat y Dachshous (Ft/Ds-PCP)¹⁰². En los últimos años varios estudios, incluidos los de nuestro laboratorio, han contribuido a esclarecer el papel de la ruta de Fz-PCP en el posicionamiento centriolos, sin embargo, poco se conoce sobre la función de la ruta de Ft/Ds-PCP en la adquisición de esta polaridad.

En base a esto, y teniendo en cuenta las herramientas de cuantificación desarrolladas en los experimentos previos para la ruta de Fz-PCP, decidimos comprobar si existía una conexión entre la ruta de Ft/Ds-PCP y el posicionamiento de los centriolos en las células de alas de *Drosophila*. Para ello, abordamos el estudio utilizando la misma aproximación que empleamos para los efectores de PCP, analizando el efecto del silenciamiento de distintas proteínas de la ruta Ft/Ds-PCP en el posicionamiento de los centriolos de *Drosophila*. Comenzamos comprobando el nivel de afectación fenotípica de las líneas comerciales de ARN de interferencia disponibles, utilizando también el sistema de expresión Gal4/UAS, para promover el silenciamiento dirigido de las secuencias de ARN de interferencia contra los miembros de la ruta de Ft/Ds-PCP. Al igual que en la ruta de Fz-PCP, los defectos en los niveles de expresión de las proteínas de la ruta Ft/Ds-PCP se manifiestan en alteraciones en la orientación de las quetas de actina. Para comprobar el fenotipo provocado por el silenciamiento de Ft/Ds-PCP, las líneas comerciales portadoras de ARN de interferencia fueron cruzadas con la línea Dpp-Gal4, y las alas de los individuos de la descendencia fueron observadas bajo el microscopio óptico. Los resultados de este análisis se muestran en la figura RI.14.

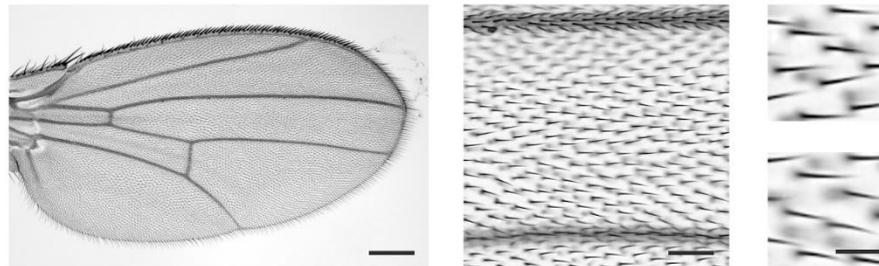
a *dpp> Dachs-IR (12555/GD) 29°C*



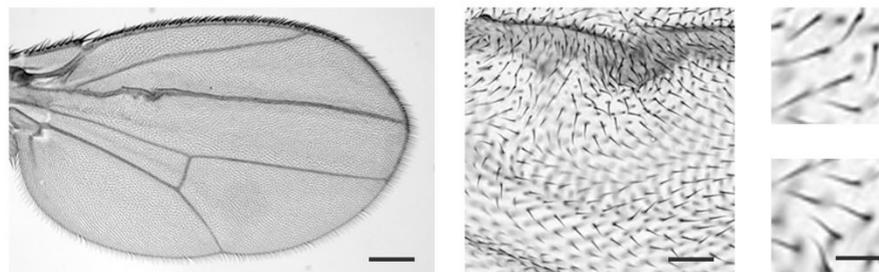
b *dpp> Dachs-IR (32142/GD) 29°C*



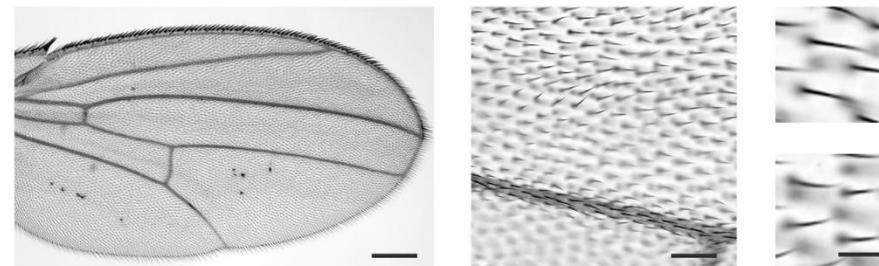
c *dpp> Ft-IR (108863/KK) 29°C*



d *dpp> Ft-IR (9396/GD) 29°C*



e *dpp> Fj-IR (6774/GD) 29°C*



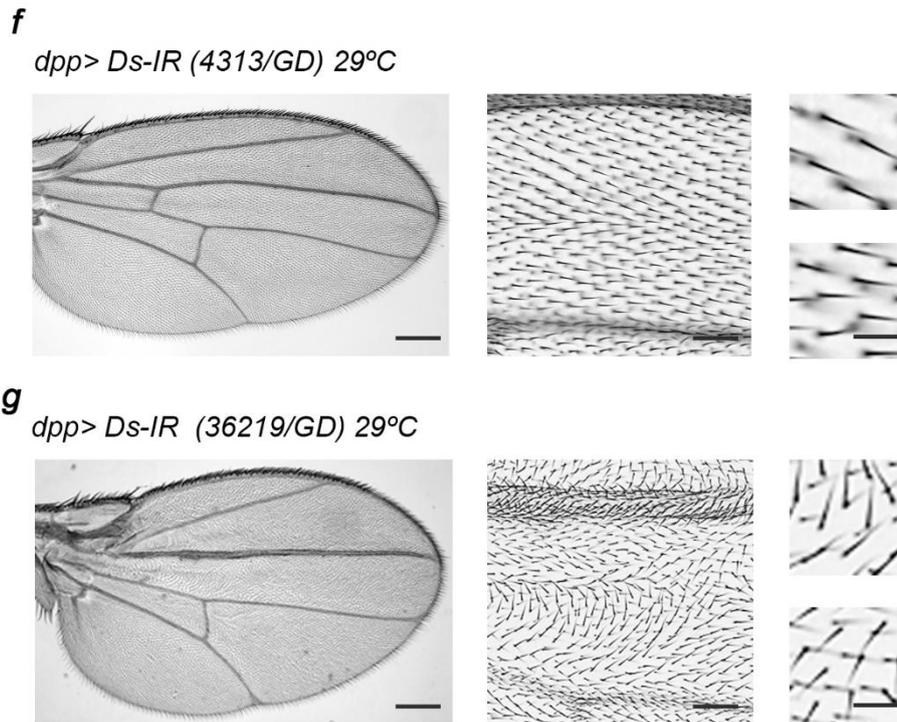


Figura RI.14: Análisis del fenotipo provocado por el silenciamiento de miembros de la ruta Ft/Ds-PCP en el dominio Dpp de alas de ejemplares adultos. En cada panel se muestra a la izquierda una imagen del aspecto general del ala (barra de escala 250 μ m), en la zona central, un detalle del dominio Dpp (barra de escala 20 μ m), y a la derecha un aumento mayor de las quetas de actina (barra de escala 4 μ m). Se utilizaron líneas con ARN de interferencia frente a Dachs (a, b), Fat (c, d), Fj (e) y Ds1 (f, g).

En la figura RI.14 se muestran los fenotipos obtenidos en la descendencia de los cruces con ARN frente a elementos de la ruta Ft/Ds-PCP. El silenciamiento de Dachs, para el que se utilizaron dos líneas de ARN de interferencia distintas no generó alteraciones en la polaridad celular ni defectos en el dominio Dpp, como se observa en las imágenes aumentadas de las quetas y en la imagen del ala respectivamente (Figura RI.14 a, b). En el caso del silenciamiento de Ft, tampoco encontramos fenotipo de PCP en una de las líneas utilizadas (Figura RI.14 c), mientras que la línea 9396/GD sí ocasionó una alteración evidente de la orientación de las quetas de actina, como podemos observar en las imágenes del panel d de la figura RI.14. Además, en la descendencia de este cruce también se observó la pérdida de la vena cruzada anterior en el dominio Dpp, como se muestra en la imagen del ala completa. El silenciamiento de la proteína Fj no provocó alteraciones de PCP (Figura RI.14). Los resultados para el silenciamiento de Ds (Figura RI.14 f, g) fueron similares a los obtenidos para Ft, obteniendo defectos en la polaridad en uno de los dos cruces ensayados, el que se muestra en el panel g. Podemos

observar en las imágenes de este panel la pérdida de la orientación distal de las quetas, además de la ausencia de la vena cruzada anterior.

En base a los resultados del análisis de fenotipos del experimento anterior, decidimos seleccionar las líneas de *Drosophila* con ARN de silenciamiento que provocaron fenotipos robustos de PCP (Fat 9396/GD y Dachous 36219/GD) para realizar los cruces entre éstas y la línea Sas4-GFP/Dpp-Gal4, con el fin de estudiar el posicionamiento de los centriolos. Tras incubar las pupas durante 28,5h a 29°C, diseccionamos las alas y realizamos los marcajes de las estructuras de interés (Fmi para delimitar los bordes celulares y actina para detectar la alteración en la polaridad de las quetas). Posteriormente se adquirieron imágenes de microscopía confocal (Figura RI.15 a-d), y se realizaron las cuantificaciones siguiendo los métodos anteriormente descritos.

En la figura RI.15 a-a'' se muestran los marcajes de las estructuras celulares para la cuantificación en los cruces con ARN de interferencia para Ft, en los que se observa la alteración de la distribución de las quetas de actina en secciones del dominio Dpp. Además, en el panel b se muestra un detalle del marcaje de los centriolos (Sas4-GFP) y Fmi en estas células. Para el silenciamiento de Ds se muestran también los marcajes realizados, y podemos observar el fenotipo de PCP provocado (Figura RI.15 c-c''), y el detalle de la posición de los centriolos en el interior celular (Figura R15 d).

Los resultados procedentes de las cuantificaciones, que se muestran en los paneles e (método ABP) y f (método Q) mostraron que, en las células con alteraciones de PCP producidas por el silenciamiento de las proteínas Ft y Ds, el posicionamiento de los centriolos se encontraba significativamente alterado cuando se comparó con las células no afectadas por el ARN de interferencia, fuera del dominio Dpp. Estos resultados fueron obtenidos empleando ambos métodos de cuantificación. Además, los mapas de densidad de centriolos generados a partir de las imágenes de microscopía que se muestran en los paneles g y h de la figura RI.15 revelan que en condiciones de *knock Down*, los centriolos aparecen mucho más cerca del centroide de la célula, y no consiguen posicionarse distalmente. Estos resultados nos permiten concluir que la

polaridad de los centriolos en las células de *Drosophila* está también mediada por la ruta de Ft/Ds-PCP.

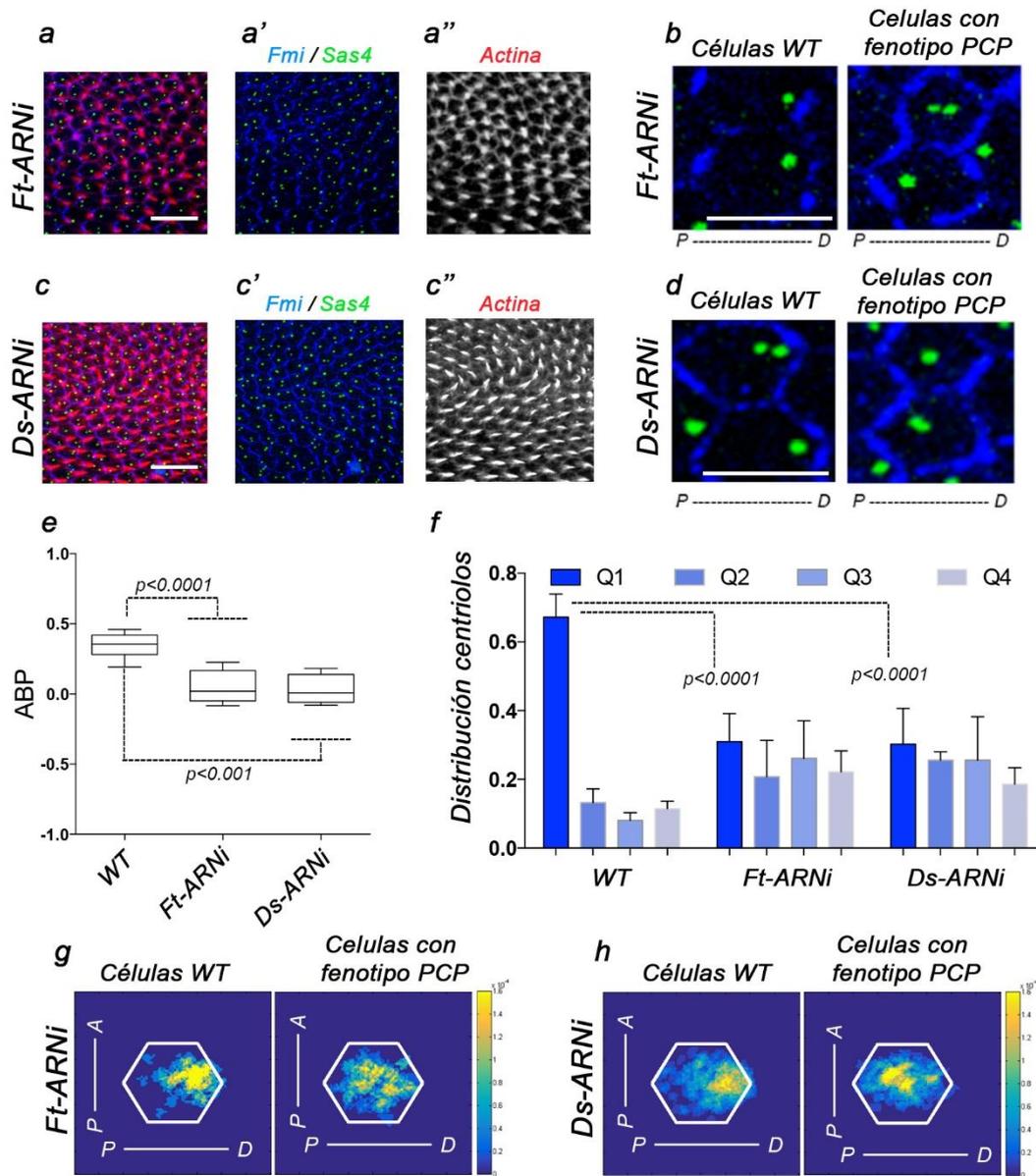


Figura RI.15: Análisis de la distribución de los centriolos en células defectivas para las proteínas de la ruta de Ft/Ds-PCP. Se muestran imágenes de microscopía confocal del marcaje de Fmi (azul en a-d), Sas4-GFP (verde en a-d) y actina (rojo en a, c, gris en a'', c''). En los paneles b y d se muestra un detalle de Fmi y la posición de los centriolos en células silvestres y defectivas para Ft (b) y Ds (d). La cuantificación siguiendo el método ABP (e) y el método Q (f) reveló diferencias significativas entre las células con fenotipos de PCP y las células silvestres. Los paneles g y h muestran la comparativa de los mapas de distribución de centriolos en las condiciones experimentales ensayadas. La barra de escala representa 10 μ m en a, c y 4 μ m en b, d.

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos detallados en este capítulo nos han permitido definir distintos mecanismos en la polarización de los centriolos, que se esquematizan en la figura RI.16: 1) las células defectivas para los efectores de PCP presentan un retraso en la adquisición de la polaridad distal, sin embargo, el

posicionamiento final de los centriolos no se ve alterado, como se muestra en el esquema del panel a' de la figura RI.16. 2) la polimerización del citoesqueleto de actina es imprescindible tanto para la adquisición de la polaridad de los centriolos como para mantener estos orgánulos en una posición restringida dentro de la célula (Figura RI.16 a'') y 3) las células defectivas para los elementos tanto de Fz-PCP como de Ft/Ds-PCP no consiguen orientar correctamente sus centriolos, quedando éstos en una posición centrada en las células epiteliales del ala de *Drosophila*, como se refleja en el esquema del panel b la figura RI.16.

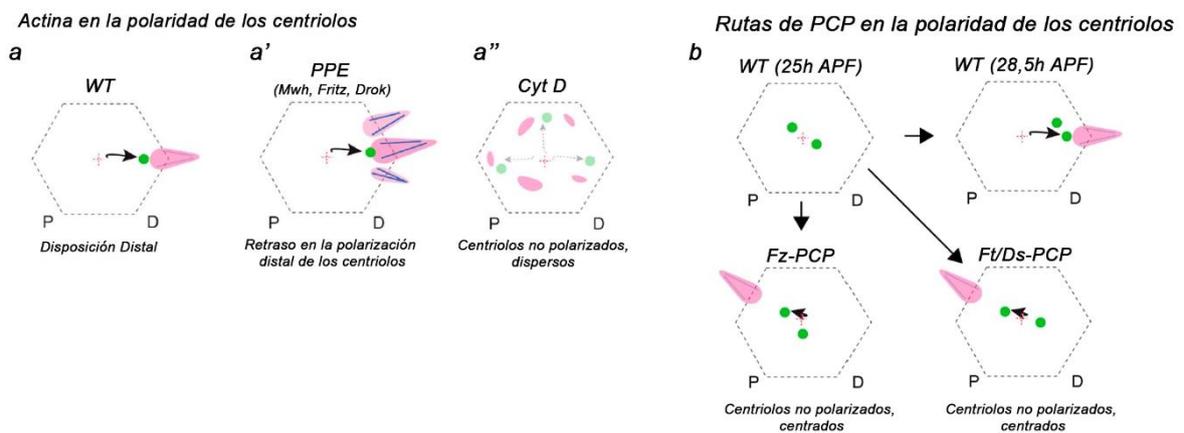


Figura RI.16: Esquema de los mecanismos de posicionamiento de centriolos propuestos en este trabajo. Se muestra la migración distal de los centriolos en las células silvestres (a) y en las células defectivas para los PPE que generan quetas de actina múltiples (a'). El tratamiento con Citocalasina D, en cambio, provoca una dispersión de los centriolos en el interior celular (a''). En el panel b se muestra la alteración en la migración orientada de los centriolos en las células defectivas para las rutas de Fz-PCP y Ft/Ds-PCP.

DISCUSIÓN CAPÍTULO I

DISCUSIÓN CAPÍTULO I

Durante el desarrollo de los organismos pluricelulares, el posicionamiento de las células y estructuras subcelulares que permiten la funcionalidad de tejidos y órganos no ocurre de forma aleatoria. En este sentido, la distribución de los centriolos y los cuerpos basales de los cilios dentro de las células no es una excepción. En los últimos años se ha profundizado acerca de los mecanismos moleculares que gobiernan el posicionamiento de estas estructuras, poniéndose de manifiesto la importancia de las rutas de señalización que controlan la dinámica del citoesqueleto, y aquellas que proporcionan información posicional a las células durante el desarrollo, como las rutas de polaridad celular apical-basolateral y la polaridad celular planar¹⁰³⁻¹⁰⁵. Más concretamente, estudios recientes han demostrado la importancia de proteínas de la ruta de polaridad celular planar (PCP) en el posicionamiento de los cuerpos basales en las células multiciliadas de diversos tejidos de vertebrados, y alteraciones en estas cascadas de señalización provocan graves defectos en el desarrollo^{99, 106}.

La Polaridad Celular Planar se define como el alineamiento colectivo de las células y componentes subcelulares a lo largo de un tejido plano, siguiendo el eje proximal-distal. Esta coordinación celular permite el correcto posicionamiento de orgánulos, células y tejidos, y es esencial para una morfogénesis adecuada, lo que se refleja en el alto grado de conservación evolutiva de los componentes de la ruta de PCP. Tanto en el interior celular como entre células vecinas, la Polaridad Celular Planar se concreta a través del establecimiento de dominios funcionales distintos en la membrana plasmática, y pueden englobarse en dos vías de señalización que actúan de forma simultánea, la ruta de Fz-PCP y la ruta de Ft-PCP. Los estudios acumulados en los últimos años han arrojado luz acerca del establecimiento de estas vías de señalización, identificándose en la ruta de Fz-PCP un dominio proximal constituido por las proteínas Van Gogh y Prickle, y otro distal, formado por Frizzled, Dishevelled y Diego. En la ruta de Ft-PCP, la protocadherina Fat se sitúa en la región distal, y Dachsous en la cara proximal. Estas proteínas abarcan el núcleo de señalización de PCP, mayoritariamente estudiado en *Drosophila*, aunque se han identificado ortólogos para la mayoría de ellas en vertebrados.

En base a los diversos trabajos que han relacionado las rutas de PCP con el posicionamiento de los cuerpos basales de los cilios en vertebrados, estudios previos realizados en nuestro laboratorio utilizando como modelo de estudio el epitelio del ala de *Drosophila* demostraron que este posicionamiento también es dependiente de la ruta de Fz-PCP¹⁰⁰. Además, en el mismo trabajo describieron la dinámica de la polarización de los centriolos a lo largo del desarrollo del epitelio, revelando una migración distal que se veía alterada en individuos mutantes para la proteína Fz. Este hallazgo puso de manifiesto que la polarización de los centriolos es un proceso muy conservado evolutivamente, unificando así los modelos de polaridad de cuerpos basales y centriolos bajo la regulación de la ruta Fz-PCP, desde las células multiciliadas de vertebrados hasta las células sin cilios en epitelios de *Drosophila*. Estas células del epitelio del ala presentan una estructura de actina en forma de pelo, también denominada queta, que se localiza en la región distal de cada célula, y cuya formación se encuentra regulada por proteínas que modulan la polimerización de actina¹⁰⁷. La alteración en los niveles de expresión de estas proteínas provoca tanto la formación de múltiples quetas de actina en cada célula como el desarrollo ectópico de las mismas. Con relación a esto, otro hallazgo de relevancia obtenido en nuestro laboratorio fue la aparente pérdida de polaridad de los centriolos en las células defectivas para una de estas proteínas, denominada Mwh, lo que parece reflejar una regulación del citoesqueleto de actina en el posicionamiento de los centriolos.

Los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio se correspondían con los trabajos publicados en los que relacionan otras proteínas reguladoras del citoesqueleto de actina como Inturned o Fuzzy con el posicionamiento de los cuerpos basales de los cilios en la membrana apical de las células de vertebrados¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Estas dos proteínas, junto con Fritz, forman parte de la familia conocida como efectores de PCP (*Planar Polarity Effectors*, PPE). Además, su relación con la ciliogénesis en vertebrados los engloba en el complejo CPLANE (del inglés *Ciliogenesis and Planar Polarity Effector*) y pese a que fueron inicialmente descritos en *Drosophila*, su función en el posicionamiento de los centriolos en células no ciliadas aún no ha sido detallada. Además, se ha demostrado que proteínas GTPasas de la familia de Rho como Rac1, Cdc42 o Rho se encuentran también bajo la regulación de la ruta de Fz-PCP, y

alteraciones en la expresión de dichas proteínas provocan fenotipos similares a los descritos para los PPE en las quetas de actina^{101, 111}.

En base a estos hallazgos y a los datos previos de nuestro laboratorio, en este trabajo nos propusimos profundizar en la relación de la ruta de PCP y el posicionamiento de los centriolos, para lo que abordamos el estudio de los PPE y las proteínas de la familia de Rho en dicho proceso mediante el silenciamiento por ARN de interferencia utilizando el sistema Gal4/UAS, desarrollando además un método de cuantificación del posicionamiento de los centriolos robusto y novedoso.

El estudio del papel de los PPE y GTPasas de Rho en el posicionamiento de los centriolos fue llevado a cabo en dos etapas, una comprobación inicial de la presencia de fenotipos de quetas múltiples y posteriormente los marcajes de inmunofluorescencia para la cuantificación de la distribución. Una vez seleccionadas las líneas de *Drosophila* que provocaron fenotipos robustos, la polaridad de los centriolos fue medida utilizando dos sistemas distintos previamente empleados en nuestro laboratorio. Ambas cuantificaciones reflejaron que, en las células defectivas para Drok y Mwh que presentaban fenotipos de quetas múltiples, la polarización distal de los centriolos no se vio alterada. El análisis de las células con secuencias de ARN de interferencia para Fritz reflejó que la migración distal de los centriolos se daba con un ligero retraso cuando se comparaba con las células silvestres, sin embargo, el posicionamiento final de los centriolos no se encontraba afectado. Este retraso de la migración de los centriolos en las células afectadas por el silenciamiento de Fritz podría explicar el efecto encontrado previamente en nuestro laboratorio para las células defectivas para Mwh.

El análisis detallado del papel de los efectores de PCP utilizando como modelo de estudio células no ciliadas del epitelio del ala de *Drosophila*, en cambio, contradice la relación descrita en las células multiciliadas de vertebrados. Como hemos mencionado anteriormente, los miembros del complejo CPLANE como Fritz o Fuzzy son necesarios para un correcto posicionamiento de los cuerpos basales en las células multiciliadas^{108, 110}, sin embargo, los datos obtenidos en nuestros experimentos indican que esta función no se encuentra conservada en la polarización de los centriolos de células no ciliadas de *Drosophila*.

A pesar de no observar alteraciones en la polaridad de los centriolos en las células con fenotipo de quetas múltiples provocado por el silenciamiento de PPE y proteínas implicadas en la regulación de actina, diversos estudios han relacionado el proceso de polarización del citoesqueleto de actina con la migración de los cuerpos basales^{112, 113}. En este sentido, las células defectivas para la GTPasa Cdc42 muestran en *Drosophila* una pérdida completa de las quetas de actina, reflejando defectos en la polimerización de este elemento del citoesqueleto¹¹¹, sin embargo, este fenotipo no pudo ser reproducido utilizando las líneas de moscas comerciales con ARN de interferencia para Cdc42 en nuestro laboratorio. Debido a ello, decidimos abordar el estudio de la polarización de actina en el posicionamiento de los centriolos desde un enfoque farmacológico, utilizando la toxina fúngica Citocalasina D, que inhibe la adición de subunidades de actina a los filamentos, desestructurando el citoesqueleto de forma similar a la descrita para los mutantes de Cdc42.

El tratamiento con Citocalasina D conllevó la puesta a punto del cultivo *in vitro* de pupas en nuestro laboratorio, y los resultados obtenidos del análisis de la polaridad reflejaron que la inhibición de la polimerización de actina afecta significativamente al posicionamiento distal de los centriolos. Estos hallazgos estarían de acuerdo con los estudios publicados en vertebrados, en los que las alteraciones en el citoesqueleto de actina provocan defectos en el posicionamiento de los centrosomas y cuerpos basales^{114, 115}. En este sentido, nuestros resultados confirman que el citoesqueleto de actina es esencial en la migración de centriolos y cuerpos basales, proceso que estaría conservado tanto en *Drosophila* como en vertebrados.

Los resultados obtenidos en los experimentos de silenciamiento de PPE y GTPasas del citoesqueleto de actina contrastan con los datos de la inhibición farmacológica con Citocalasina D, en los que sí observamos una alteración en la polaridad de los centriolos. Para comprobar si, pese a existir una distribución distal de estos orgánulos, ésta se encontraba alterada en las células defectivas para las dianas analizadas, decidimos mejorar el sistema de cuantificación, desarrollando un nuevo método que denominamos RPCD, del inglés *Representative Polarized Centriole Distribution* y que se detalla en el apartado de resultados. A diferencia del método Q y ABP, que sirven para medir el ángulo o la distancia respecto al centroide de la célula,

este sistema presenta la ventaja de que analiza la distribución de una determinada población de centriolos en dos dimensiones, enfrentándola a la distribución de una población de centriolos *wild type*, lo que permite calcular un ratio observado/esperado muy útil a la hora de comparar distintas condiciones experimentales.

Utilizando el método RPCD, decidimos comprobar la dinámica de polarización de los centriolos durante el desarrollo del epitelio del ala descrita previamente en nuestro laboratorio, además de la distribución de los centriolos en células defectivas para miembros de la ruta Fz-PCP. Tanto la dinámica de polarización distal a lo largo del desarrollo como la alteración de la distribución de los centriolos en las células con ARN de interferencia para Fz y Vang se correspondieron con los resultados publicados previamente por nuestro laboratorio¹⁰⁰. En el caso de las células defectivas para Mwh, Fritz y Drok, la cuantificación con el método RPCD coincidió con la de los métodos Q y ABP, no encontrando diferencias significativas al ser comparadas con las células *wild type*. Por último, la cuantificación empleando el método RPCD en los tratamientos con Citocalasina D reveló que la inhibición de la polimerización de actina afecta a la distribución de los centriolos de forma distinta a la provocada por alteraciones en PCP, generando una dispersión muy acusada de los centriolos, y poniendo de manifiesto el papel del citoesqueleto de actina no sólo en la migración de los centriolos, sino también en el mantenimiento de una posición restringida durante la interfase. Además, teniendo en cuenta la distribución de los centriolos en la base de las quetas descrita previamente en nuestro laboratorio, decidimos comprobar si la polimerización de actina es suficiente para orientar a los centriolos en esta posición, aún en condiciones de alteraciones en Fz-PCP. En este sentido, el análisis de coocurrencia nos reveló que la distribución de los centriolos no está ligada a la base de las quetas, descartando la idea de que el centriolo pudiera servir como una estructura homóloga al cuerpo basal de las células de vertebrados.

Como hemos abordado en varias ocasiones en este capítulo, la ruta de Fz-PCP se ha relacionado con el posicionamiento de centriolos y cuerpos basales en vertebrados, regulación que, como hemos demostrado, se encuentra conservada en las células no ciliadas de *Drosophila*. La polaridad celular planar está también regulada por la cascada de señalización Ft/Ds-PCP, cuyo papel en el posicionamiento de los centriolos o cuerpos

basales, sin embargo, apenas había sido abordada. Hasta el momento, en vertebrados se han descrito cuatro isoformas de la proteína Fat (Fat 1-4), y dos de Ds (Ds1 y Ds2), y se ha demostrado que ratones defectivos para una de estas isoformas, Fat 4, presentan fallos en el desarrollo de los túbulos renales^{52, 82}. Este fenotipo está relacionado con alteraciones en la división orientada de las células provocadas por fallos en la segregación de los centriolos. Además, los ratones *knock-out* para *Dchs1*, otra proteína de la ruta de Ft-PCP presentan también defectos en la morfogénesis de los riñones⁸³. Todos estos hallazgos ponen de manifiesto el papel de Ft-PCP en la división orientada de las células, pero no en la regulación del posicionamiento de los centriolos de células en interfase. Los experimentos llevados a cabo en este trabajo confirmaron que, las alteraciones en los niveles de expresión de miembros de esta ruta de señalización provocaron alteraciones en la distribución de los centriolos, poniendo de manifiesto la labor compartida de los dos sistemas de polaridad celular planar descritos hasta el momento en la regulación de la polarización de los centriolos.

En base a los resultados obtenidos en este capítulo, postulamos un modelo basado en la existencia de, al menos, dos mecanismos distintos que modulan la distribución de los centriolos en las células epiteliales de *Drosophila* y que se dan de forma simultánea. Por un lado, tendríamos un mecanismo general regulado por la polimerización de actina e independiente de PCP, que mantendría a los centriolos posicionados en un área restringida de las células; mientras que, por otro lado, las rutas de señalización de polaridad celular planar Fz-PCP y Ft-PCP gobernarían la migración de los centriolos hacia su posición distal.

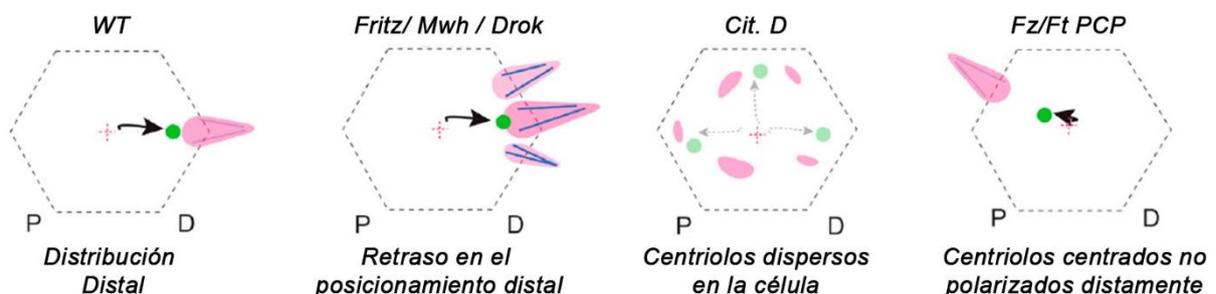


Figura DI.1: Representación esquemática de los fenotipos de distribución de los centriolos obtenidos en los distintos experimentos llevados a cabo en este capítulo.

CONCLUSIONES CAPÍTULO I

CONCLUSIONES CAPÍTULO I

- 1.** Los defectos en las proteínas efectoras de Polaridad Celular Planar que causan fenotipos de quetas múltiples no afectan a la polarización distal de los centriolos en *Drosophila*.
- 2.** La polimerización del citoesqueleto de actina es imprescindible para mantener la posición de los centriolos en un área restringida de las células.
- 3.** En células con defectos en el núcleo de señalización de Fz-PCP, la polimerización de actina no es suficiente para el promover el correcto posicionamiento de los centriolos.
- 4.** La polarización distal de los centriolos está modulada por la ruta de Ft/Ds PCP.

INTRODUCCIÓN CAPÍTULO II

INTRODUCCIÓN CAPÍTULO II

En el sistema respiratorio de vertebrados, el epitelio pseudoestratificado que tapiza las vías respiratorias cumple un papel esencial en la defensa frente a patógenos como virus y bacterias, así como frente a partículas inhaladas, polución o humo. A lo largo de la evolución, los organismos se han adaptado a estos retos mediante un sistema respiratorio complejo, en el que están presentes multitud de tipos celulares, entre los que se encuentran las células secretoras, las células multiciliadas o las células basales. En este sentido, para el mantenimiento de la homeostasis de las vías respiratorias es imprescindible que el proceso de autorrenovación y diferenciación de células basales en células secretoras o multiciliadas ocurra de forma correcta, estableciéndose un estrecho control en el balance entre los distintos tipos celulares en el epitelio. Un desequilibrio en la abundancia de alguno de estos tipos celulares se observa en una gran variedad de enfermedades de las vías respiratorias como el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), o la fibrosis quística. A pesar de este papel esencial, aún son muchos los interrogantes acerca de las rutas moleculares que gobiernan la proliferación y el destino de las células basales durante el desarrollo y la regeneración de las vías respiratorias. En este capítulo trataremos de resolver algunos de estos interrogantes, poniendo especial interés en los factores de transcripción e interactores implicados en el proceso de diferenciación de células basales a células multiciliadas.

Desarrollo y configuración del epitelio respiratorio

A lo largo de los últimos años se han producido avances considerables en el conocimiento acerca del desarrollo del sistema respiratorio, así como de la generación de los distintos tipos celulares que lo componen. El epitelio que recubre las vías respiratorias procede del endodermo, una capa embrionaria que genera multitud de órganos, entre los que se encuentran el esófago el hígado o el tiroides. El programa de desarrollo pulmonar comienza con la expresión del factor de transcripción Nkx2.1, que dirige la formación de una evaginación en la cual la expresión de esta proteína se enriquece distalmente y que tras múltiples ramificaciones sucesivas da lugar a los bronquios y pulmones¹¹⁶. Varios estudios han demostrado que la señalización por Wnt/ β -catenina juega un papel esencial en la diferenciación de los progenitores del sistema respiratorio, proceso en el que también está implicada la ruta de Bmp (*Bone*

morphogenetic proteins)¹¹⁷. Estas dos rutas modulan la especificación de las regiones que darán lugar a la tráquea, situada en la zona proximal, y a los bronquios y alveolos, situados en la región distal, donde actúan reprimiendo la expresión del factor de transcripción Sox2. Durante el desarrollo del sistema respiratorio se establecerán distintos linajes celulares en función de la posición en el eje anterior-posterior, proceso regulado por Sox2, marcador del endodermo proximal, y los reguladores transcripcionales Sox9 e ID2, enriquecidos en la región distal y que median el desarrollo de los bronquios y bronquiolos (Figura 13).

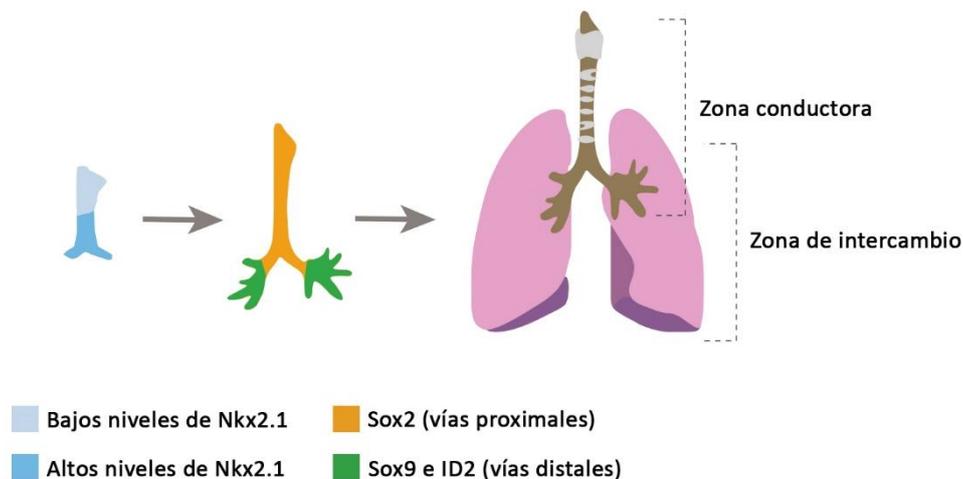


Figura 13: Esquema del desarrollo de las vías respiratorias.

Esta regionalización divide al sistema respiratorio de vertebrados en dos zonas diferenciadas, esquematizadas en la figura 13. Por un lado, en la región más proximal se encuentra la zona conductora, que incluye los orificios nasales, senos paranasales, la laringe y la tráquea. Esta zona es la encargada de transportar el aire hacia los pulmones, donde tendrá lugar el intercambio gaseoso, además de filtrar partículas y patógenos en suspensión, y calentar y humedecer el aire que llegará a los bronquiolos. A medida que avanzamos hacia la zona más distal, la tráquea se divide en dos bronquios que se ramifican en cientos de vías cada vez más pequeñas constituyendo así los bronquiolos, que tras más ramificaciones conectan con la zona de intercambio o respiratoria, los alveolos, donde tiene lugar el intercambio entre el oxígeno atmosférico y el dióxido de carbono del sistema circulatorio¹¹⁸.

Los tipos celulares que están presentes en cada una de las regiones del sistema respiratorio, así como la abundancia de cada uno de ellos, son distintos y cumplen funciones específicas en función de si nos encontramos en la zona conductora o en la respiratoria. En su conjunto, han sido identificados al menos 11 tipos celulares diferentes en el sistema respiratorio de vertebrados. La tráquea y los bronquios principales están tapizados por un epitelio pseudoestratificado en el que están presentes tres poblaciones mayoritarias de células: las células basales, que se encuentran más cercanas a la lámina basal y son progenitoras del resto de tipos celulares, imprescindibles en su recambio y en la respuesta a daño; las células secretoras, encargadas de secretar hacia el lumen de las vías respiratorias proteínas altamente glicosiladas que generan una capa mucosa cuya función es atrapar partículas en suspensión; y las células multiciliadas, encargadas de mover esta capa de moco hacia la zona proximal del sistema respiratorio para su eliminación. En la región de respiración, el intercambio gaseoso ocurre en los alveolos, pequeños sacos tapizados principalmente por dos tipos celulares, las células alveolares de tipo I (*Alveolar Epithelial Cell I*, AECI), que recubren aproximadamente el 95% de la superficie pulmonar, encargadas del intercambio de gases, y las de tipo II (AECII), cuya función es la secreción de las proteínas que componen el surfactante pulmonar, además de actuar como progenitoras de las AECI¹⁹. Los tipos celulares anteriormente descritos se esquematizan en la figura 14. En este trabajo nos centraremos en la composición celular de las vías espiratorias superiores, donde las células multiciliadas juegan un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis y la defensa frente a patógenos.

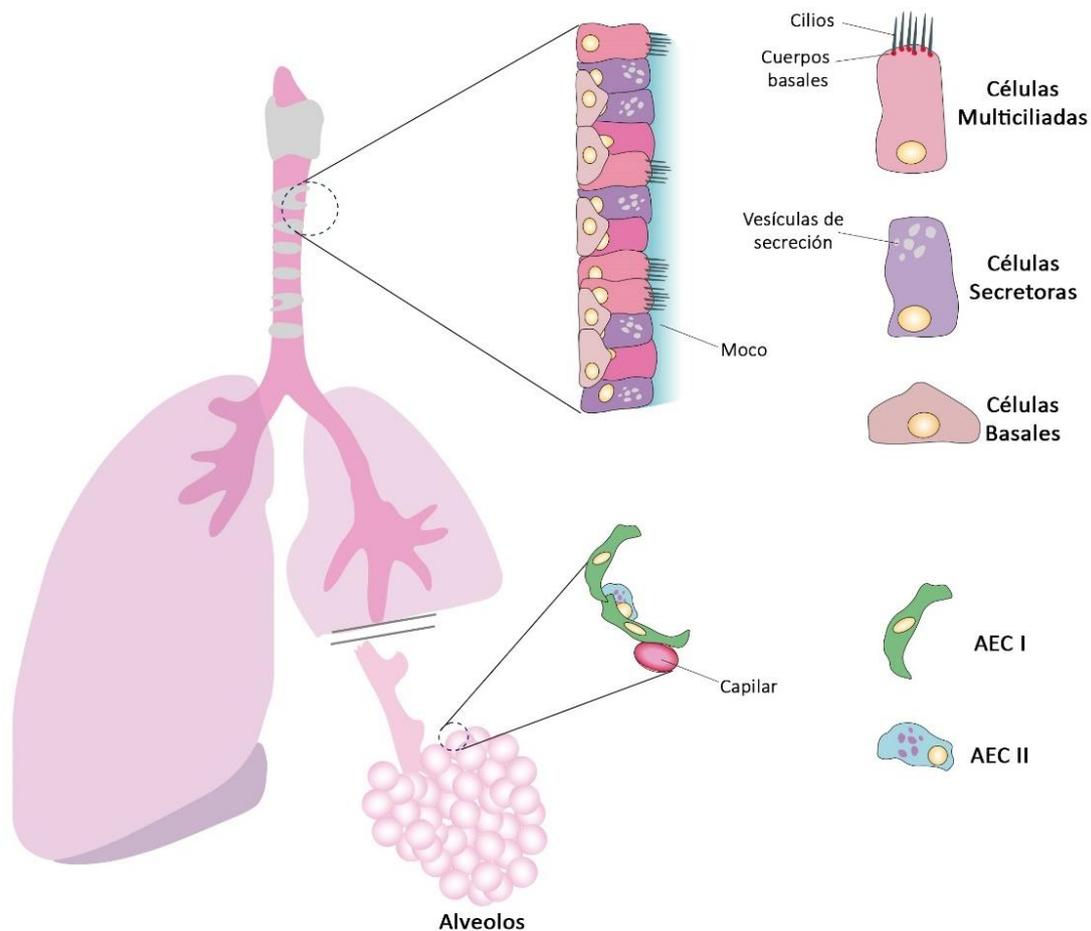


Figura 14: Esquema de las células que componen el epitelio de las vías respiratorias. Se muestran las células que tapizan las vías respiratorias conductivas y los sacos alveolares. AEC: *Alveolar Epithelial Cells*.

Cabe destacar que existen diferencias significativas en la organización celular del epitelio de las vías respiratorias de humano y ratón. En ratones, el epitelio pseudoestratificado se localiza sólo en la tráquea y los bronquios principales, mientras que el epitelio que recubre las vías respiratorias más distales es una monocapa cuboidal en la que todas las células están en contacto con el lumen, y las células basales no están presentes¹²⁰. Por otro lado, el epitelio que recubre las vías respiratorias humanas es en su mayor parte pseudoestratificado, y la transición a epitelio cuboidal simple, sin células basales, se da únicamente en los bronquiolos más distales, los que están en contacto con los alveolos. Estas diferencias afectan a la respuesta a condiciones patológicas, inflamación o daño del tejido¹²¹, y varios estudios sostienen que los hallazgos referidos a la biología del epitelio de las vías respiratorias superiores en ratones pueden ser extrapolados al epitelio de los bronquios más distales en humanos. Veremos a continuación los principales tipos celulares que conforman el epitelio pseudoestratificado.

Células basales

Las células basales (CB) se denominan así por su proximidad a la lámina basal que rodea a las vías respiratorias y que está en contacto con el mesénquima. Estas células constituyen entre un 6 y un 30% de todas las células que conforman el epitelio pseudoestratificado, en función de la localización¹²², y actúan como reservorio de células multipotentes que se encargan de sustituir al resto de células diferenciadas de las vías respiratorias. En las vías respiratorias superiores, las células basales forman una monocapa continua en contacto con la lámina propia del tejido conjuntivo circundante, mientras que en regiones más distales se localizan formando clústeres o de forma individual, distribución compartida entre ratones y humanos¹²³. En ambas especies, las células basales del tracto respiratorio forman desmosomas, estructuras de contacto con las células columnares vecinas y con la lámina basal enriquecidas en moléculas de adhesión que juegan un papel esencial en el mantenimiento de la barrera celular y la homeostasis.

Atendiendo al perfil transcripcional e inmunohistoquímico de las células basales, una característica esencial de estas células son los altos niveles de expresión de la proteína p63, (codificada por el gen *Trp63* en ratón, TP63 en humanos), que forma parte de la familia de factores de transcripción de p53. Se ha demostrado que el desarrollo de las células basales es dependiente de p63, y que ratones mutantes para esta proteína carecen de células basales en el epitelio pseudoestratificado de la tráquea¹²⁴. Otra característica de las células basales es la expresión enriquecida de las proteínas citoqueratina 5 y 14 (KRT5 y KRT14 respectivamente). Estas proteínas, que forman parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto, no se expresan por igual en todas las células basales: KRT5 se expresa de forma mayoritaria, mientras que KRT14 sólo se encuentra en un subgrupo de células basales, y se sobreexpresa en situaciones de reparación de daños en el tejido o remodelación tras una infección, característica común en ratones y humanos¹²⁵.

Los mecanismos moleculares que intervienen en la autorrenovación y la diferenciación de células basales, así como gran parte del papel transcripcional de p63 permanecen aún poco detallados, sin embargo, diversos estudios sobre la reparación y remodelación del tejido de la tráquea y bronquios muestran que la ruta de Notch juega

un papel clave en el balance entre las poblaciones de células secretoras y multiciliadas que se originan a partir de los progenitores basales p63⁺/KRT5⁺¹²⁶. Concretamente, niveles elevados de Notch promueven la diferenciación hacia células secretoras, mientras que los niveles más bajos median la diferenciación de las células multiciliadas¹²⁷ a través de la activación de factores de transcripción como MCIDAS o GMEC1¹²⁸, proceso que veremos con más detalle a continuación.

Células Secretoras

Las células secretoras de las vías respiratorias representan una población heterogénea, que difiere significativamente en función de su posición proximal-distal¹²⁹. Esta variabilidad influye en el tipo de moléculas secretadas que constituyen el moco, compuesto principalmente por glicoproteínas, glicosaminoglicanos, lípidos, iones y agua, y que juega un papel clave en el mantenimiento de la barrera frente a patógenos, partículas inhaladas y en el metabolismo de xenobióticos. Además, las células secretoras conforman una población con una alta plasticidad, ya que pueden dar lugar a distintos tipos de células una vez diferenciadas. De acuerdo con sus características morfológicas y la abundancia y procedencia de los distintos tipos de vesículas de secreción, las células secretoras han sido históricamente clasificadas en tres grandes poblaciones: células club (anteriormente denominadas células Clara), células serosas presentes en las glándulas de las vías respiratorias más proximales y células *goblet* o caliciformes¹³⁰. Estas divisiones han sido, sin embargo, revisadas aplicando criterios moleculares, poniendo de manifiesto las similitudes entre células secretoras morfológicamente distintas.

En vertebrados, las rutas moleculares que modulan la diferenciación de los distintos linajes de células secretoras están principalmente mediadas por la ruta de Notch, un importante regulador de la especificación del destino celular durante el desarrollo embrionario¹³¹. En este proceso se han identificado cuatro receptores de la ruta (Notch 1-4) y cinco ligandos (Jag 1 y 2, y Dll 1, 3 y 4), que intervienen en la señalización célula-célula a través del factor de transcripción Rbpjk¹³². En este sentido se ha demostrado que ratones defectivos para *Rbpjk* no presentan células secretoras en sus vías respiratorias, mientras que la población de células multiciliadas está sobrerrepresentada¹³³.

En ratón, las células club constituyen la población predominante de células secretoras, alrededor de un 20% del total, que se distribuyen siguiendo un patrón disperso a lo largo de todo el tracto respiratorio, mientras que las células club de las vías respiratorias humanas se encuentran restringidas únicamente a los bronquios más distales¹³⁴. La proteína SCGB1A1, una secretoglobina que ha demostrado ejercer funciones antiinflamatorias¹³⁵, es el marcador de células club mejor caracterizado junto a SCGB3A2. Se ha demostrado que la expresión de ambas secretoglobinas está estrechamente relacionada con la ruta de Notch, y que individuos defectivos para los ligandos *Jag1* y *Jag2* presentaban una reducción de más del 80% en la expresión de ambas proteínas, además de diversas alteraciones en las células club¹³⁶. Por último, varios estudios concluyen que las células club presentan una gran capacidad de auto-regeneración, y son capaces de revertir su diferenciación para producir tanto células *goblet* como células multiciliadas, un proceso conocido como transdiferenciación, que tiene lugar en respuesta a estrés agudo^{137, 138}.

Como hemos mencionado anteriormente, además de las células club, la población de células secretoras está compuesta por células *goblet* o caliciformes, que se encuentran también intercaladas entre el resto de los tipos celulares del epitelio. Estas células presentan una elevada polarización apical-basolateral, con el núcleo y la mayor parte de orgánulos situados en la zona basal, y grandes vesículas secretoras cargadas de glicoproteínas de alto peso molecular llamadas mucinas en la región apical¹³⁹. Un marcador de células caliciformes que ha sido utilizado en múltiples estudios es MUC5AC, una mucina muy enriquecida en este subtipo celular¹⁴⁰. Otro marcador típicamente utilizado para las células caliciformes es la proteína SPDEF, un factor de transcripción que controla el programa de diferenciación de estas células, y que está claramente implicado en el proceso de transdiferenciación desde células Clara a células caliciformes¹⁴¹.

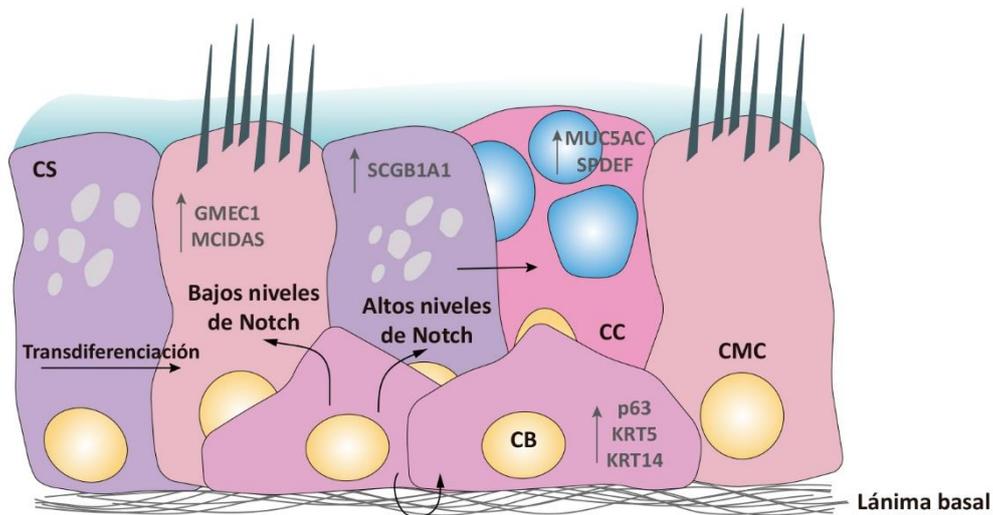


Figura 15: Esquema de las células que componen el epitelio pseudoestratificado de las vías respiratorias conductivas. CB: Células Basales, CS: Células Club, CMC: Células Multiciliadas, CC: Células caliciformes.

Células Multiciliadas (CMC)

Las células multiciliadas se encuentran fundamentalmente en los epitelios de las mucosas, y forman varios centenares de cilios que baten de forma coordinada para generar movimiento en fluidos que permiten el desplazamiento de partículas y otras células. En las vías respiratorias, las células multiciliadas están implicadas en el movimiento del moco que recubre el epitelio, y cuya función es atrapar las partículas y patógenos inhalados. En otros tejidos, como en los ventrículos cerebrales y canales ependimarios de la médula espinal, las células multiciliadas mueven el líquido cefalorraquídeo, mientras que en los oviductos son las encargadas de generar el flujo que desplaza el óvulo. Como consecuencia de estas funciones, alteraciones en las células multiciliadas conducen a infecciones respiratorias recurrentes, hidrocefalia o infertilidad^{142, 143}.

Rutas moleculares que median la diferenciación de las CMC

Uno de los primeros pasos que tiene lugar en la diferenciación de células multiciliadas está ampliamente descrito en el epitelio de las vías respiratorias de mamífero. En este epitelio, la modulación de la activación de la ruta de Notch marca el balance entre los distintos linajes celulares¹²⁶. Cuando la ruta se encuentra inhibida, la población de células multiciliadas se expande a expensas del linaje secretor, mientras que la activación constitutiva utilizando organismos transgénicos para elementos de la

ruta de Notch ha demostrado que provoca una sobrerrepresentación de células secretoras en detrimento de las células multiciliadas^{133, 144}. La inhibición de la ruta de Notch también está implicada en procesos de transdiferenciación, a través de los cuales pueden originarse CMC a partir de células secretoras¹⁴⁵. Los mecanismos que mantienen balanceadas ambas poblaciones celulares están aún por esclarecer, aunque se ha demostrado que existen señales de inhibición lateral mediante el contacto célula-célula, lo cual genera una distribución de “mosaico” a lo largo del epitelio pseudoestratificado^{133, 146}. Además, en vías respiratorias de adultos, las células basales bloquean la diferenciación a CMC mediante el aporte continuo de ligandos de la ruta de Notch como DLL, JAG1 o JAG2¹⁴⁵. Por último, microRNAs como miR449 están muy enriquecidos en progenitores de células multiciliadas, y reprimen la ruta de Notch a través de la interacción con NOTCH1 y DLL1¹⁴⁷. El programa transcripcional que se observa durante la diferenciación de las células multiciliadas está mayoritariamente dirigido a la construcción y mantenimiento de los cilios.

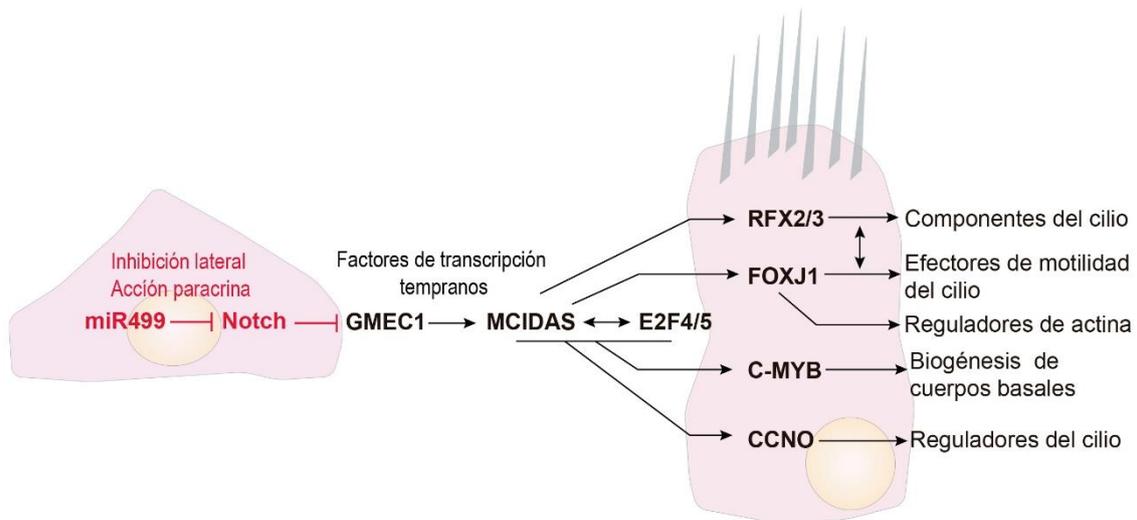


Figura 16: Esquema de las rutas moleculares que median la diferenciación de las células multiciliadas.

Dos genes reguladores de la diferenciación de células multiciliadas por debajo de la ruta de Notch son *Gemc1* y *Mcidas*. Ambos presentan dominios de unión a proteínas e interaccionan con Geminina, una proteína clave en el balance entre la progresión del ciclo celular y la diferenciación¹⁴⁸. Se ha demostrado que ambos genes son suficientes para promover la diferenciación hacia células multiciliadas, y que su sobreexpresión dirige la producción de células endimarias a partir de células de la glía radial¹⁴⁹. El factor de transcripción MCIDAS interacciona con el represor del ciclo celular E2F4/5, un

elemento clave en la amplificación de cuerpos basales durante la ciliogénesis en CMC, y que actúa a través de otro factor de transcripción, C-MYB¹⁵⁰. En este sentido, ratones mutantes para E2F4/5 presentan defectos en el desarrollo de células multiciliadas en sus epitelios, mutación que también se ha reportado en pacientes con desórdenes en el flujo mucoso de las vías respiratorias^{143, 151}.

Un proceso concomitante a la amplificación del número de cuerpos basales es la expresión sincronizada de los genes necesarios para la construcción del cilio, proceso que está regulado fundamentalmente por el factor de transcripción FOXJ1 (*Forkhead box J1*), perteneciente a la familia de FOX, y que ha demostrado ser esencial en la extensión del axonema, la generación del movimiento del cilio y el anclaje de los cuerpos basales^{152, 153}. Además, mutantes homocigotos para FOXJ1 presentan defectos en la determinación de la simetría derecha-izquierda, proceso que ocurre durante el desarrollo embrionario¹⁵⁴. Se ha demostrado que FOXJ1 interacciona con otros factores de transcripción como RFX2 y 3, dirigiendo la expresión de componentes del cilio durante la diferenciación de CMC. En las vías respiratorias de vertebrados, RFX3 incrementa la expresión de las dianas de FOXJ1, y experimentos de co-inmunoprecipitación han demostrado que existe una interacción física entre RFX2/3 y FOXJ1¹⁵⁵. En base a estos experimentos se ha propuesto la posibilidad de que FOXJ1 y RFX conformen un complejo transcripcional que orquesta la ciliogénesis en células multiciliadas, y que se encontraría bajo la regulación de MCIDAS¹⁵⁰.

Estudios más recientes han descrito el papel esencial que ocupa p73 en la regulación de la diferenciación de células multiciliadas. Esta proteína pertenece a la familia del supresor tumoral p53, que engloba también a otras como p63, y que están implicadas en procesos tan diversos como el control del ciclo celular, la reparación de daños en el DNA o la entrada de las células en apoptosis^{156, 157}. p73 contiene dominios de unión a DNA similares a los de los miembros de su familia, sin embargo, su función fisiológica difiere considerablemente. Mientras que p63 es esencial para el mantenimiento del linaje progenitor en el desarrollo y la morfogénesis de los epitelios¹⁵⁸, los ratones defectivos para p73 exhibían, entre otros defectos, esterilidad, hidrocefalia e infecciones recurrentes en las vías respiratorias, alteraciones relacionadas con la pérdida de células multiciliadas¹⁵⁹. En base a esto, estudios posteriores han

demostrado que la expresión de p73 se encuentra enriquecida en células multiciliadas completamente diferenciadas, además de en un subgrupo de células basales que darán lugar a CMC¹⁶⁰. Mediante experimentos de inmunoprecipitación de cromatina se ha determinado también que p73 interacciona con varias decenas de genes asociados a la ciliogénesis, especialmente con la región reguladora de la transcripción de FOXJ1, RFX3 y MYB, revelándose como un regulador maestro de la expresión de estos factores de transcripción¹⁶¹. Además, estudios recientes han concluido que p73 está implicado en el posicionamiento apical de los cuerpos basales, en su correcta organización planar, y en la organización de la dinámica del citoesqueleto, lo que pone de manifiesto su papel esencial en el correcto desarrollo de las células multiciliadas^{162, 163}.

Como hemos descrito anteriormente, las células multiciliadas cumplen un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis del sistema respiratorio, sin embargo, gran parte de los mecanismos moleculares que median su diferenciación, así como su abundancia relativa en el epitelio de las vías respiratorias están aún por resolver. En este capítulo estudiaremos el proceso en el cual, a partir de una población de células progenitoras de las vías respiratorias, se desarrolla un epitelio pseudoestratificado complejo y funcional, en el que están presentes los distintos tipos celulares que tapizan el sistema respiratorio.

OBJETIVOS CAPÍTULO II

OBJETIVOS CAPÍTULO II

En el capítulo anterior hemos abordado las rutas moleculares que regulan la distribución de los centriolos en el interior celular. Además de esta distribución, aspectos como el número de centriolos presentes en determinados tipos celulares juegan un papel clave en la correcta función fisiológica y el mantenimiento de la homeostasis. Las células multiciliadas que tapizan numerosos órganos constituyen un claro ejemplo de ello. A pesar de esta relevancia, aún existen grandes interrogantes en el proceso en el que una célula con una pareja de centriolos pasa a poseer centenares de ellos, dando lugar a los cuerpos basales de los cilios en las células multiciliadas.

En el epitelio pseudoestratificado que tapiza las vías respiratorias de los vertebrados, las células multiciliadas cumplen una función esencial en el flujo orientado del moco que permite la eliminación de patógenos y partículas atrapadas durante la respiración. Un análisis *in silico* de factores de transcripción e interactores que presentan una expresión diferencial entre células basales y multiciliadas reveló que el factor de transcripción p53 podría jugar un papel esencial en este proceso. Además, otros miembros de la familia de p53 como p63 y p73 han demostrado estar implicados en el desarrollo del epitelio de las vías respiratorias.

En base a estos datos, en este capítulo nos propusimos analizar el papel de p53 en la homeostasis y la diferenciación del epitelio pseudoestratificado de las vías respiratorias. Además, puesto que la ubiquitina ligasa MDM2 actúa como el principal regulador de la estabilidad de p53, decidimos abordar su implicación en estos procesos. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar los niveles de expresión de p53 y MDM2 durante la diferenciación de las células basales del epitelio respiratorio.
2. Analizar el papel de p53 y MDM2 en la diferenciación del epitelio de las vías respiratorias a través de la modulación de sus niveles de expresión.

3. Estudiar el papel de la interacción MDM2/p53 en la proliferación y la diferenciación celular mediante el uso de fármacos que bloquean dicha interacción.

4. Analizar la implicación de la interacción entre MDM2/p53 en la integridad del epitelio respiratorio y la funcionalidad de las células multiciliadas.

RESULTADOS CAPÍTULO II

Análisis *in silico* de factores de transcripción que median la diferenciación de CMC

Como hemos detallado en la introducción, la correcta función fisiológica del epitelio que tapiza las vías respiratorias requiere un adecuado balance entre los distintos tipos celulares que lo componen. En este epitelio, las células multiciliadas cumplen una función esencial en el flujo orientado del moco que permite la eliminación de patógenos y partículas atrapadas durante la respiración. A pesar de su relevancia, existen aún muchos interrogantes acerca de las rutas moleculares que modulan la diferenciación de las células basales en células multiciliadas.

Para profundizar en el conocimiento sobre estos mecanismos moleculares, decidimos comparar, mediante un análisis *in silico*, la expresión de los factores de transcripción e interactores entre células basales y células multiciliadas. Para ello utilizamos datos de secuenciación de célula única del epitelio respiratorio, recogidos en la base de datos *Gene Expresión Omnibus* (GSE102580)¹⁶⁴, identificando factores de transcripción que se expresan en ambos tipos celulares. Una vez identificados, comparamos la expresión de estos factores de transcripción junto a sus interactores (obtenidos mediante la herramienta de interacciones proteína-proteína STRING, y que denominaremos redes de proteínas) en células multiciliadas frente a células basales. Los resultados obtenidos tras este análisis se muestran en la figura RII.1.

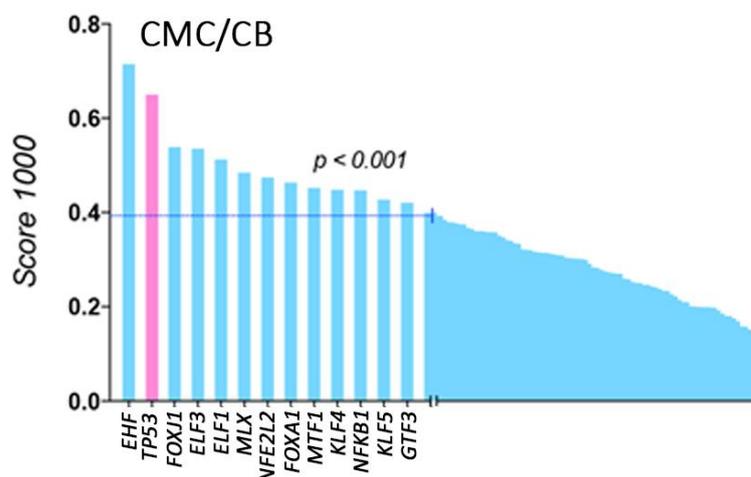


Figura RII.1: Análisis de los factores de transcripción e interactores que se expresan de forma diferencial en células basales (CB) y células multiciliadas (CMC). Se utilizaron datos de secuenciación de célula única (GSE102580) y los interactores fueron identificados mediante la herramienta STRING.

Como cabría esperar, entre los genes cuya expresión está notablemente enriquecida en células multiciliadas se encuentran factores de transcripción implicados en la diferenciación de este tipo celular y la ciliogénesis, como *FOXJ1*¹²⁸ o *KLF4*¹⁶⁵. También encontramos redes de proteínas centradas en factores de transcripción que regulan el proceso de transdiferenciación en respuesta a daños en el epitelio respiratorio, como *FOXA1*¹⁶⁶ o *EHF*¹⁶⁷. Sorprendentemente, nuestro análisis también reveló otros genes cuyo papel en el proceso de diferenciación de células multiciliadas apenas ha sido descrito. Una de estas redes de proteínas fue la centrada en el gen *TP53*, resaltada en color rosa en la figura RII.1.

El papel clásico de p53, la proteína codificada por el gen *TP53*, es el de supresor tumoral, esencial en la respuesta al daño en el ADN, el control de la proliferación celular y la apoptosis^{168,169}. Además de este papel clásico y ampliamente descrito, en los últimos años, p53 ha sido relacionada con procesos de diferenciación y autorrenovación en células tan diversas como las neuronas o los progenitores renales^{170,171}. En lo relativo al sistema respiratorio, un estudio reciente ha demostrado que p53 juega un papel clave en el balance entre las distintas poblaciones celulares del epitelio respiratorio cuando éstas se desarrollan a partir de células secretoras¹⁷². A pesar de estos hallazgos, la función de p53 en la diferenciación y la autorrenovación de las células basales del epitelio respiratorio aún no ha sido descrita.

En base al resultado obtenido de este análisis y al conocido papel de otros miembros de la familia de p53 en el desarrollo de las vías respiratorias, como p63 y p73, descritos en la introducción, decidimos analizar la función de p53 en la diferenciación y la homeostasis del epitelio respiratorio de vertebrados.

Para llevar a cabo este estudio utilizamos células progenitoras obtenidas de la tráquea de ratones sanos (MTECs, *Mouse Tracheal epithelial cells*) y de biopsias de bronquio humano (BRO, *Bronchial epithelial cells*), que fueron cultivadas y diferenciadas *in vitro*. El empleo de estos modelos conllevó una caracterización inicial del proceso de diferenciación *in vitro* de los cultivos realizados en nuestro laboratorio.

Caracterización del cultivo *in vitro* de células basales de la tráquea de ratón

Como se ha descrito en la introducción, el desarrollo del epitelio que recubre las vías respiratorias comienza con la expresión anterior-ventral del factor de transcripción *Nkx2.1*¹⁷³. En las vías respiratorias superiores, la expresión de *Nkx2.1* se limita únicamente a las etapas iniciales del desarrollo, quedando después restringido a las porciones más distales que darán lugar a los pulmones. En la región proximal, que dará lugar a la tráquea, el descenso en la expresión de *Nkx2.1* se relaciona con un incremento en la expresión de *Sox2*, mientras que en las células que darán lugar a los bronquiolos y alveolos se produce un incremento de los reguladores transcripcionales *Id2* y *Sox9*.

Para caracterizar la diferenciación del cultivo celular obtenido tras la disección y la disgregación de las tráqueas de ratón, las células se expandieron en placas de cultivo convencionales, y posteriormente se sembraron sobre soportes tipo *transwell*, como se detalla en el apartado de materiales y métodos. Una vez confluentes, el medio superior se retiró, y el medio de la cámara inferior fue sustituido por medio ALI (*Air Liquid Interface*, StemCell), que promueve la diferenciación de las células progenitoras del sistema respiratorio.

En ratón, el proceso de diferenciación del epitelio respiratorio *in vitro* se completa tras 14 días en medio ALI, sin embargo, la mayor parte de los eventos relativos a cambios en la regulación y expresión génica tienen lugar en las primeras etapas de la diferenciación. Por este motivo, analizamos la expresión de los genes marcadores de tejido respiratorio proximal/distal *Nkx2.1*, *Sox2*, *Sox9* e *Id2*, mediante secuenciación masiva de transcritos (ARNseq) durante los días 0, 4 y 7 de diferenciación.

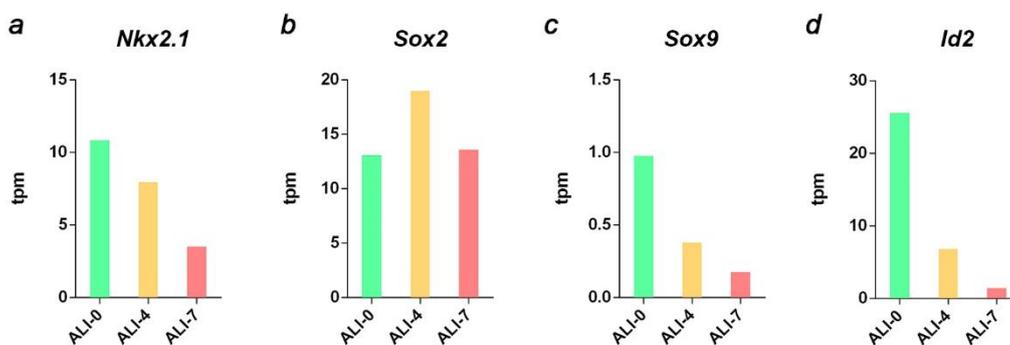


Figura RII.2: Análisis de transcritos de los marcadores de desarrollo del sistema respiratorio. Los niveles de ARN mensajero fueron analizados mediante secuenciación masiva de transcritos en muestras obtenidas en los días 0, 4 y 7 del proceso de diferenciación.

En la figura RII.2 se muestran los resultados obtenidos de la secuenciación de transcritos. En el panel a podemos observar un descenso en el marcador *Nkx2.1*, lo que se corresponde con la dinámica descrita para las células progenitoras de las vías respiratorias proximales. Además, los niveles de expresión de *Sox2* se mantuvieron durante las primeras etapas de la diferenciación (Figura RII.2 b), mientras que la expresión de los marcadores *Sox9* e *Id2*, que promueven la diferenciación hacia tipos celulares de vías respiratorias distales, mostró un claro descenso durante la diferenciación del cultivo *in vitro* (Figura RII.2 c, d).

En las vías respiratorias superiores, los patrones de expresión de *Sox2* y de *Sox9/Id2* actúan promoviendo la diferenciación de las distintas poblaciones celulares que tapizan el epitelio de la tráquea y los bronquios principales. Como hemos descrito en la introducción, este epitelio está mayoritariamente compuesto por células basales, secretoras, y multiciliadas. Las distintas poblaciones celulares de la tráquea y los bronquios presentan un patrón de expresión génica característico, y los niveles de expresión de ciertos genes pueden utilizarse como marcadores de la presencia de estas poblaciones. En este sentido, las células basales se caracterizan por los altos niveles de expresión del factor de transcripción p63 o de la proteína citoqueratina 5 (*Krt5*)¹²⁵. Por otro lado, las células secretoras pueden ser subdivididas en células clara y células caliciformes, y se caracterizan por los elevados niveles de expresión de las glicoproteínas *Scgb1a1* y *Scgb3a2* en las células clara o las mucinas *Muc5ac*, *Muc5b*, y el factor de transcripción *Spdef* en las células caliciformes¹²⁷. Por último, la expresión de los factores de transcripción *Foxj1* y *Mcidas* son característicos de la población de células multiciliadas del epitelio respiratorio¹²⁸.

Para comprobar que las células basales cultivadas y diferenciadas *in vitro* tenían la capacidad de generar las distintas poblaciones que componen el epitelio pseudoestratificado de las vías respiratorias, analizamos mediante secuenciación masiva de transcritos los niveles de expresión de los marcadores de células basales, secretoras y multiciliadas a lo largo del proceso de diferenciación.

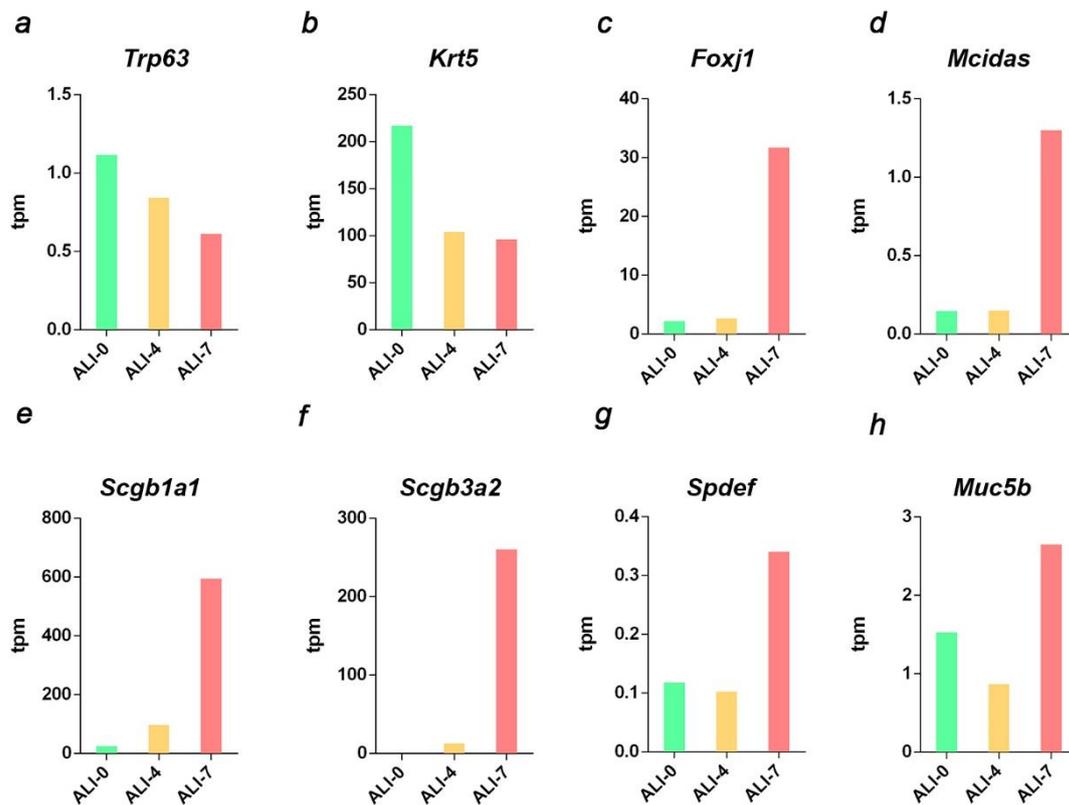


Figura RII.3: Análisis de transcritos de los marcadores de poblaciones celulares del epitelio respiratorio. Niveles de ARN mensajero analizados mediante secuenciación masiva de transcritos en muestras obtenidas en los días 0, 4 y 7 del proceso de diferenciación. Se analizaron los marcadores de células basales (*Trp63*, *Krt5*), multiciliadas (*Foxj1*, *Mcidas*), club (*Scgb1a1*, *Scgb3a2*) y caliciformes o goblet (*Spdef*, *Muc5b*). tpm: Transcritos por millón.

Los resultados obtenidos mediante secuenciación de transcritos mostraron un descenso en la expresión de los marcadores de células basales *Trp63* y *Krt5* a lo largo de la diferenciación, manteniéndose ciertos niveles de ARNm, lo que indicaría la presencia de estas células progenitoras en el cultivo diferenciado (Figura RII.3 a, b). La población de células multiciliadas, atendiendo a la expresión de los marcadores *Foxj1* y *Mcidas*, se ve notablemente incrementada en el día 7 de diferenciación, como se muestra en los paneles c y d de la figura RII.3. Por último, los marcadores analizados para la población de células club (paneles e y f) y *goblet* (paneles g y h) revelaron un claro incremento de la expresión en ALI7 con respecto al inicio de la diferenciación. Estos resultados ponen de manifiesto la diferenciación de las distintas poblaciones celulares que componen el epitelio respiratorio a partir de las células basales cultivadas *in vitro*.

Además de los resultados obtenidos mediante secuenciación de transcritos, decidimos caracterizar la abundancia y la distribución de células multiciliadas en el cultivo *in vitro* mediante inmunofluorescencia, con el fin de compararlas con el epitelio

de tráqueas de ratones adultos. Para marcar las células multiciliadas, utilizamos dos proteínas estructurales de los cilios: la γ -tubulina, presente en los centrosomas y cuerpos basales, y la tubulina acetilada, localizada en el axonema de los cilios. Los resultados obtenidos de las inmunofluorescencias, que se muestran en la figura RII.4, reflejan la presencia de células multiciliadas en nuestro cultivo *in vitro* con una abundancia y disposición similares a las del tejido de tráquea adulto.

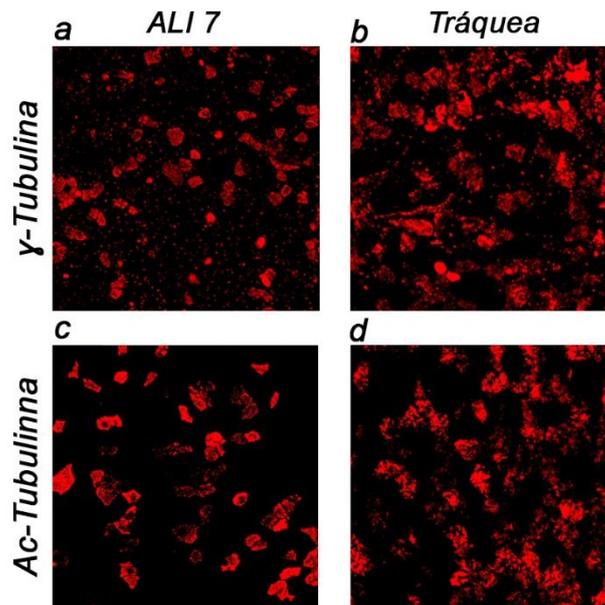


Figura RII.4: Marcaje de inmunofluorescencia para la detección de células multiciliadas. Se analizó la presencia de células multiciliadas mediante el marcaje de γ -Tubulina (a, b) y Tubulina acetilada (d, e) en cultivos diferenciados *in vitro* (a, c) y en tráqueas de ratones adultos (b, d).

En base a los resultados obtenidos mediante secuenciación de ARN e inmunofluorescencia, podemos afirmar que el cultivo *in vitro* de las células basales obtenidas de tráqueas de ratones adultos promueve la diferenciación de las poblaciones presentes en las vías respiratorias superiores, siendo un modelo ideal para el estudio de las rutas moleculares que regulan el proceso de diferenciación del sistema respiratorio.

Los niveles de p53 varían a lo largo de la diferenciación

Una vez caracterizado el cultivo *in vitro* del epitelio respiratorio, y en base a los resultados del análisis de factores de transcripción que se muestra en la figura RII.1, y que hemos descrito al inicio de este apartado, comenzamos analizando los niveles de expresión de p53 a lo largo de la diferenciación mediante de qPCR y *western blot*.

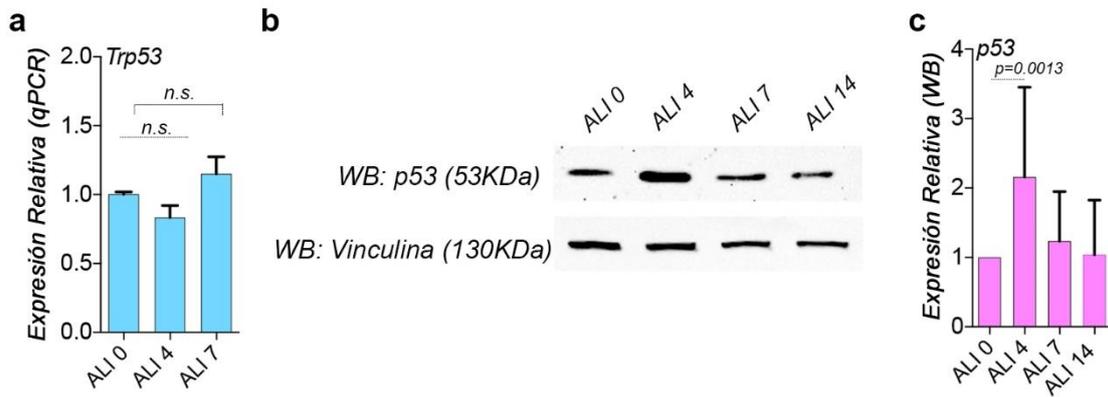


Figura RII.5: Análisis de la expresión de p53 durante el proceso de diferenciación celular. a, niveles de ARN mensajero analizados mediante qPCR. Se utilizó la expresión de *Eif1a* para normalizar los niveles de expresión, n=8. b, Imágenes de *western blot* de p53 y vinculina durante la diferenciación celular. c, cuantificación de la expresión de p53 analizada mediante *western blot*, n=6. Las columnas en a y c representan la media, y las barras de error representan la desviación estándar para cada condición. Se utilizó vinculina como control de carga y las cuantificaciones se hicieron relativas a ALI 0.

Como se muestra en el panel a de la figura RII.5, los niveles de ARNm de p53 no se ven modificados durante las primeras etapas de la diferenciación. Cuando analizamos los niveles de proteínas mediante *western blot*, en cambio, sí encontramos un incremento de los niveles de p53 en ALI 4 (Figura RII.5 b), resultado que confirmamos con la cuantificación del *western*, que se muestra en el panel c. Estos resultados sugieren una regulación en la estabilidad de la proteína p53 en las primeras etapas de la diferenciación del epitelio respiratorio.

p53 sufre modificaciones postraduccionales a lo largo de la diferenciación

Las modificaciones postraduccionales como la fosforilación o la acetilación juegan un papel esencial en la regulación de la actividad de p53. En esta regulación, la fosforilación en residuos de determinados dominios, como el dominio de transactivación, incrementa la respuesta transcripcional de p53, mientras que la acetilación del dominio regulador reduce la afinidad de la ubiquitina ligasa MDM2 por p53¹⁷⁴, promoviendo su estabilidad. Para caracterizar estas modificaciones a lo largo de la diferenciación del epitelio de las vías respiratorias, decidimos analizar mediante *western blot* el estado de fosforilación y acetilación de los principales residuos de p53 afectados.

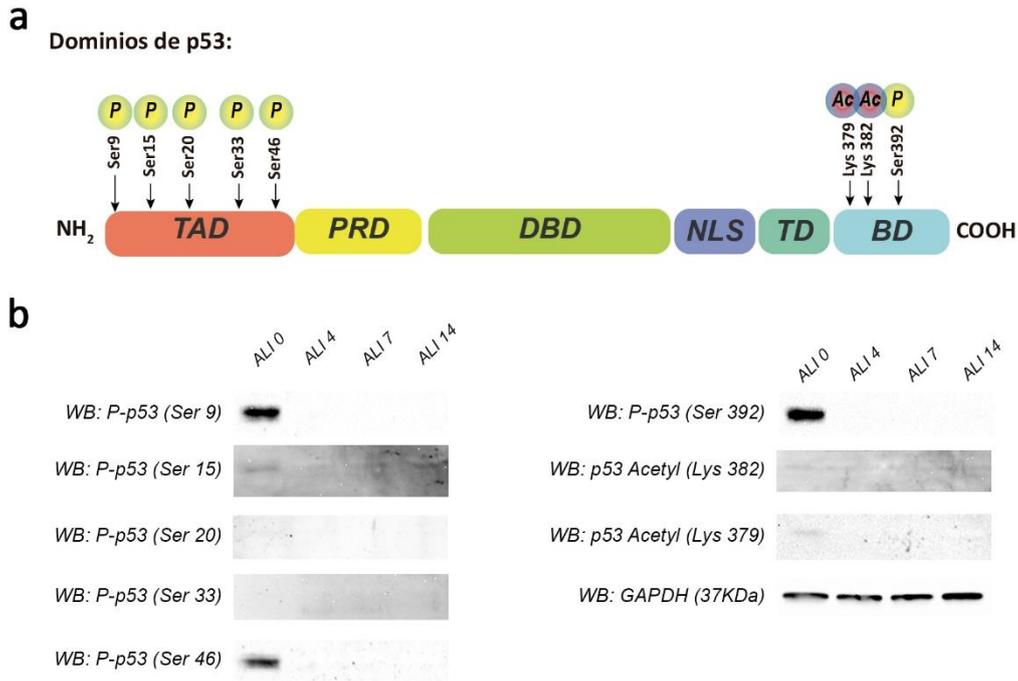


Figura RII.6: Modificaciones postraduccionales de p53 a lo largo de la diferenciación del epitelio respiratorio: a, esquema de los dominios de la proteína p53 y los principales residuos que regulan su actividad. TAD: Transactivation Domain, PRD: Proline Rich Domain, DBD: DNA Binding Domain, NLS: Nuclear Localization Signal, TD: Tetramerization Domain, BD: Basic Domain. b, imágenes de *western blot* de las modificaciones postraduccionales en los residuos de p53 analizados. Se utilizó GAPDH como control de carga.

En el panel a de la figura RII.6 se muestra un esquema de los residuos analizados mediante *western blot*, así como su localización en los distintos dominios de p53. Como se observa en el panel b, p53 se encuentra fosforilado en ALI0 en los residuos de serina 9 (Ser9), Ser15 y Ser46, todos ellos localizados en el dominio de transactivación (TAD), donde actúan incrementando la actividad de p53¹⁷⁵. La fosforilación en estos residuos podría sugerir una mayor actividad de p53 en las primeras etapas de la diferenciación del epitelio respiratorio. La acetilación de los residuos localizados en el dominio básico o regulador (BD), actúa disminuyendo la afinidad de MDM2 por este dominio, disminuyendo a su vez los niveles de ubiquitinación e incrementando la estabilidad de p53¹⁷⁶. Como se observa en el panel b de la figura RII.6, no encontramos elevados niveles de acetilación en ninguno de los residuos analizados.

Los niveles de la ubiquitina ligasa MDM2 varían a lo largo de la diferenciación

El incremento en los niveles de proteína de p53 que se muestra en la figura RII.5 podría estar provocado por una regulación de su estabilidad, debida a modificaciones postraduccionales que median su degradación. Uno de los principales candidatos que modulan los niveles de p53 es la E3-ubiquitina ligasa MDM2, que promueve su degradación mediante ubiquitinación¹⁷⁷, y que además ha sido relacionado con el desarrollo del sistema respiratorio¹⁷⁸. En base a esto, decidimos estudiar la dinámica de expresión de la proteína MDM2 a lo largo de la diferenciación en nuestro modelo de cultivo *in vitro*.

En el panel a de la figura RII.7 se observa que los niveles de ARN mensajero de *Mdm2* descienden en los días 4 y 7 de diferenciación cuando se comparan con el de las células no diferenciadas. Este descenso se vio muy acentuado cuando se analizó la cantidad de proteínas, observando una drástica caída de los niveles de MDM2 una vez iniciada la diferenciación (Figura RII.7 b, c).

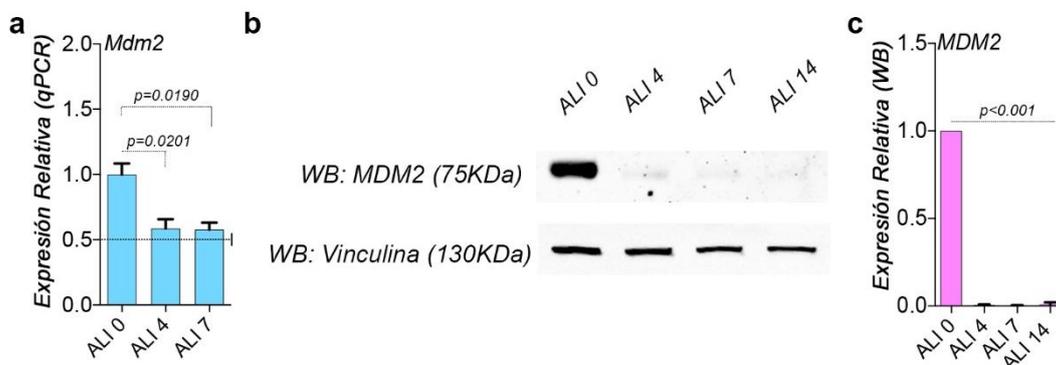


Figura RII.7: Niveles de expresión de MDM2 durante el proceso de diferenciación celular. a, niveles de ARN mensajero de *Mdm2* analizados mediante qPCR. Se utilizó la expresión de *Eif1a* para normalizar los niveles de expresión n=8. b, Imágenes de *western blot* de MDM2 y vinculina durante la diferenciación celular. c, cuantificación de la expresión de MDM2 analizada mediante *western blot*, n=6. Las columnas en a y c representan la media, y las barras de error representan la desviación estándar para cada condición. Se utilizó vinculina como control de carga y las cuantificaciones se hicieron relativas a ALI 0.

El descenso en los niveles de ARN y proteínas de MDM2 que se observa en las primeras etapas de la diferenciación indica que el incremento de p53 que observamos en las muestras en ALI4 (Figura RII.5 b, c) podría ser debido a una estabilización provocada por este descenso de MDM2.

MDM2 se expresa mayoritariamente en células multiciliadas

Para determinar si las variaciones en la expresión de p53 y MDM2 están asociadas al desarrollo de un determinado tipo celular, decidimos analizar la presencia de transcritos de la familia de p53 y MDM2 en cada una de las poblaciones celulares. Para ello utilizamos datos de secuenciación de célula única del epitelio respiratorio de ratón¹⁶⁴. Además, analizamos mediante inmunofluorescencia la localización de estas proteínas a lo largo del proceso de diferenciación, combinándolas con el marcaje específico para células basales (p63) y multiciliadas (FOXJ1).

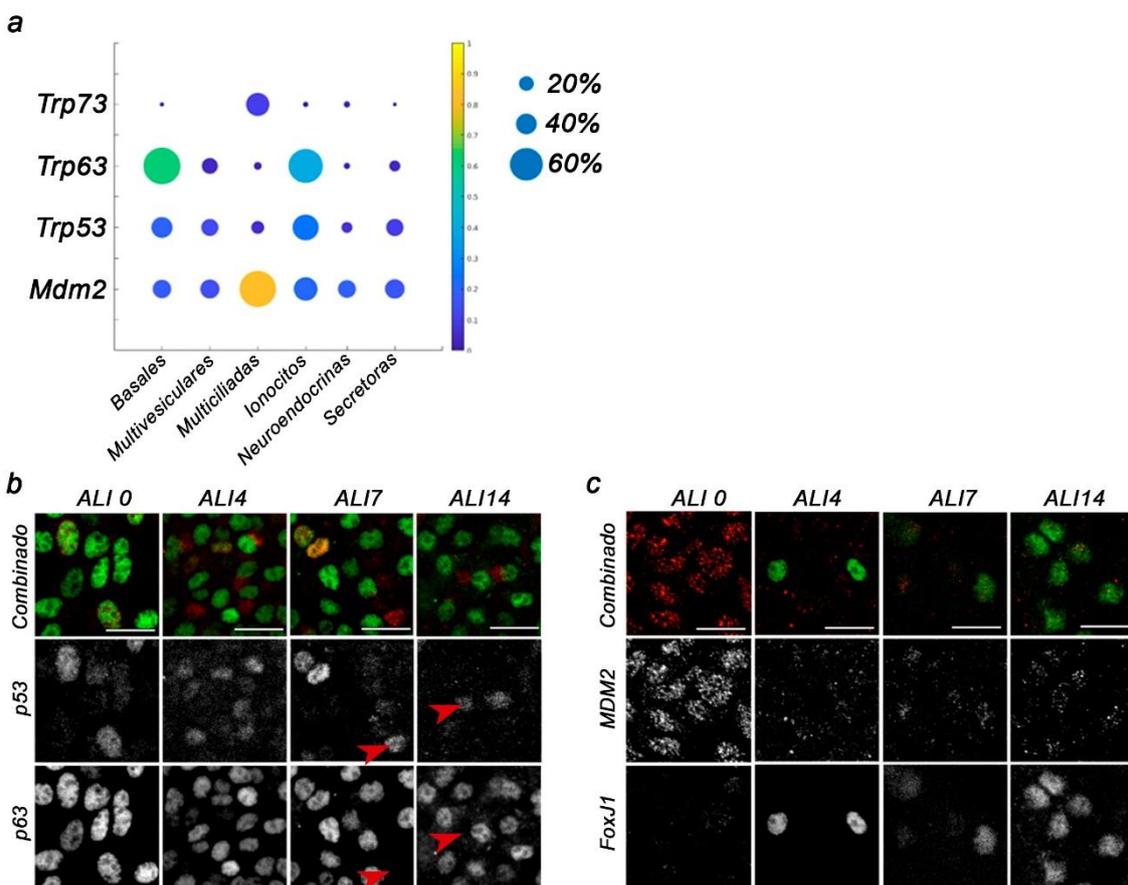


Figura RII.8: Análisis de la expresión de p53 y MDM2 en los distintos tipos celulares que componen el epitelio respiratorio. a, representación *dot blot* de los niveles de ARN mensajero de *Trp73*, *Trp63*, *Trp53* y *Mdm2* en los tipos celulares mayoritarios del epitelio respiratorio, obtenidos mediante secuenciación de célula única. b, Imágenes de microscopía confocal de las inmunofluorescencias para p53 en combinación con p63 a lo largo de la diferenciación. Las puntas de flecha en b indican células que expresan p53 pero no p63. c, Imágenes de microscopía confocal de las inmunofluorescencias de MDM2 en combinación con FOXJ1 a lo largo de la diferenciación. Las barras de escala en b y c representan 20µm.

Los resultados obtenidos tras el análisis de los datos de secuenciación de célula única mostraron una elevada presencia de transcritos para *Mdm2* en células

multiciliadas (Figura RII.8 a), mientras que el gen *Trp53* se expresa de forma homogénea en todos los tipos celulares. En cuanto a *Trp63*, como cabría esperar, se encuentra muy enriquecido en células basales, al igual que ocurre con la proteína p73 en células multiciliadas.

En el panel b de la figura RII.8 se muestra un ejemplo del análisis de inmunofluorescencia de p53 a lo largo de la diferenciación. Como podemos observar al inicio de la diferenciación (ALI 0), p53 se expresa en la mayor parte de las células positivas para p63, mientras que a medida que el proceso avanza, encontramos células que expresan p53 pero no p63, indicadas con puntas de flecha en la figura RII.8. En ALI 14, ninguna de las células positivas para p53 eran p63⁺ (Figura RII.8 b). En cuanto a MDM2, detectamos una expresión ubicua en ALI 0, que desaparece en ALI 4, etapa en la que empiezan a aparecer células positivas para el marcador de células multiciliadas FOXJ1 (Figura RII.8 c). A medida que la diferenciación avanza, la señal de MDM2 se localiza en las células positivas para FOXJ1, encontrando en ALI14 que todas las células positivas para MDM2 son multiciliadas.

El descenso generalizado en la expresión de MDM2 al inicio de la diferenciación obtenido mediante inmunofluorescencia se corresponde con los resultados del *western blot* mostrados en la figura RII.7. El enriquecimiento de esta proteína en las células multiciliadas a medida que avanza el proceso de diferenciación, comprobado mediante secuenciación de célula única e inmunofluorescencia, podría indicar que MDM2 juega un papel importante en el desarrollo de las células multiciliadas.

La expresión de otras E3-Ubiquitina ligasa no se ve enriquecida en las distintas poblaciones celulares

Como ya hemos mencionado, los niveles de la proteína p53 están fundamentalmente regulados por ubiquitinación¹⁷⁹. En este proceso, además de MDM2, participan otras ubiquitina ligasas entre las que encontramos a Pirh2, Cop1, Chip o Rnf6¹⁸⁰. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para MDM2, decidimos analizar la expresión del resto de ubiquitina ligasas que han demostrado estar implicadas en la regulación de p53. Para ello, analizamos la dinámica de expresión durante la diferenciación de nuestros cultivos *in vitro* mediante qPCR. Además, también utilizamos

los datos de secuenciación de célula única empleados en el apartado anterior, con el fin de identificar si alguna de estas ubiquitina ligasas se veía enriquecida en una determinada población celular.

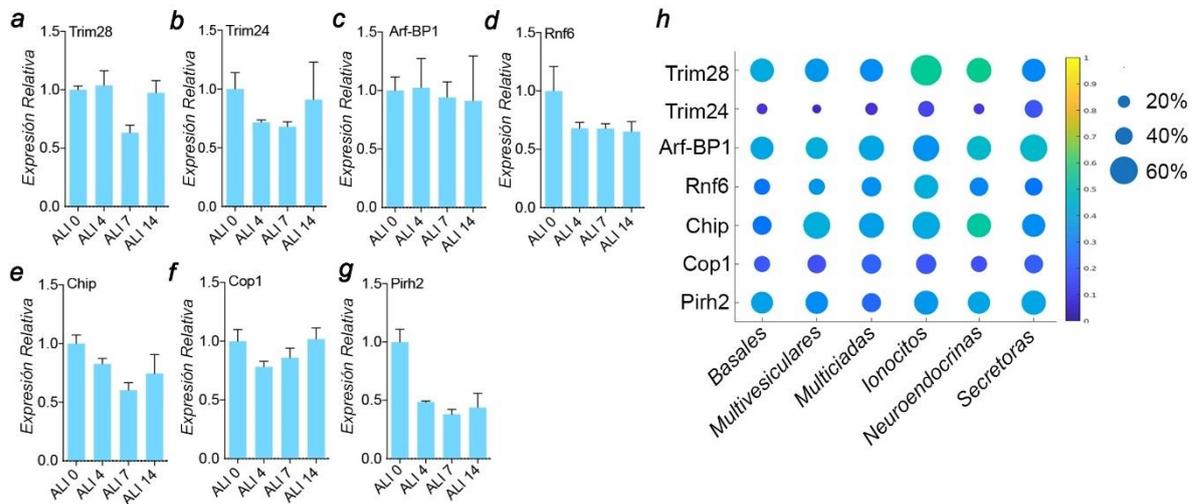


Figura RII.9: Niveles de expresión de las ubiquitina ligasas de p53 durante el proceso de diferenciación celular. a-g, niveles de ARN mensajero analizados mediante qPCR. Se utilizó la expresión de *Eif1a* para normalizar los niveles de expresión, n=6. h, representación *dot blot* de los niveles de ARN mensajero de las ubiquitina ligasas de p53 en los tipos celulares mayoritarios que componen el epitelio respiratorio de ratón, obtenidos mediante secuenciación de célula única. Las columnas en a-g representan la media y las barras de error representan la desviación estándar para cada condición. Las cuantificaciones se hicieron relativas a ALI 0.

Como se muestra en la figura RII.9, los niveles de expresión de las E3-Ubiquitina ligasas analizadas no se ven notablemente alterados durante la diferenciación, a excepción de *Rnf6* y *Pirh2* que, como en el caso de *Mdm2*, disminuyen los niveles de ARNm de al inicio del proceso de diferenciación, manteniéndose después estables (Figura RII.9 d, g). El análisis de secuenciación de célula única que se muestra en el panel h de la figura RII.8 reveló que todas las ubiquitina ligasas estudiadas presentan niveles de expresión homogéneos en las distintas poblaciones celulares.

En base a los trabajos previos que describen a MDM2 como la principal moduladora de los niveles de p53^{180, 181}, y a los resultados obtenidos en el análisis del resto de ubiquitina ligasas, decidimos centrarnos en el papel de MDM2 y su interacción con p53 en el desarrollo y la homeostasis del epitelio respiratorio.

La modulación de los niveles de p53 y MDM2 afecta a la diferenciación de las células basales de las vías respiratorias

1. Silenciamiento de p53

Con el fin de estudiar el papel de p53 en la diferenciación de las células que componen el epitelio de las vías respiratorias, comenzamos silenciando la expresión de esta proteína en cultivos primarios indiferenciados. Mediante transducción lentiviral, generamos cultivos que contenían secuencias de ARN de interferencia (*Short Hairpin RNA*) para p53 (sh-p53), y utilizamos como control el ARN de interferencia frente a la proteína Luciferasa (Luc). Empleamos tres secuencias distintas para el silenciamiento de p53, que infectamos de forma combinada para maximizar así el efecto del *knock down*. Para monitorizar la eficiencia de la infección, los vectores lentivirales utilizados contenían la secuencia codificante para la proteína roja fluorescente mCherry. Tras la transducción y la selección de las células progenitoras, analizamos los niveles de expresión de p53 mediante *western blot* y qPCR. Además, para comprobar si el silenciamiento de p53 se mantiene durante todo el proceso de diferenciación, analizamos mediante qPCR los niveles de esta proteína al final de este proceso, en ALI 14. Por último, realizamos una inmunofluorescencia para la proteína reportera mCherry, cuya expresión nos indica la integración estable de la construcción.

Como podemos observar en el panel a de la figura RII.10, los niveles de expresión de p53 se ven notablemente reducidos en las células con ARN de interferencia para esta proteína, cuando se compararon con el control frente a Luciferasa. La cuantificación de este *western blot* reflejó una disminución de más del 80% de la expresión 96h después de la transducción (Figura RII.10 b). El análisis de transcritos realizado mediante qPCR también mostró un notable descenso del ARN mensajero de p53 una vez finalizado el proceso de diferenciación (Figura RII.10 c). Además, mediante la inmunofluorescencia para la proteína mCherry comprobamos que la gran mayoría de las células habían incorporado la secuencia lentiviral, y seguían expresando mCherry tras el proceso de diferenciación (Figura RII.10 d, e). Estos resultados demuestran que las secuencias de

ARN de interferencia utilizadas provocan un descenso significativo de p53, y que este descenso se mantiene a lo largo de la diferenciación.

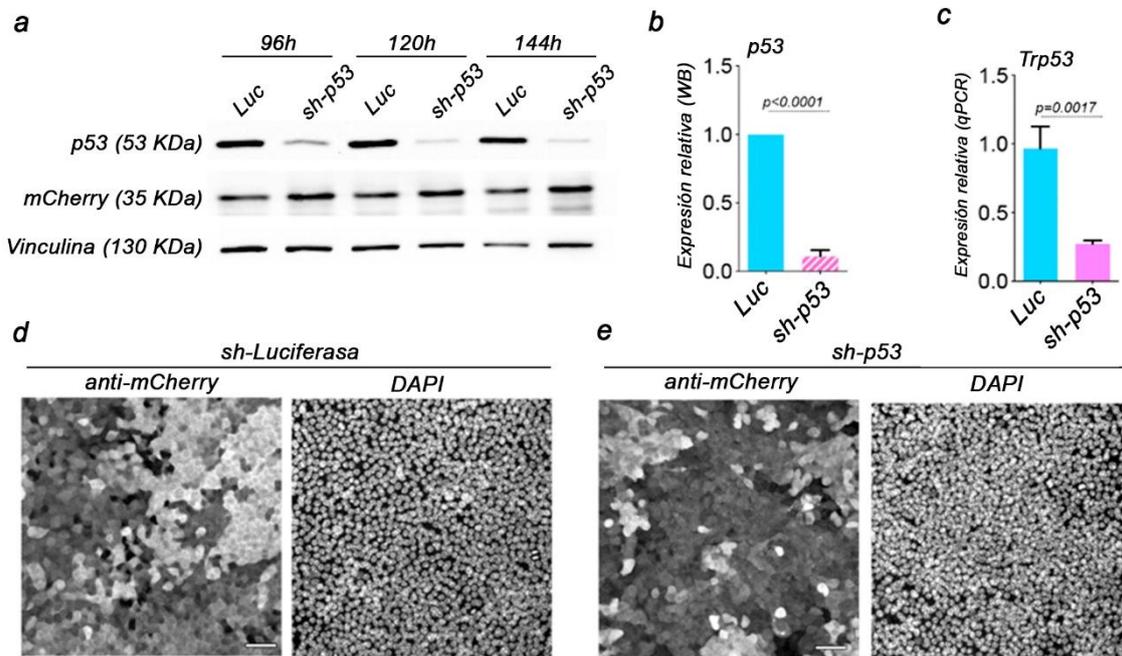


Figura RII.10: Expresión de p53 tras el silenciamiento mediante ARN de interferencia. a, Imágenes de *western blot* de las proteínas p53, mCherry y Vinculina obtenidas 96h, 120h y 144h después de la transducción lentiviral con secuencias de ARN de interferencia frente a p53 y Luciferasa (control). b, cuantificación del *western blot* 96h después de la infección. Se utilizó vinculina como control de carga. c, niveles de ARN mensajero analizados mediante qPCR. Se utilizó la expresión de *Eif1a* para normalizar los niveles de expresión n=6. En los paneles inferiores se muestran las imágenes de fluorescencia para mCherry y DAPI (núcleos) de células diferenciadas con el ARN de interferencia para Luciferasa (d) y para p53 (e). Las columnas en b y c representan la media, y las barras de error representan la desviación estándar para cada condición. La barra de escala en d y e representa 40μm.

Una vez validada la estrategia de silenciamiento de p53, decidimos analizar si la disminución de la expresión de esta proteína afecta al proceso de diferenciación de las células basales de las vías respiratorias. Para ello, analizamos mediante qPCR los niveles de transcritos de los distintos marcadores poblacionales tras la diferenciación de células infectadas con ARN de interferencia frente a p53 en comparación con nuestro control. Además, realizamos marcajes de inmunofluorescencia para cuantificar la abundancia relativa de cada uno de los tipos celulares tras la diferenciación.

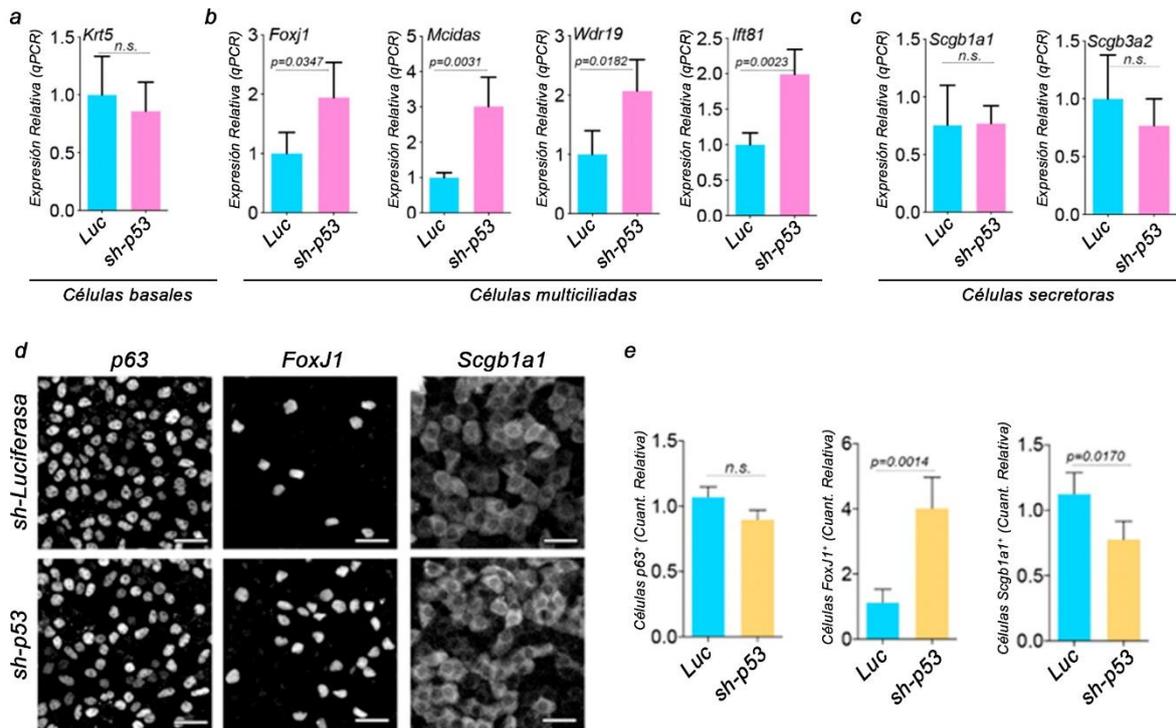


Figura RII.11: Abundancia relativa de las poblaciones celulares del epitelio respiratorio en cultivos silenciados para p53. a-c, niveles de ARN mensajero analizados mediante qPCR. Se analizaron los marcadores *Krt5* para células basales (a), *Foxj1*, *Mcidas*, *Wdr19* e *Ift81* para células multiciliadas (b), y *Scgb1a1* y *Scgb3a2* para células secretoras (c). Se utilizó la expresión de *Eif1a* para normalizar los niveles de expresión, n=6. d, Imágenes de inmunofluorescencia de los marcadores para células basales (p63), multiciliadas (FOXJ1) y secretoras (SCGB1A1) en cultivos diferenciados silenciados para Luciferasa (control) y p53. e, cuantificación de la abundancia relativa de células basales, multiciliadas y secretoras en imágenes de microscopía confocal. Las columnas en a-c y e representan la media, y las barras de error representan la desviación estándar para cada condición. Las cuantificaciones se hicieron relativas a las condiciones control (sh-Luciferasa, Luc). La barra de escala en d representa 20µm.

Los resultados del análisis de transcritos por qPCR se muestran en los paneles superiores de la figura RII.11. Como podemos observar en el panel a, el análisis de *Krt5* no mostró diferencias significativas en la población de células basales. Este resultado se confirmó mediante la cuantificación de las imágenes de inmunofluorescencia de células positivas para p63 (Figura RII.11 d, e). En lo relativo a las células multiciliadas, el silenciamiento de p53 provocó un claro incremento en los marcadores analizados (Figura RII.11 b). Se observó un incremento en los factores de transcripción *Foxj1* y *Mcidas*, que se expresan de forma temprana en la diferenciación de células multiciliadas. Además, el análisis de transcritos de proteínas estructurales del cilio como WRD19 e IFT81, que se expresan en las últimas etapas de la diferenciación, también mostró un incremento en condiciones de silenciamiento de p53. La cuantificación de las inmunofluorescencias de FOXJ1 confirmó este incremento de células multiciliadas en las células sh-p53 (Figura RII.11 d, e). Por último, el análisis de las células secretoras mediante qPCR para *Scgb1a1* y *Scgb3a2*, que se muestra en el panel c de la figura RII.10,

no reveló cambios significativos en esta población celular, algo que sí se observó en la cuantificación de las imágenes de inmunofluorescencia, cuyos resultados mostraron un leve descenso en la abundancia relativa de esta población (Figura RII.11 d, e).

Los resultados obtenidos en este apartado sugieren que p53 juega un importante papel en el mantenimiento del balance de las poblaciones celulares que componen las vías respiratorias. Concretamente, p53 actuaría reprimiendo la diferenciación de células basales hacia células multiciliadas.

2. Silenciamiento de MDM2

Una vez comprobado que el silenciamiento de p53 afecta al balance de las poblaciones celulares, provocando un incremento en el número de células multiciliadas, decidimos estudiar si su regulación por la ubiquitina ligasa MDM2 está también implicada en este proceso. Para abordar esta cuestión, utilizamos la misma aproximación que en el caso de p53, desarrollando vectores lentivirales que contenían secuencias de ARN de interferencia para *Mdm2*, promoviendo así su silenciamiento. Comenzamos comprobando los niveles de expresión relativa de *Mdm2* en comparación las células control mediante *Western Blot* en cultivos indiferenciados.

Los resultados de *western blot* que se muestran en el panel a de la figura RII.12 revelaron un claro descenso de MDM2 en células basales 96h y 144h después de la transducción del vector lentiviral. A continuación, las células progenitoras fueron diferenciadas y, tras 14 días, se comprobaron los niveles de expresión de *Mdm2* mediante qPCR, mostrando también un descenso significativo de esta proteína en cultivos diferenciados (Figura RII.12 b).

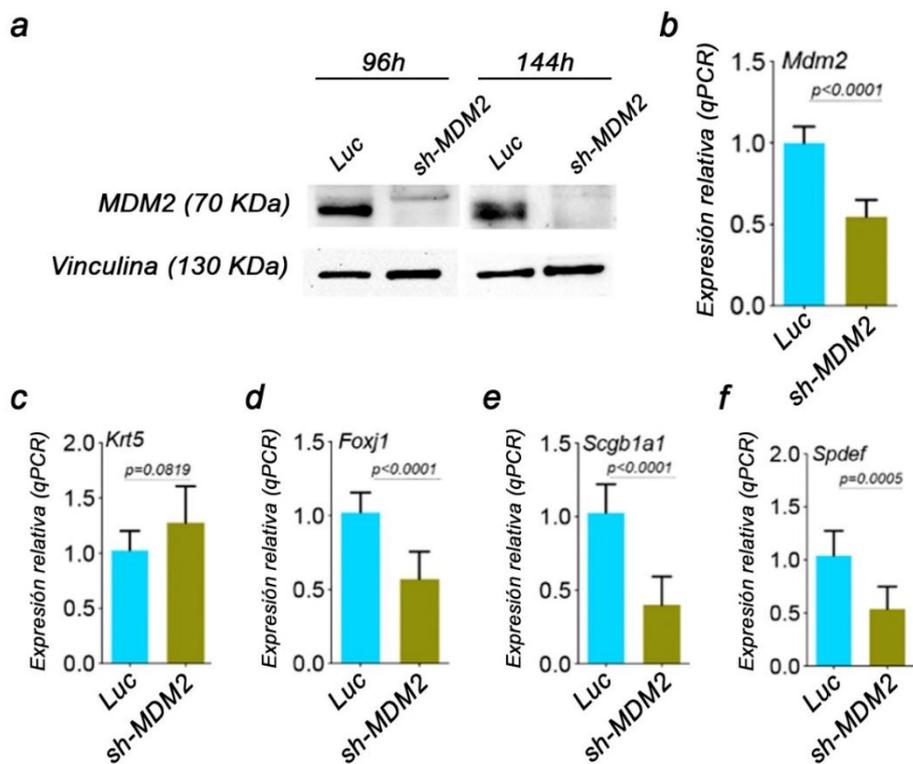


Figura RII.12: Efecto del silenciamiento de MDM2 en la abundancia relativa de las poblaciones celulares del epitelio respiratorio. a, Imágenes de *western blot* de las proteínas MDM2 y Vinculina obtenidas 96h y 144h después de la transducción lentiviral con secuencias de ARN de interferencia frente a MDM2 y Luciferasa (control). b, cuantificación del *western blot* de MDM2 96h después de la infección. Se utilizó vinculina como control de carga, n=8. c-f, niveles de ARN mensajero de los marcadores de células basales (c), multiciliadas (d), clara (e) y caliciformes (f) analizados mediante qPCR. Se utilizó la expresión de *Eif1a* para normalizar los niveles de expresión n=8. Las columnas en b-f representan la media, y las barras de error representan la desviación estándar para cada condición.

Tras verificar el silenciamiento de MDM2 en las células diferenciadas, procedimos a analizar los marcadores de las distintas poblaciones celulares del epitelio respiratorio. En esta ocasión, como observamos en el panel d de la figura RII.12, encontramos un claro descenso en la población de células multiciliadas en las células sh-MDM2. En lo relativo a las células secretoras, las poblaciones de células club y caliciformes se vieron afectadas por el silenciamiento de MDM2, reduciéndose significativamente los niveles de expresión de *Scgb1a1* y *Spdef* (Figura RII.12 e, f). Por último, las células basales no se vieron afectadas de forma significativa (Figura RII.12 c).

Puesto que MDM2 promueve la degradación de p53, el descenso de células multiciliadas obtenido en este experimento se correlacionan con los resultados obtenidos en el silenciamiento de p53. Estos resultados sugieren que la degradación de p53 mediada por MDM2 podría ser clave en la diferenciación de las células multiciliadas. Además, MDM2 también podría desempeñar un papel relevante en la diferenciación de las células secretoras en el epitelio de las vías respiratorias.

3. Sobreexpresión de p53 WT y p53 R175H

Además de la regulación de los niveles de p53 mediada por las ubiquitina ligasas, la actividad transcripcional de p53 puede verse afectada por mutaciones en la secuencia del gen *Trp53*, concretamente, en su dominio de unión a ADN¹⁸². En base a esto, nos preguntamos si p53 ejerce su función en el desarrollo de las células que componen el epitelio respiratorio a través de su actividad transcripcional. Para resolver esta cuestión, decidimos sobreexpresar p53 en células progenitoras mediante transducción lentiviral. Además, de forma paralela sobreexpresamos una forma mutada de p53 (p53 R175H), cuya capacidad de generar respuesta transcripcional se encuentra alterada¹⁸³. Ambas construcciones contenían una etiqueta para su detección por inmunomarcaje o *western blot* denominada V5, que utilizamos para confirmar su expresión (Figura RII.13 a). Una vez confirmada la presencia de las construcciones V5-p53 WT y V5-p53 R175H en las células en expansión, éstas fueron diferenciadas para comprobar los niveles de expresión de los distintos marcadores de poblaciones celulares del epitelio respiratorio.

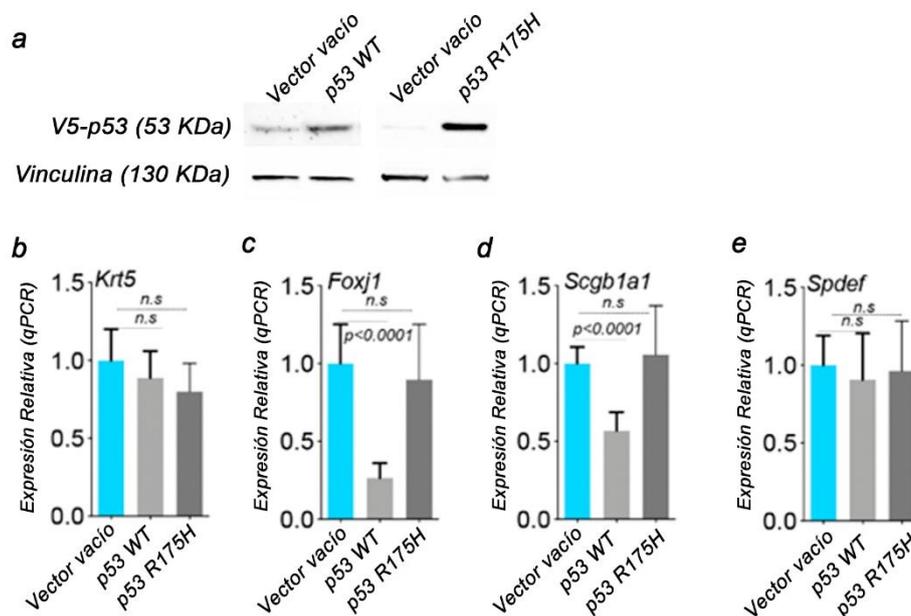


Figura RII.13: Análisis de la sobreexpresión de p53 WT y p53 R175H en las poblaciones celulares del epitelio respiratorio. a, Imágenes de *western blot* de la etiqueta V5 para detectar las construcciones V5-p53 WT y V5-p53 R175H en cultivos celulares en expansión. Se utilizó vinculina como control de carga. b-e, niveles de ARN mensajero de los marcadores de células basales (b), multiciliadas (c), clara (d) y caliciformes (e) analizados mediante qPCR. Se utilizó la expresión de *Eif1a* para normalizar los niveles de expresión n=6. Las columnas en b-e representan la media, y las barras de error representan la desviación estándar para cada condición.

Tras los 14 días de diferenciación, se comprobó mediante qPCR que la sobreexpresión de p53 WT provocó la disminución de los niveles de células multiciliadas (*Foxj1*, Figura RII.13 c), y células club (*Scgb1a1*, Figura RII.13 d). Por el contrario, las células caliciformes y basales no se vieron afectadas en los cultivos que sobreexpresaban p53 WT (Figura RII.13 b, e). Los resultados obtenidos en los cultivos que expresaban la construcción p53 R175H, en cambio, no mostraron diferencias significativas en la composición del del epitelio pseudoestratificado cuando se analizaron los marcadores mediante qPCR (Figura RII.13 b-e).

Como esperábamos, el fenotipo provocado por la sobreexpresión de p53 fue similar al del silenciamiento de MDM2 (excepto en el caso del marcador de células caliciformes *Spdef*). Además, el resultado obtenido en las células que expresaban la forma mutada p53 R175H indica que p53 regula el balance de las poblaciones en la diferenciación del epitelio respiratorio a través de su función transcripcional.

En base a estos datos, que indican una importante actividad transcripcional de p53 en las primeras etapas de la diferenciación, cabría esperar que los niveles de expresión de las dianas transcripcionales de p53 se viesen modificados en este proceso. Teniendo en cuenta los resultados de un metaestudio que identificó más de 350 dianas transcripcionales de p53¹⁸⁴, decimos analizar la expresión de estos genes a lo largo del proceso de diferenciación en nuestro sistema de cultivo. Para ello utilizamos los datos de secuenciación masiva de transcritos que fueron obtenidos al inicio de este proyecto, y comprobamos los niveles de expresión de las dianas publicadas en el metaestudio.

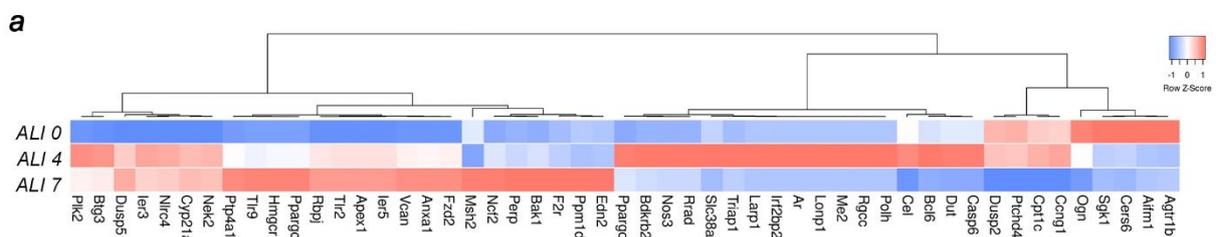


Figura RII.14: Niveles de expresión de las dianas transcripcionales de p53 durante la diferenciación *in vitro* del epitelio respiratorio. Representación en forma de mapa de calor de la expresión de las dianas transcripcionales de p53 que duplican o reducen a la mitad su expresión entre ALI 0 y ALI 7. Los datos de expresión génica se normalizaron usando su expresión promedio.

Este análisis reveló que alrededor del 15% de las dianas estudiadas doblaban o reducían a la mitad sus niveles de expresión. En la figura RII.14 se representan los genes cuya expresión se vio incrementada a el doble o reducida a la mitad entre los días 0 y 7 de diferenciación.

Los resultados obtenidos hasta el momento revelaron un enriquecimiento de MDM2 en las células multiciliadas a lo largo de la diferenciación celular, y un claro incremento de esta población en condiciones de silenciamiento de p53. Además, la sobreexpresión de p53 y el silenciamiento de MDM2 provocó un descenso significativo de la población de células multiciliadas en el cultivo in vitro del epitelio respiratorio. En su conjunto, todos estos resultados indican que para la correcta diferenciación de las células multiciliadas es necesaria una disminución de los niveles de p53, que estaría mediada por la ubiquitina ligasa MDM2. En base a estos hallazgos, nuestra hipótesis es que la interacción entre MDM2 y p53 juega un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis y la diferenciación de las poblaciones celulares, especialmente de las células multiciliadas. Para profundizar en los mecanismos moleculares regulados por la interacción entre ambas proteínas, en los siguientes experimentos modulamos farmacológicamente dicha interacción, y analizamos su implicación en la diferenciación de las células progenitoras.

MDM2 regula los niveles de p53 durante la diferenciación

Para estudiar la regulación que MDM2 ejerce sobre p53, y su implicación en la diferenciación de las células progenitoras, utilizamos dos inhibidores que bloquean la interacción MDM2/p53, y cuyo mecanismo molecular está ampliamente definido: Nutlin3a y AMG232^{185, 186}. Ambos inhibidores son moléculas pequeñas y altamente selectivas que bloquean el sitio de unión para p53 en MDM2, impidiendo la ubiquitinación y estabilizando p53.

Comenzamos comprobando si el bloqueo de la interacción MDM2/p53 afecta a los niveles de p53 y MDM2 en nuestros cultivos primarios diferenciados. Para ello, realizamos un tratamiento con Nutlin3a durante todo el proceso de diferenciación, analizando después los niveles de p53 y MDM2 mediante *western blot*. Este tratamiento

se llevó a cabo también en cultivos silenciados para p53, con el fin de analizar si la inhibición de MDM2 era suficiente para reestablecer los niveles de p53 en estas células.

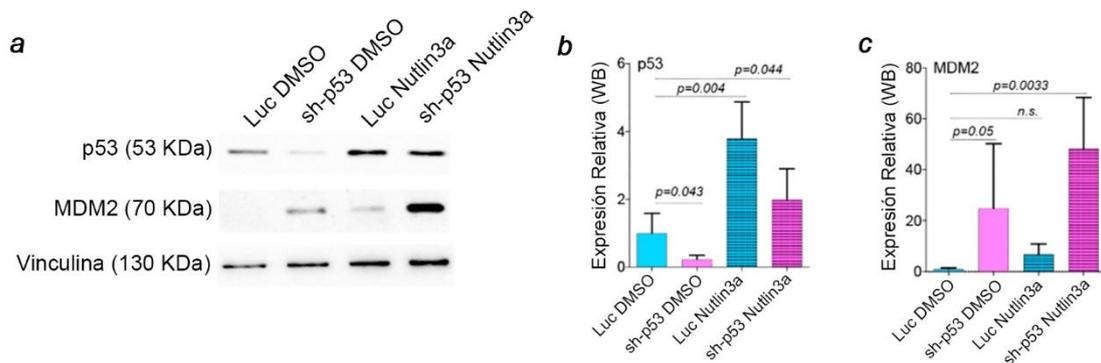


Figura RII.15: Niveles de expresión de p53 y MDM2 tras el tratamiento con Nutlin3a durante la diferenciación *in vitro* del epitelio respiratorio. a, Imágenes de *western blot* de las proteínas p53, MDM2 y Vinculina obtenidas tras la diferenciación en presencia de Nutlin3a o DMSO en cultivos control (Luc) o silenciados para p53. b, c, cuantificación de los *western blots*. Se utilizó vinculina como control de carga, n=8. Las columnas en b y c representan la media, y las barras de error representan la desviación estándar para cada condición. Las cuantificaciones se hicieron relativas al cultivo control (Luc) tratado con DMSO.

Tal y como se observa en el panel a de la figura RII.15, el tratamiento con Nutlin3a incrementó notablemente los niveles de p53 en las células control (Luc Nutlin3a), cuando se compararon con las células no tratadas (Luc DMSO). Este resultado también lo observamos en las células defectivas para p53, cuyos niveles se incrementaron superando incluso los de las células control no tratadas. En la cuantificación de los *western blots* que se muestra en el panel b de la figura RII.15 se puede observar el nivel de significancia de las distintas condiciones experimentales. En cuanto a MDM2, el silenciamiento de p53 provocó un aumento significativo en los niveles de esta proteína (Figura RII.15 a, c), efecto que se vio incrementado en el tratamiento con Nutlin3a. Estos resultados nos indican que, en general, el tratamiento con el inhibidor de MDM2 Nutlin3a provocó un incremento significativo de los niveles de p53.

Además de analizar los niveles de p53 y MDM2 mediante *western blot* tras el tratamiento con Nutlin3a, decidimos comprobar si el bloqueo de la interacción MDM2/p53 altera la expresión de los miembros de la familia de p53.

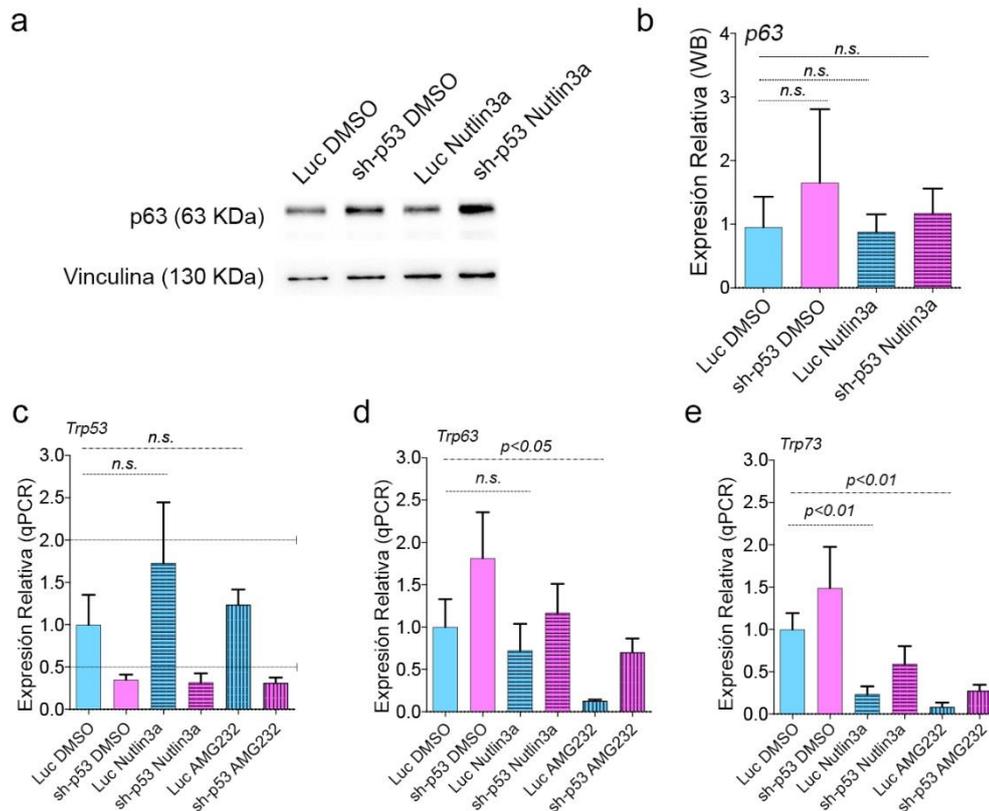


Figura RII.16: Análisis de la expresión de los miembros de la familia de p53 tras el tratamiento con Nutlin3a. a, Imágenes de *western blot* de las proteínas p63 y Vinculina obtenidas de cultivos diferenciados *in vitro* y tratados con Nutlin3a y DMSO (control). Se utilizó vinculina como control de carga. b, cuantificación de los *western blots* de p63, n=6. c-e niveles de ARN mensajero de los miembros de la familia de p53: *Trp53* (c), *Trp63* (d) y *Trp73* (e) analizados mediante qPCR. Se utilizó la expresión de *Eif1a* para normalizar los niveles de expresión n=6. Las cuantificaciones se hicieron relativas al cultivo control (Luc) tratado con DMSO. Las columnas en b-e representan la media, y las barras de error representan la desviación estándar para cada condición.

Tras analizar y cuantificar los niveles de proteínas de p63, no encontramos diferencias significativas entre las células tratadas con Nutlin3a (Figura RII.16 a, b). Los resultados para *Trp63*, en cambio, sí mostraron un descenso significativo de la expresión en células tratadas con AMG232, además, el silenciamiento de p53 provocó un incremento en los niveles de *Trp63* en todos tratamientos, como se observa en el panel d de la figura RII.16. En el caso de *Trp53*, el tratamiento con Nutlin3a y AMG232 no alteró de forma significativa los niveles de ARNm (Figura RII.16 c). Este resultado confirmaría que el aumento de p53 observado en el *western blot* en las células tratadas con Nutlin3a (Figura RII.15 a) se debe al incremento en la estabilidad de p53 tras la inhibición de MDM2. Por último, los niveles de ARNm de *Trp73* se vieron reducidos tras el tratamiento con Nutlin3a y AMG232 (Figura RII.16 e). Cabe destacar que los niveles de *Trp73* fueron superiores en las muestras con ARN de interferencia frente a p53 en todos los casos.

Este aumento de *Trp73*, que como hemos abordado en la introducción media la diferenciación de las células multiciliadas, se corresponde con el incremento de esta población celular que ya observamos en el análisis de marcadores RII.11.

Estos resultados refuerzan la idea de que la regulación que MDM2 ejerce sobre p53 altera los patrones de expresión de las células epiteliales del sistema respiratorio, lo que podría afectar a la distribución de las distintas poblaciones celulares que componen dicho epitelio.

La regulación de MDM2 sobre p53 promueve la diferenciación celular en el sistema respiratorio murino

Tras confirmar que el tratamiento con los inhibidores de MDM2 incrementa los niveles de p53 en nuestro sistema de cultivo, comprobamos si este incremento es suficiente para modificar el balance de poblaciones celulares en el epitelio respiratorio. Para estudiar el efecto de la inhibición de la interacción MDM2/p53 comenzamos analizando mediante qPCR los marcadores específicos de poblaciones en cultivos tratados con Nutlin3a y AMG232 durante el proceso de diferenciación. Utilizamos *Krt5* para células basales, *Foxj1* como marcador de células multiciliadas, *Scgb1a1* para marcar células Clara y el gen *Spdef* para las células caliciformes o *Goblet cells*.

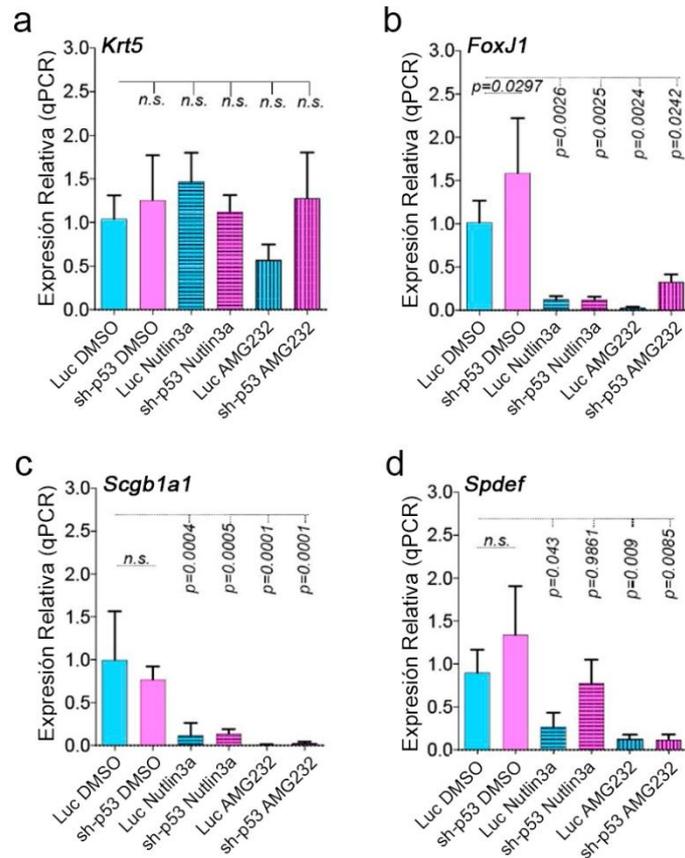


Figura RII.17: Análisis de los marcadores de poblaciones celulares del epitelio respiratorio tras la inhibición de MDM2. a-d, niveles de ARN mensajero analizados mediante qPCR. Se analizaron los marcadores *Krt5* para células basales (a), *Foxj1*, para células multiciliadas (b), *Scgb1a1* para células clara (c) y *Spdef* para células caliciformes (d). Se utilizó la expresión de *Eif1a* para normalizar los niveles de expresión, n=12. Las columnas representan la media, y las barras de error representan la desviación estándar para cada condición. Las cuantificaciones se hicieron relativas a las condiciones control (Luc DMSO).

Como se observa en el panel a de la figura RII.17, la inhibición de MDM2 no alteró de forma significativa la abundancia relativa de células basales, atendiendo al marcador *Krt5*. Como hemos descrito anteriormente, el silenciamiento de p53 incrementa la abundancia de células multiciliadas, lo que podemos comprobar en el análisis de ARNm de *Foxj1* (Figura RII.17 b). El tratamiento con Nutlin3a y AMG232, en cambio, provocó un notable descenso en la población de células multiciliadas, tanto en el control (Luc) como en las células silenciadas para p53. Los cultivos tratados con Nutlin3a y AMG232 también mostraron un drástico descenso en la población de células secretoras, tanto en condiciones de silenciamiento de p53 como en condiciones silvestres (Figura RII.17 c, d). Este efecto fue más acusado en el caso de la subpoblación de células Clara (Figura RII.17 c), mientras que, al analizar las células caliciformes, comprobamos que el silenciamiento de p53 revirtió el descenso de esta población en los cultivos tratados con Nutlin3a (Figura RII.17 d).

Estos resultados, obtenidos mediante qPCR tras el tratamiento con Nutlin3a y AMG232 durante el proceso de diferenciación, fueron además confirmados mediante inmunofluorescencia en nuestros cultivos primarios diferenciados. Para ello empleamos anticuerpos frente a p63 para marcar células basales, FOXJ1 para células multiciliadas y SCGB1A1 y MUC5A/C como marcador de células secretoras.

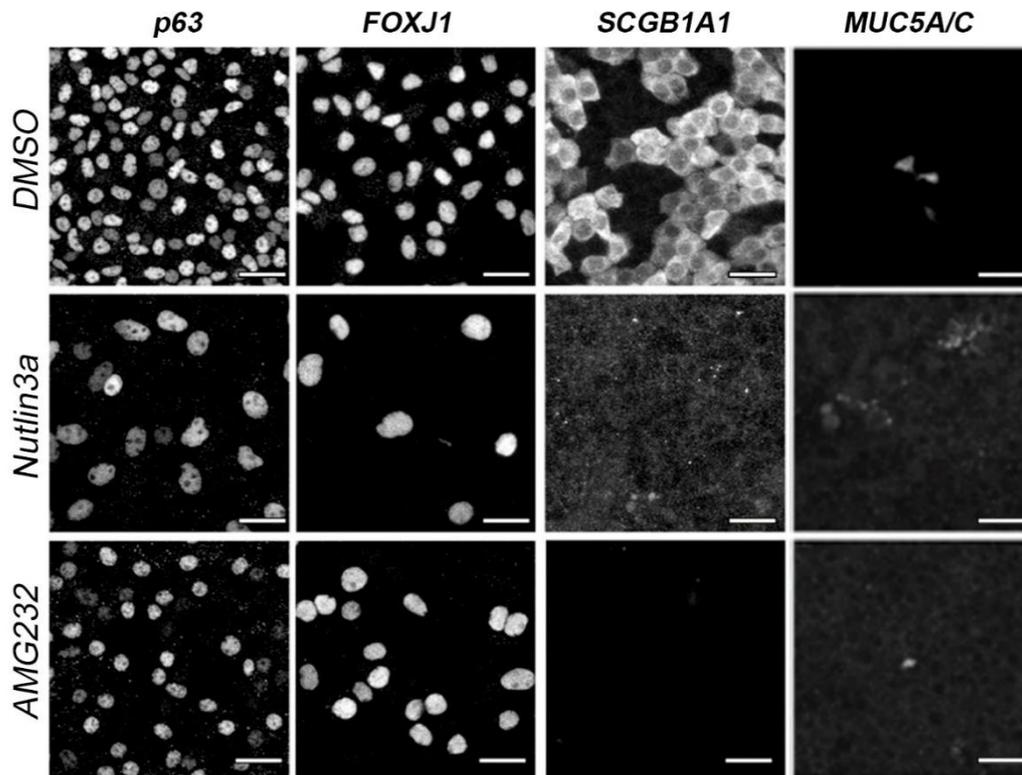


Figura RII.18: Análisis de inmunofluorescencia de las poblaciones celulares del epitelio respiratorio tras la inhibición de MDM2. Imágenes de microscopía confocal de los marcadores para células basales (p63), multiciliadas (FOXJ1), secretoras (SCGB1A1) y caliciformes (MUC5A/C) en cultivos diferenciados en presencia de DMSO, Nutlin3a y AMG232. Las barras de escala representan 20µm.

Los resultados que se muestran en la figura RII.18 se correlacionan con los obtenidos mediante qPCR, confirmando un acusado descenso en las poblaciones de células multiciliadas y secretoras en los cultivos tratados con Nutlin3a y AMG232. En el caso del marcador MUC5A/C, los bajos niveles en los cultivos no tratadas dificultan la interpretación del efecto de los inhibidores. En el caso de las células basales, y a diferencia de los resultados obtenidos por qPCR, las imágenes de inmunofluorescencia sí mostraron una aparente reducción en la abundancia relativa de esta población, atendiendo a las células marcadas con p63 en los cultivos tratados con Nutlin3a y AMG232.

En suma, estos resultados sugieren que la regulación que la ubiquitina ligasa MDM2 ejerce sobre p53, promoviendo su degradación, es imprescindible para la correcta diferenciación de las células basales en células secretoras y multiciliadas. De esta forma, el bloqueo farmacológico de la interacción entre ambas proteínas provoca un acusado descenso en la proporción de células diferenciadas, efecto similar al que observamos en el caso del silenciamiento de MDM2 mostrado anteriormente.

p53 bloquea la diferenciación de las células multiciliadas

Como hemos descrito en la introducción, estudios previos de seguimiento de linajes celulares a partir de cultivos de tráquea de ratón mostraron que las células basales *Krt5⁺* se pueden diferenciar inicialmente en células secretoras (concretamente en células Clara), y que éstas a su vez actúan como progenitoras de células multiciliadas, en una lenta transición que comprende cambios en los patrones de expresión génica, en los que la ruta de Notch juega un papel central¹²⁰. Se ha demostrado también que las células basales mantienen, a través de la continua secreción de ligandos de la ruta de Notch, el balance entre ambas poblaciones celulares. Concretamente, las células basales presentan altos niveles de expresión y secreción del ligando Jag 2, mientras que las células secretoras contienen en su membrana una gran cantidad de receptores Notch 1 y Notch 2¹²⁶. Esta regulación puede ser modulada mediante la inhibición farmacológica de la ruta, utilizando inhibidores como DAPT, que promueven la diferenciación de las células multiciliadas¹⁸⁷.

Con el fin de comprobar si el bloqueo de la regulación que MDM2 ejerce sobre p53 es suficiente para revertir el incremento de células multiciliadas que se produce tras el tratamiento con DAPT, combinamos en un experimento el tratamiento con este inhibidor de la ruta de Notch y los inhibidores de MDM2. Las células fueron tratadas durante todo el proceso de diferenciación, y una vez finalizado, se analizaron por qPCR los marcadores de las distintas poblaciones celulares.

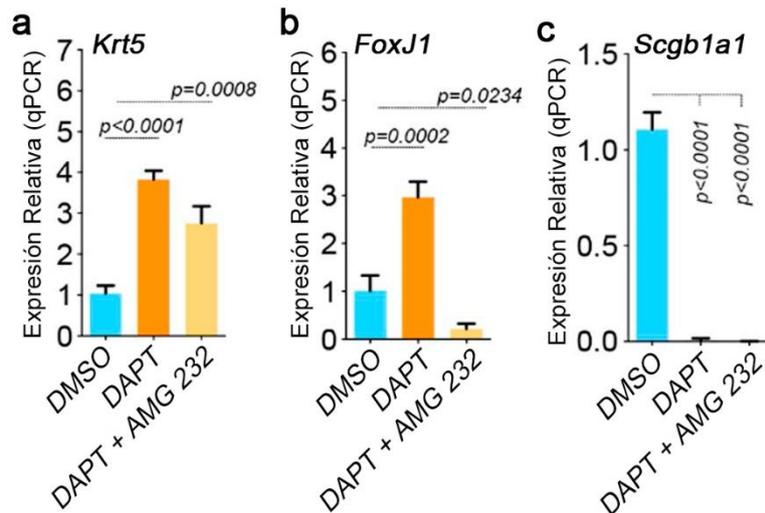


Figura RII.19: Análisis de las poblaciones celulares del epitelio respiratorio tras el tratamiento con DAPT y AMG232. a-c, niveles de ARN mensajero analizados mediante qPCR. Se analizaron los marcadores *Krt5* para células basales (a), *Foxj1*, para células multiciliadas (b) y *Scgb1a1* para células secretoras. Se utilizó la expresión de *Eif1a* para normalizar los niveles de expresión, n=8. Las columnas representan la media, y las barras de error representan la desviación estándar para cada condición. Las cuantificaciones se hicieron relativas a las condiciones control (DMSO).

En la figura RII.19 podemos observar que, como se ha descrito anteriormente, el tratamiento con DAPT bloqueó la diferenciación de células secretoras (Figura RII.19 c), incrementando significativamente la población de células multiciliadas (Figura RII.19 b). Los cultivos tratados con DAPT también presentaron mayores niveles del marcador de células basales *Krt5* (Figura RII.19 a). En el tratamiento combinado de DAPT con AMG232, como cabría esperar, se mantuvo el descenso en la población de células secretoras, sin embargo, este descenso no se vio acompañado de un incremento en la población de células multiciliadas, conservándose el fenotipo observado para el tratamiento con AMG232 (Figura RII.19 b).

Los resultados obtenidos en este experimento confirmaron que la inhibición de MDM2, que provoca un incremento en los niveles de p53, es suficiente para bloquear directamente la diferenciación de células basales y secretoras en células multiciliadas.

El tratamiento con AMG 232 y Nutlin3a provoca defectos en la formación de los cilios

Pese a que los datos obtenidos mediante qPCR tras el tratamiento con AMG232 y Nutlin3a reflejan valores muy bajos en la expresión de *Foxj1*, los resultados obtenidos en el marcaje de inmunofluorescencia nos indicaron la presencia, aunque en baja proporción, de células multiciliadas en los cultivos tratados (Figura RII.18).

cortos en los cultivos tratados con Nutlin3a y AMG232, como se observa en el panel b de la figura RII.20. Tras analizar la frecuencia de batido de los cilios en las células tratadas con AMG232 encontramos una leve disminución de 1,6 batidas por segundo, diferencia que, sorprendentemente, no existía en las células tratadas con Nutlin3a en comparación con DMSO (Figura RII.20 c).

Los resultados obtenidos en este experimento demostraron que, pese a que algunas células consiguen diferenciarse en presencia de los inhibidores de MDM2, la interacción MDM2/p53 es esencial para el correcto desarrollo y funcionalidad de los cilios en las células epiteliales del sistema respiratorio.

La modulación de los niveles de p53 afecta a la densidad celular, pero no altera la integridad del epitelio respiratorio

Tras analizar detalladamente las imágenes de fluorescencia obtenidas de los marcajes de p63 y FOXJ1 en los cultivos tratados con AMG232 y Nutlin3a que se muestran en la figura RII.17, observamos que los núcleos de estas células eran de mayor tamaño que los del control (DMSO). Además, este mismo fenotipo fue previamente descrito en células de ratones con una copia extra de p53¹⁷², lo que podría indicar que los niveles de p53 modulan la densidad celular en el epitelio respiratorio. Para confirmar esta observación, cuantificamos el tamaño de los núcleos y el número de células por campo, para así compararlos con los de las células no tratadas.

En el marcaje de los núcleos (DAPI) que se muestra en el panel a de la figura RII.21, podemos observar que las células tratadas con AMG232 y Nutlin3a presentan núcleos de mayor tamaño. La cuantificación a partir de las imágenes obtenidas nos confirmó esta observación, revelando que los núcleos de las células tratadas tenían un tamaño mayor, y los campos cuantificados contenían menos células cuando fueron comparadas con la condición DMSO (Figura RII.21 b, c). El mismo análisis realizado en cultivos de células silenciadas para p53 no mostró diferencias significativas en la densidad ni el tamaño de los núcleos (Figura RII.21 a-c).

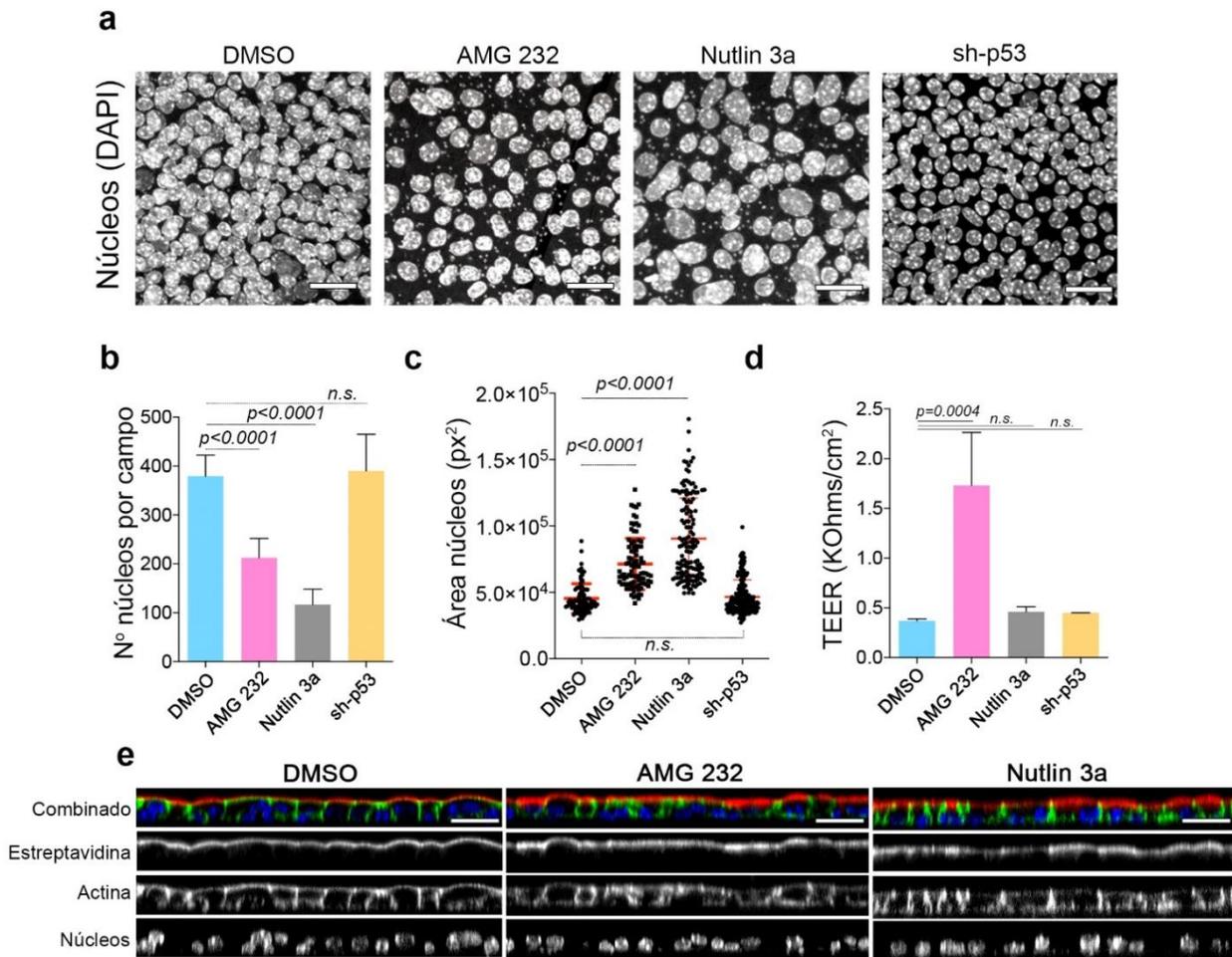


Figura RII.21: Análisis de la densidad celular y la integridad epitelial en cultivos tratados con AMG232 y Nutlin3a. a, Imágenes de microscopía confocal para el marcaje de los núcleos (DAPI) en células diferenciadas en presencia de DMSO (control), AMG232 y Nutlin3a. b, Cuantificación del número de núcleos por campo analizado en las distintas condiciones experimentales, $n=8$. c, Cuantificación del tamaño de los núcleos en células tratadas con DMSO, Nutlin3a y AMG232, $n>200$. d, resistencia eléctrica transepitelial (TEER) medida en ALI 14 en cultivos tratados con los inhibidores de MDM2 y silenciados para p53. Las columnas en b y d representan la media y las barras de error muestran la desviación estándar. Las barras de escala en a y e representan $20\mu\text{m}$.

Puesto que el epitelio pseudoestratificado que tapiza las vías respiratorias constituye una de las barreras fundamentales frente a patógenos y partículas inhaladas, es esencial que las células que lo conforman están íntimamente conectadas a través de uniones estrechas y desmosomas. Una vez confirmado que la inhibición de la interacción MDM2/p53 reduce a la densidad celular en nuestro sistema de cultivo, nos preguntamos si esta reducción comprometía la integridad del epitelio, alterando esta función de barrera.

Para comprobar la integridad de la monocapa celular, diseñamos un experimento en el que añadimos biotina soluble no permeable sobre la cara apical de cultivos vivos diferenciados en condiciones control y tratados con AMG232 y Nutlin3a.

Esta biotina, que reacciona con los dominios extracelulares de proteínas transmembrana, puede ser marcada después con estreptavidina fluorescente, de tal forma que, si las células se disponen en una monocapa confluyente y con las uniones estrechas establecidas, el marcaje con biotina-estreptavidina será solo detectable en la cara apical de esta monocapa. En cambio, si la integridad del epitelio pseudoestratificado se encuentra comprometida, la biotina soluble será detectada tanto en la cara apical como en la zona basolateral de las células.

Como se puede comprobar en el panel e de la figura RII.21, tanto en las células control (DMSO) como en las células tratadas con AMG232 y Nutlin3a durante el proceso de diferenciación, la biotina-estreptavidina es detectada únicamente en la cara apical de las células. Este resultado indica que la integridad del epitelio pseudoestratificado no se ve comprometida tras el bloqueo de la interacción MDM2/p53 con los inhibidores AMG232 y Nutlin3a.

Por último, para profundizar en el estudio de la integridad de la barrera epitelial, decidimos medir la resistencia eléctrica transepitelial (*Transepithelial Electrical Resistance, TEER*) en las mismas condiciones experimentales. Para ello empleamos dos electrodos, uno colocado en la cámara inferior del pocillo *transwell*, y otro en la cámara apical o superior, y posteriormente aplicamos una corriente eléctrica para comprobar la resistencia que ofrece el cultivo. Los resultados de resistencia transepitelial nos mostraron que las células tratadas con Nutlin3a o silenciadas para p53 no presentaban diferencias significativas al ser comparadas con las células control, sin embargo, el tratamiento con AMG232 durante la diferenciación provocó un incremento muy pronunciado de los valores de resistencia transepitelial (Figura RII.21 d).

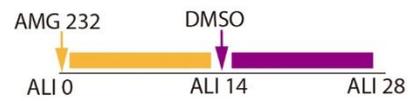
En su conjunto, los resultados obtenidos en estos experimentos nos confirman que el bloqueo de la interacción MDM2/p53 incrementa el tamaño de los núcleos y reduce la densidad celular del epitelio pseudoestratificado, sin afectar a la integridad de la barrera epitelial.

El fenotipo producido por la inhibición de la interacción MDM2/p53 se revierte tras la retirada del fármaco

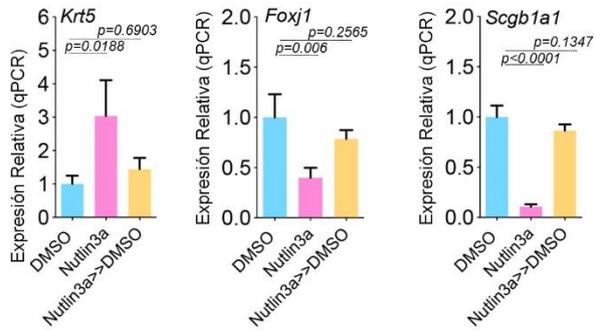
Una vez caracterizados los efectos de la inhibición farmacológica de la interacción MDM2/p53, nos preguntamos si el tratamiento con AMG232 y Nutlin3a provocaba cambios irreversibles en los cultivos del epitelio respiratorio o si, en cambio, tras la retirada de los fármacos las células concluían el proceso de diferenciación.

Para resolver esta pregunta, tratamos con AMG232, Nutlin3a o DMSO (control) cultivos celulares durante los primeros 14 días de diferenciación, y posteriormente retiramos los inhibidores en parte de los cultivos, manteniéndolos en otro grupo de réplicas experimentales (Figura RII.22 a). Las células fueron cultivadas durante otros 14 días, y posteriormente analizamos los marcadores de poblaciones mediante qPCR e inmunofluorescencia en todas las condiciones experimentales (DMSO durante 28 días, Nutlin3a/AMG232 durante 28 días y Nutlin3a/AMG232 14 días + DMSO 14 días).

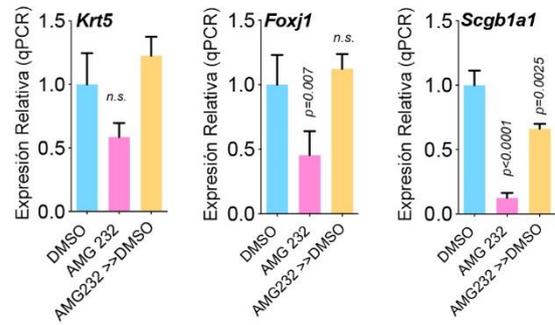
a *Reversión:*



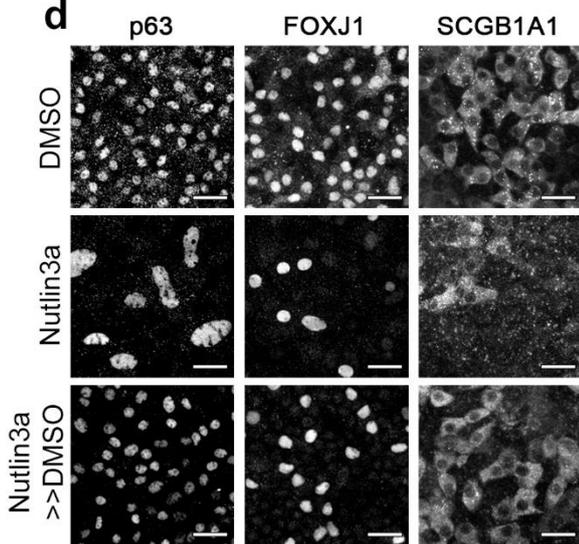
b



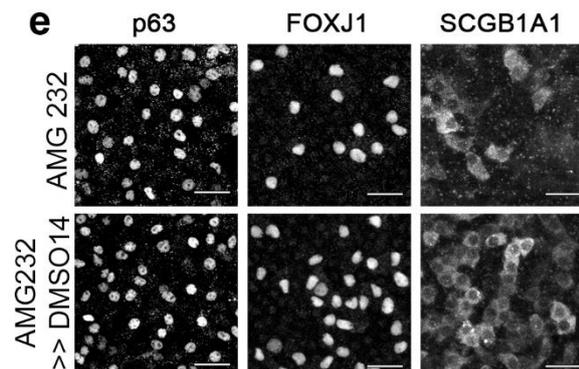
c



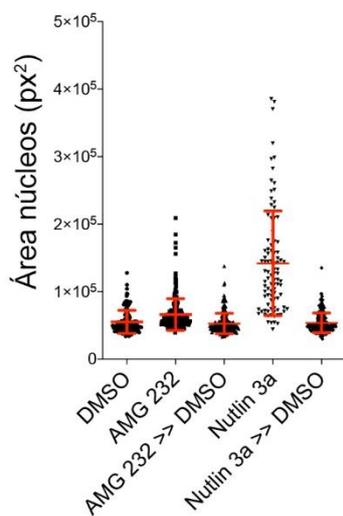
d



e



f



g

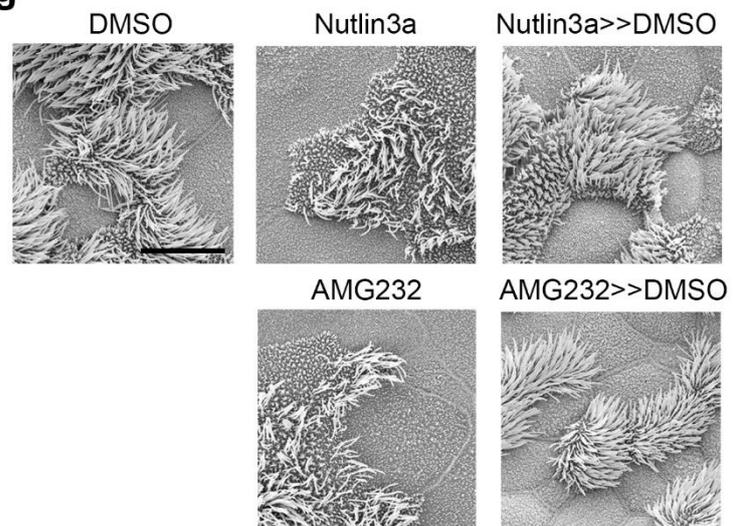


Figura RII.22: Estudio de la reversión del fenotipo provocado por la inhibición de MDM2. a, representación esquemática del tratamiento realizado para el análisis de la reversión del fenotipo. b, c, niveles de ARN mensajero analizados mediante qPCR de cultivos tratados con DMSO (control), Nutlin3a/AMG232 y Nutlin3a/AMG232-DMSO (14 días + 14 días). Se analizaron los marcadores *Krt5* para células basales, *Foxj1* para células multiciliadas, y *Scgb1a1* para células secretoras. Se utilizó la expresión de *Eif1a* para normalizar los niveles de expresión, n=8. Las columnas representan la media, y las barras de error representan la desviación estándar para cada condición. Las cuantificaciones se hicieron relativas a las condiciones control (DMSO). d, e, Imágenes de inmunofluorescencia de los marcadores para células basales (p63), multiciliadas (FOXJ1) y secretoras (SCGB1A1) en las condiciones experimentales indicadas. f, cuantificación del tamaño de los núcleos a partir de imágenes de los marcajes con DAPI. g, imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) para el análisis de la morfología de los cilios. La barra de escala en d, e representa 20µm y en g 15µm.

Los resultados obtenidos mediante qPCR que se muestran en los paneles b y c de la figura RII.22 reflejaron una recuperación completa de los niveles de expresión de los marcadores de poblaciones multiciliadas (*Foxj1*) y secretoras (*Scgb1a1*) cuando se retiraron los inhibidores. También se comprobó la recuperación de valores normales de células basales (*Krt5*) en comparación los cultivos a los que se les mantuvo el tratamiento tanto con Nutlin3a como con AMG232. Los datos de reversión del fenotipo analizados por qPCR fueron confirmados mediante los marcajes de inmunofluorescencia. Estos resultados se muestran en el panel d (Nutlin3a) y e (AMG232) de la figura RII.22, y reflejaron un incremento en las células FOXJ1+ y SCGB1A1+ en las células a las que se les retiró el inhibidor en comparación con los cultivos tratados con Nutlin3a o AMG232 durante 28 días.

En las imágenes de inmunofluorescencia para p63 se observa que los núcleos de las células a las que se les retiró el inhibidor parecían recuperar el tamaño normal (Figura RII.22 d), por lo que decidimos cuantificar el tamaño de los núcleos marcados con DAPI en nuestras condiciones experimentales. La cuantificación confirmó la presencia de núcleos de gran tamaño en los cultivos a los que se les mantuvo el tratamiento con los inhibidores de MDM2, pero no en aquellos a los que se les retiró la droga (Figura RII.22 f).

Por último, con el fin de determinar si la alteración morfológica observada en los cilios de las células diferenciadas en presencia de AMG232 y Nutlin3a también se revertía tras eliminar los fármacos, adquirimos imágenes de microscopía electrónica de barrido. En el panel g de la figura RII.22 podemos comprobar que, tanto en el caso del tratamiento inicial con AMG232 como con Nutlin3a, la retirada de la droga permitió que los cilios recuperasen la estructura, longitud y abundancia similares a las células tratadas con DMSO (control).

En suma, todos los resultados obtenidos en los experimentos de reversión confirman que los fenotipos provocados por la inhibición de la interacción MDM2/p53 durante el proceso de diferenciación son reversibles tras la retirada de la droga, y que las células retienen la capacidad de diferenciarse correctamente cuando MDM2 está activo.

La inhibición de la interacción MDM2/p53 no afecta a las células una vez diferenciadas

Una vez que confirmamos que el efecto del tratamiento con AMG232 y Nutlin3a durante la diferenciación celular se revierte tras la retirada de la droga, nos planteamos si los fenotipos obtenidos se reproducían cuando tratábamos células ya diferenciadas. Para resolver esta cuestión, diferenciamos nuestros cultivos primarios durante 14 días en ausencia de inhibidores, y una vez finalizado el proceso de diferenciación, añadimos Nutlin3a o DMSO a las células, manteniendo el tratamiento durante otros 14 días (ALI 28, como se muestra en el esquema de la figura RII.23 a).

El análisis mediante qPCR de los marcadores de poblaciones celulares no reflejó diferencias significativas en la abundancia de células basales, secretoras o ciliadas cuando las células fueron tratadas con Nutlin3a una vez diferenciadas (Figura RII.23 b). Al igual que en el experimento anterior, estos hallazgos fueron confirmados mediante marcajes de inmunofluorescencia de las poblaciones celulares, obteniendo resultados similares (Figura RII.23 c). Además, las imágenes de microscopía electrónica de barrido tampoco mostraron alteraciones morfológicas en los cilios de las células tratadas con Nutlin3a una vez diferenciadas (Figura RII.23 d). Por último, el análisis del tamaño de los núcleos sí reveló un ligero aumento en el tamaño de las células tratadas con Nutlin3a tras la diferenciación ($p < 0.01$), mientras que las medidas de resistencia transepitelial no mostraron cambios tras el tratamiento con este inhibidor (Figura RII.23 e, f).

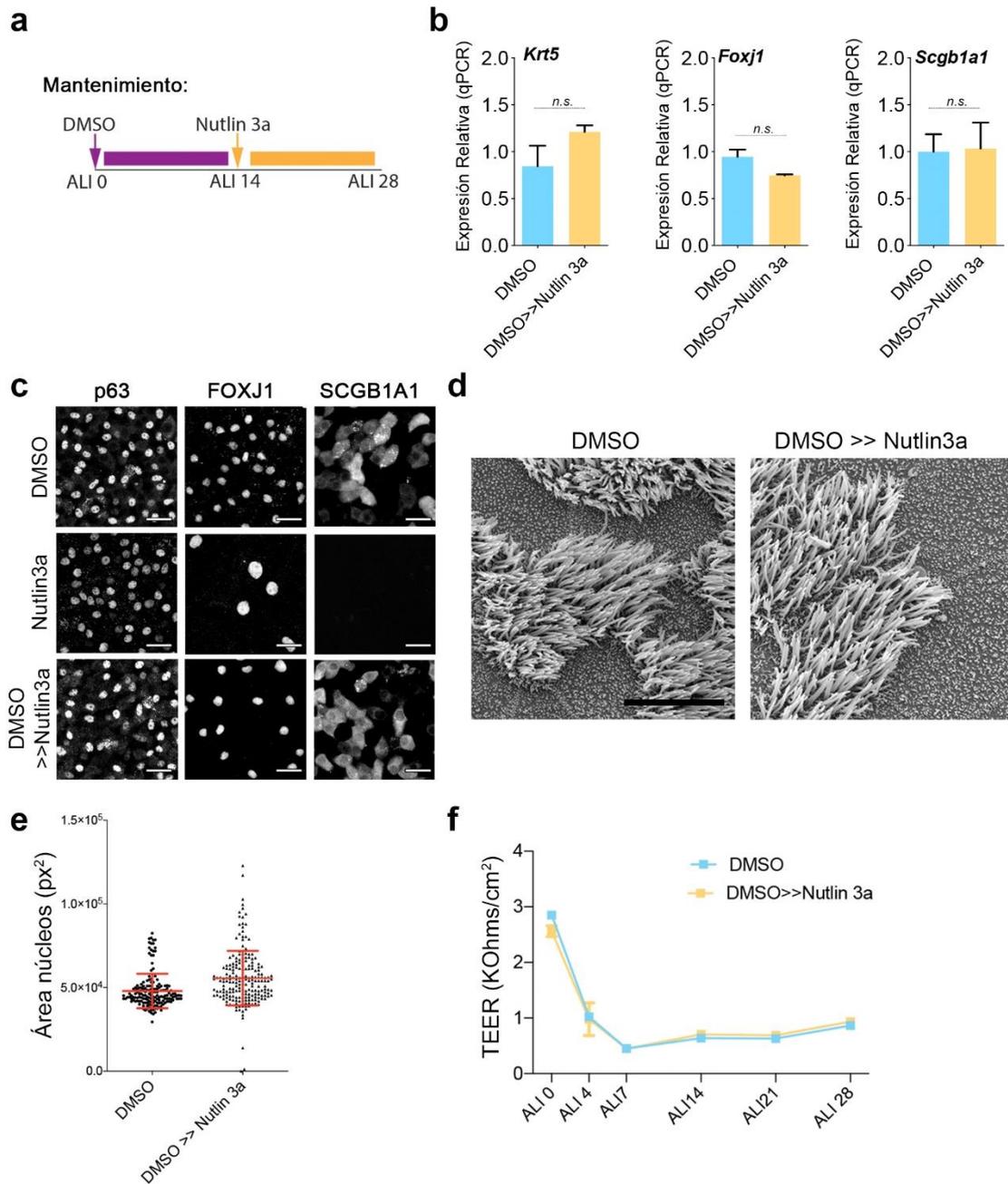


Figura RII.23: Análisis de fenotipos provocados por la inhibición de MDM2 tras la diferenciación del epitelio respiratorio. a, representación esquemática del tratamiento realizado. b, niveles de ARN mensajero analizados mediante qPCR de cultivos tratados con DMSO (control) y DMSO-Nutlin3a (14 días + 14 días). Se analizaron los marcadores *Krt5* para células basales, *Foxj1* para células multiciliadas, y *Scgb1a1* para células secretoras. Se utilizó la expresión de *Eif1a* para normalizar los niveles de expresión. Las columnas representan la media, y las barras de error representan la desviación estándar para cada condición. Las cuantificaciones se hicieron relativas a las condiciones control (DMSO), n=8. c, imágenes de inmunofluorescencia de los marcadores para células basales (p63), multiciliadas (FOXJ1) y secretoras (SCGB1A1) en las condiciones experimentales indicadas. d, imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) para el análisis de la morfología de los cilios. e, cuantificación del tamaño de los núcleos a partir de imágenes de los marcajes con DAPI. f, resistencia eléctrica transepitelial (TEER) medida a lo largo del tratamiento con Nutlin3a. La barra de escala en c representa 20 μ m y en f 15 μ m

Los resultados de estos experimentos mostraron que, una vez que las poblaciones celulares que componen el epitelio de las vías respiratorias se diferencian, la inhibición de la interacción entre MDM2 y p53 no provoca efectos significativos en el balance de estas poblaciones ni en la función de barrera del epitelio.

La interacción MDM2/p53 regula la proliferación de las células progenitoras de las vías respiratorias

Más allá del indiscutible papel de p53 como supresor tumoral, ampliamente estudiado, este regulador de la transcripción está directamente implicado en multitud de procesos como la progresión del ciclo celular, la apoptosis o la diferenciación celular¹⁶⁹. Concretamente, p53 se ha relacionado con la inhibición de la división de células progenitoras, promoviendo procesos de diferenciación celular¹⁸⁸.

Con el fin de estudiar la implicación de p53 en el estado proliferativo de las células basales de las vías respiratorias, decidimos utilizar cultivos silenciados para p53, así como el tratamiento con Nutlin3a para monitorizar el tiempo en el cual un número determinado de células se duplica, parámetro conocido como *doubling time*. Para ello, los cultivos primarios silenciados para p53 y Luciferasa (control), fueron mantenidos en presencia de Nutlin3a o DMSO durante al menos cuatro semanas, cuantificando el número de células colectadas en cada pase. En un experimento paralelo, comprobamos el *doubling time* en las células que sobreexpresaban las construcciones de V5-p53 *WT* y V5-p53 R157H, empleadas en esta tesis para comprobar el papel transcripcional de p53 en la diferenciación celular.

El resultado obtenido en el análisis de *doubling time* reflejó un incremento en el tiempo de duplicación de las células afectadas por el silenciamiento de p53, y un efecto más pronunciado en el tratamiento con Nutlin3a, tanto en las células silvestres como en las defectivas para p53 (Figura RII.24 a). Las células que sobreexpresaban las construcciones V5-p53 *WT* y V5-p53 R157H, en cambio, no mostraron diferencias significativas en el tiempo de duplicación en comparación con el control (vector vacío) (Figura RII. 24 b). Estos resultados sugieren que la acumulación de p53 provocada por la inhibición de MDM2 ralentiza la proliferación celular de las células basales de las vías respiratorias.

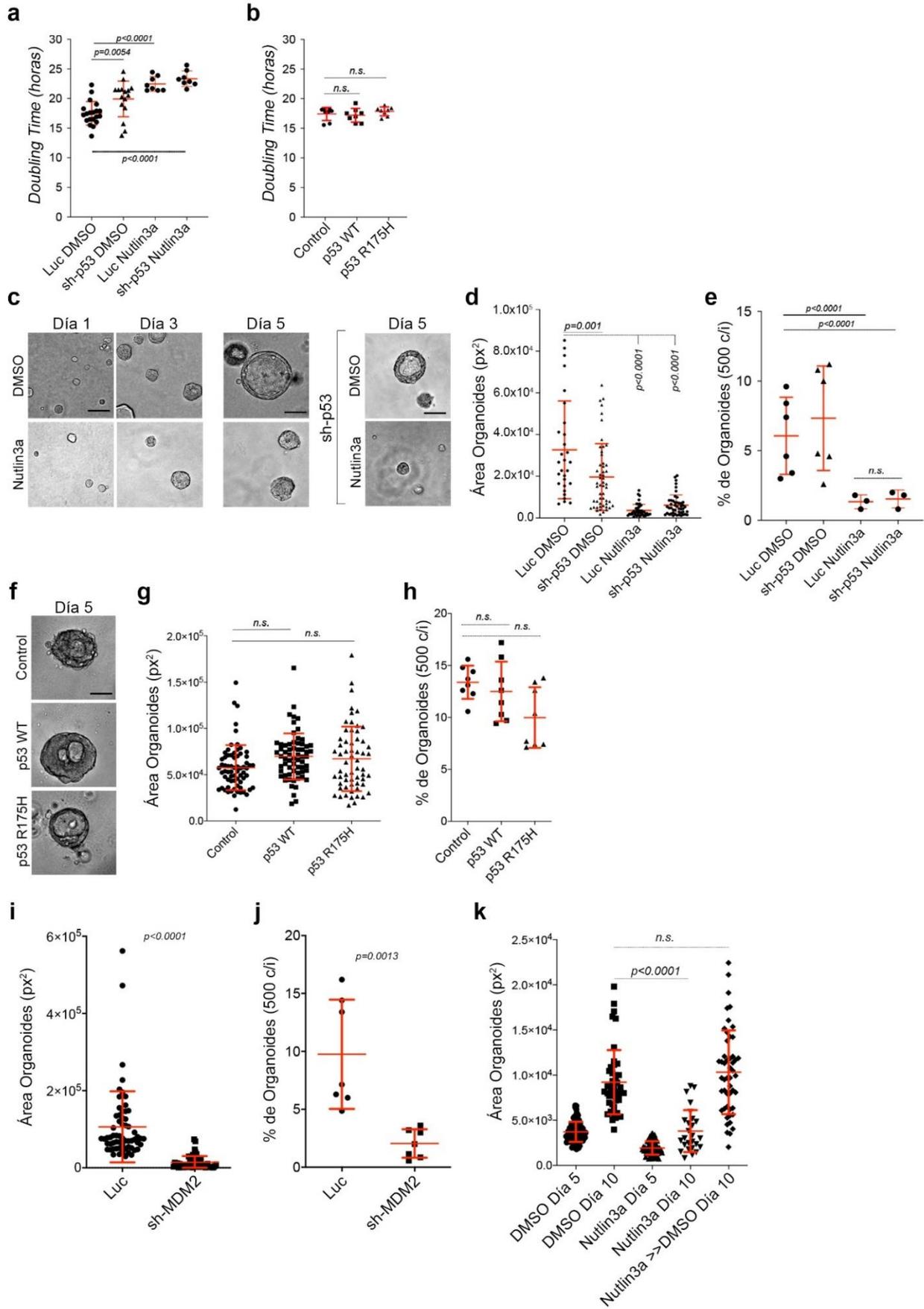


Figura RII.24: Análisis del efecto de la inhibición de MDM2 en la proliferación de células progenitoras del epitelio respiratorio. a, cuantificación del tiempo de duplicación o *doubling time* en cultivos control (Luc DMSO) o silenciados para p53 (sh-p53) y tratados con Nutlin3a o DMSO. b, *doubling time* en cultivos control (vector vacío), p53 *WT* y p53 R175H (n=6-14). c, imágenes representativas de organoides cultivados a partir de células control y sh-p53 en los días 1, 3 y 5 de cultivo, en presencia de Nutlin3a y DMSO. d, cuantificación del tamaño de los organoides a partir de las imágenes de microscopía. e, cuantificación del porcentaje de organoides generados a partir de 500 células, n>50. f, imágenes representativas de organoides cultivados a partir de células control (vector vacío) y p53 *WT* y p53 R175H y cuantificación de su tamaño (g) y porcentaje (h), n>50. i, cuantificación del tamaño de los organoides obtenidos de células control (Luc) y sh-MDM2 en el día 5 de cultivo. j, cuantificación del porcentaje de organoides generados. k, cuantificación del tamaño de los organoides en cultivos tratados con Nutlin3a durante 5 días y posteriormente DMSO durante otros 5 días. N>50. La barra de escala en c y f representa 100µm.

Otra forma de detectar alteraciones en la capacidad proliferativa de las células es a partir del análisis del tamaño de cultivos 3D denominados organoides, que consisten en esferas procedentes de una única célula basal. Para realizar estos experimentos, individualizamos nuestros cultivos de células progenitoras silvestres y silenciadas para p53, y las hacemos crecer en una matriz extracelular como se detalla en el apartado de materiales y métodos. Las células fueron cultivadas durante 5 días en presencia de Nutlin3a o DMSO como control, y después se tomaron imágenes de microscopía para cuantificar el tamaño de los organoides. Las imágenes de los organoides se muestran en el panel c de la figura RII.24. Este experimento también se llevó a cabo para las células que contenían las construcciones V5-p53 *WT* y V5-p53 R157H (Figura RII.24 f). Además, cuantificamos el número de organoides generados a partir de las células sembradas en nuestros cultivos 3D, para comparar así el porcentaje de organoides generados en las distintas condiciones experimentales, parámetro que también hace referencia a la capacidad proliferativa de las células basales.

Los resultados obtenidos en las cuantificaciones del tamaño de los organoides siguen la misma tendencia que en el análisis del *doubling time*. En el panel d de la figura RII.24 se muestra que el tamaño de los organoides procedentes de células silenciadas para p53 es ligeramente inferior al de las células control, una diferencia que se ve incrementada notablemente cuando las células son tratadas con Nutlin3a. Estos resultados confirmaron que los niveles de p53 en las células basales regulan la proliferación celular, y más concretamente, que la acumulación de p53 provocada por la inhibición de MDM2 bloquea este estado proliferativo, algo que también observamos en el porcentaje de organoides generados (Figura RII.24 e). El análisis de los organoides que sobreexpresaban las construcciones V5-p53 *WT* y V5-p53 R157H tampoco reveló diferencias significativas en el tamaño ni el porcentaje de organoides en el quinto día de

cultivo (Figura RII.24 g, h), lo que se corresponde con los resultados del análisis de *doubling time*.

Además, para confirmar que el fenotipo obtenido en el análisis de los cultivos 3D tratados con Nutlin3a se corresponde con el de las células silenciadas para MDM2, generamos organoides a partir de las células transducidas con secuencias ARN de silenciamiento frente a MDM2, y cuantificamos después el área y el porcentaje de organoides generados. Como cabría esperar, tanto el tamaño como el número de organoides se vio significativamente afectado en el caso de las células silenciadas para MDM2, como se muestra en los paneles i y j de la figura RII.24. Estos resultados indican que MDM2 juega un importante papel en el mantenimiento de la proliferación celular, y que su inhibición o silenciamiento conduce a un bloqueo de esta autorrenovación celular.

Por último, en base a que el fenotipo provocado por la inhibición de MDM2 durante la diferenciación celular revierte tras retirar la droga, nos preguntamos si el efecto provocado en la proliferación celular es también reversible. Para resolver esta cuestión, cultivamos durante 5 días los organoides en presencia de Nutlin3a y DMSO, cuantificando el tamaño de ambas condiciones experimentales. Posteriormente, a la mitad de las muestras tratadas con Nutlin3a se les retiró el inhibidor y se cultivaron durante otros 5 días, momento en el que volvimos a cuantificar el tamaño de las esferas. Los resultados obtenidos se muestran en el panel k de la figura RII.24. En esta cuantificación podemos observar que, tras retirar el tratamiento con Nutlin3a, los organoides continúan su crecimiento, alcanzando incluso el tamaño de los cultivos no tratados. Estos resultados confirmaron que el fenotipo provocado por la inhibición farmacológica de la interacción MDM2/p53 también revierte tras la retirada de la droga.

En su conjunto, los resultados obtenidos en los experimentos de *doubling time* y análisis de organoides mostraron que p53 regula la proliferación de las células basales de las vías respiratorias. Concretamente, la acumulación de p53 debida a la inhibición de su ubiquitina ligasa MDM2 provoca un descenso en la proliferación celular, aumentando considerablemente el tiempo en el que las células completan un ciclo de división celular.

La interacción MDM2/p53 regula el ciclo celular

En base a los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, y puesto que p53 se ha relacionado con el arresto o detención del ciclo celular¹⁸⁹, decidimos evaluar el estado del ciclo celular en nuestros cultivos de células progenitoras. Para ello, las células silvestres y silenciadas para p53 fueron cultivadas en presencia de Nutlin3a y DMSO durante 72h, y posteriormente se evaluó mediante citometría de flujo la cantidad de ADN presente en cada célula, lo que refleja el momento del ciclo celular en el que se encuentran. Decidimos además profundizar en este análisis del ciclo celular mediante la comprobación de los niveles de la proteína Ciclina D1, implicada en la transición G1/S del ciclo celular¹⁹⁰.

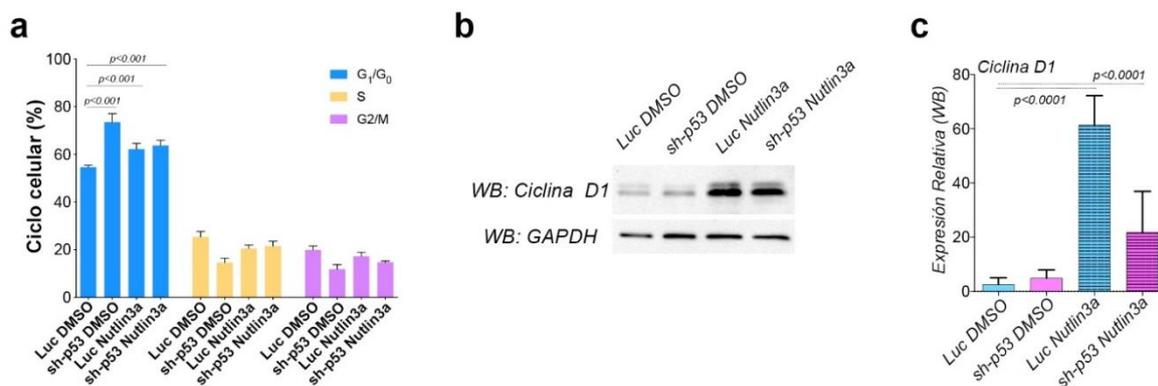


Figura RII.25: Análisis del efecto de la inhibición de MDM2 en el ciclo celular de células progenitoras del epitelio respiratorio. a, análisis del ciclo celular en células control (Luc) y sh-p53 tratadas con Nutlin3a y DMSO durante 5 días realizado mediante citometría de flujo ($n > 10.000$). b, imágenes de *western blot* de las proteínas Ciclina D1 y GAPDH en las mismas condiciones experimentales. c, cuantificación de los niveles de proteína Ciclina D1 en los *western blots* analizados. GAPDH fue utilizado como control de carga. Las columnas en a y c representan la media, y las barras de error la desviación estándar para cada condición. Las cuantificaciones en c se hicieron relativas a las condiciones control (Luc DMSO).

Como se observa en el panel a de la figura RII.25, los resultados de citometría de flujo en las condiciones experimentales analizadas (sh-p53 DMSO, sh-p53 Nutlin3a y Luc Nutlin3a) reflejaron un incremento de aproximadamente un 10-20% de células en G₀/G₁ del ciclo celular cuando se compararon con el control (Luc DMSO). Estos resultados se corresponden con el descenso en la proliferación celular observado en el experimento de *doubling time* y organoides. El análisis mediante *western blot* de los niveles de Ciclina D1, así como su cuantificación, mostraron un notable incremento en las células tratadas con Nutlin3a (Figura RII.25 b, c).

La inhibición de la interacción MDM2/p53 no incrementa los niveles de apoptosis ni senescencia celular

Además del ciclo celular, otro de los procesos con los que más se ha relacionado el papel canónico de p53 es con la modulación de la apoptosis y la senescencia. En este sentido, diversos estudios han descrito mutaciones que afectan a la función de p53 y que promueven la progresión tumoral, evitando la entrada en apoptosis o senescencia de las células cancerosas. El restablecimiento de los niveles normales de p53, en cambio, es capaz de inducir la senescencia y apoptosis de estas células con elevadas tasas de división¹⁹¹.

En base a los estudios publicados, y dado que las condiciones experimentales establecidas modulan los niveles de p53, decidimos comprobar los niveles de apoptosis y senescencia en nuestros cultivos celulares. En este caso, las células silvestres y silenciadas para p53 fueron cultivadas en presencia de Nutlin3a y DMSO durante 72h, marcando después las células con Anexina-FITC. Esta Anexina se une a la fosfatidilserina, un fosfolípido que se utiliza como marcador de apoptosis cuando se encuentra expuesto en la membrana extracelular, y el fluoróforo FITC nos permite su cuantificación por citometría de flujo. Por otro lado, la actividad de la enzima β -galactosidasa ha sido clásicamente un marcador de senescencia celular, por lo que decidimos emplear un kit de marcaje de actividad enzimática basado en la coloración azul producida por las células con altos niveles de β -galactosidasa al hidrolizar el sustrato X-gal. La senescencia celular fue analizada en cultivos en expansión tratados durante 72h con Nutlin3a y en cultivos diferenciados tratados durante el proceso de diferenciación.

Los resultados obtenidos en el análisis por citometría de flujo revelaron que el silenciamiento de p53 en nuestras células progenitoras provoca un descenso en el porcentaje de células apoptóticas, tanto en los cultivos tratados con Nutlin3a como en las células control (Figura RII.26 a). Además, el tratamiento con Nutlin3a provocó un ligero incremento en el número de células apoptóticas. En general, los resultados de este ensayo reflejaron tasas muy bajas de apoptosis tanto en las células tratadas como en el control, confirmando que tanto el silenciamiento de p53 como la inhibición de la interacción MDM2/p53 no provocan grandes efectos en la muerte celular apoptótica.

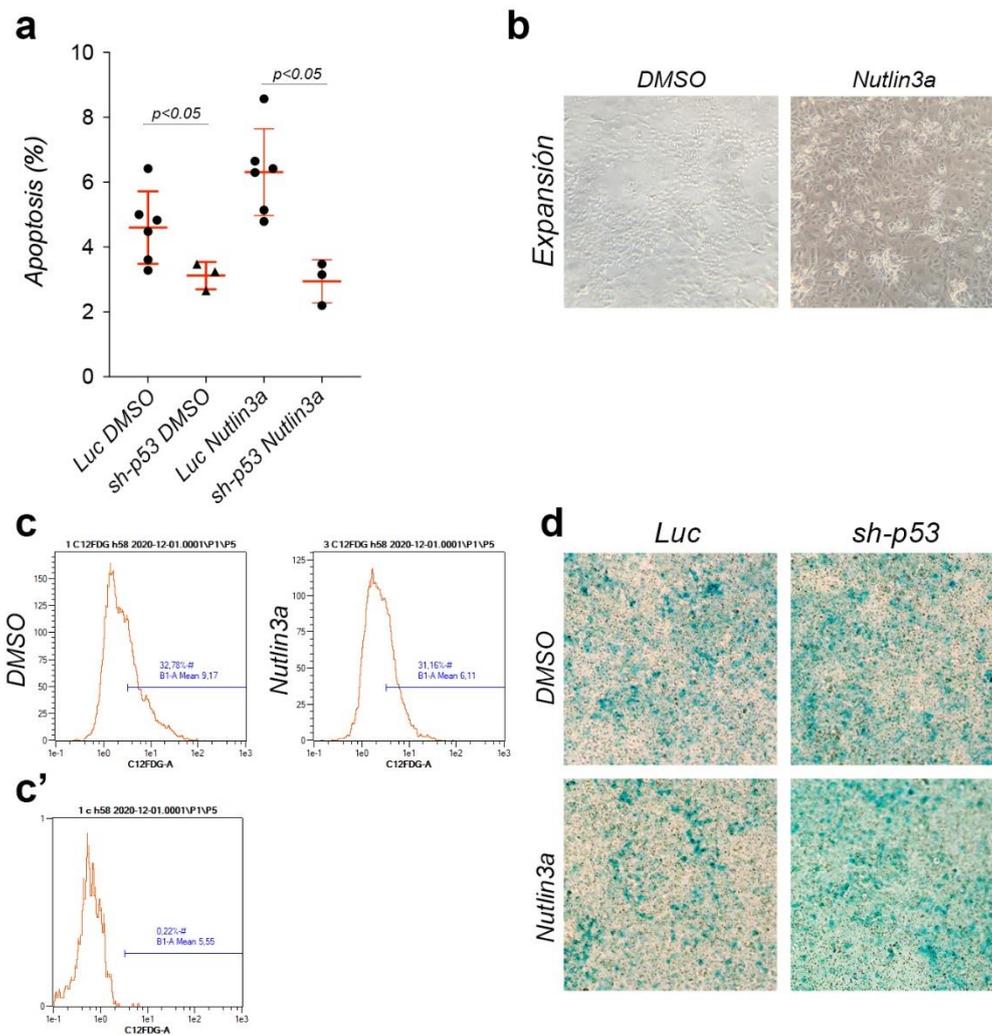


Figura RII.26: Análisis de apoptosis y senescencia en los tratamientos con los inhibidores de MDM2. a, porcentaje de células apoptóticas en cultivos control (Luc) y sh-p53 tratadas con Nutlin3a y DMSO durante 72h realizado mediante citometría de flujo, se representa la media y la desviación estándar para cada condición, (n>10.000). b, imágenes representativas del ensayo de la actividad β -galactosidasa para el estudio de la senescencia en células en expansión tratadas con DMSO (control) y Nutlin3a. c, análisis de citometría de flujo para la evaluación del porcentaje de células senescentes en cultivos tratados con DMSO o Nutlin3a durante 72h, utilizando el sustrato de β -galactosidasa C₁₂FDG. c', análisis control de células sin el sustrato C₁₂FDG para establecer los parámetros de la citometría. d, imágenes representativas del ensayo de senescencia mediante la actividad β -galactosidasa en células diferenciadas tratadas con DMSO (control) y Nutlin3a

El ensayo de la actividad β -galactosidasa que se muestra en el panel b de la figura RII.26 no reveló células senescentes tras el tratamiento con Nutlin3a de los cultivos en expansión. Para analizar de forma cuantitativa si la inhibición MDM2/p53 provoca un efecto en la senescencia de los cultivos de células basales, tratamos las células con Nutlin3a durante 72h, y posteriormente se utilizó el sustrato fluorescente de la β -galactosidasa C₁₂-FDG, para el análisis por citometría de flujo. Los histogramas obtenidos en este análisis se muestran en el panel c de la figura RII.26, y como podemos comprobar, no se encontró un incremento significativo en el porcentaje de células

senescentes tras el tratamiento con Nutlin3a (32,78% en células control frente a 31,16% en el tratamiento). En cultivos diferenciados, el análisis de la actividad β -galactosidasa no mostró grandes diferencias en la cantidad de células senescentes (marcadas en azul más intenso), como se puede observar en el panel d de la figura RII.26.

En su conjunto, estos resultados demuestran que, tanto el tratamiento con inhibidores de MDM2, como el silenciamiento de p53, ampliamente utilizados en este capítulo, no provocaron un incremento significativo en la senescencia ni en la apoptosis en células del epitelio de las vías respiratorias.

La interacción MDM2/p53 regula la diferenciación de las células basales de las vías respiratorias humanas

En base a todos los datos acumulados hasta el momento sobre el papel de la interacción MDM2/p53 en la diferenciación del epitelio de las vías respiratorias de ratón, nos planteamos si esta regulación ocurre también en el epitelio respiratorio humano. Comenzamos analizando la expresión de MDM2 y las proteínas de la familia de p53 en células epiteliales de las vías respiratorias humanas a partir de datos de secuenciación de célula única publicados (set de datos GSE102580)¹⁶⁴.

Los resultados obtenidos en este análisis se muestran en el panel a de la figura RII.27, y como podemos observar, al igual que en las células de ratón, la expresión de la ubiquitina ligasa MDM2 se encuentra enriquecida en las células multiciliadas (Ciliadas y FOXN4+), células que también presentan altos niveles de expresión de *TP73*. En células humanas, la expresión de *TP53* presenta valores más homogéneos, y, como cabría esperar, *TP63* se expresa mayoritariamente en células basales.

Una vez confirmado que la dinámica de expresión de MDM2 en células humanas se corresponde con la del epitelio murino, decidimos comprobar si la inhibición de la interacción MDM2/p53 también es clave en el proceso de diferenciación de las células progenitoras de las vías respiratorias. Las células de bronquio humano que utilizamos en estos ensayos fueron aisladas a partir de dos biopsias independientes de donantes sanos, que en nuestros experimentos denominamos BRO001 y BRO002. Las células progenitoras fueron cultivadas y plaqueadas para su diferenciación de forma similar a las células de ratón, prolongando el cultivo ALI durante 21 días. Las células BRO001 y

BRO002 fueron tratadas con Nutlin3a y DMSO (control) durante todo el proceso de diferenciación, y analizamos después mediante qPCR los marcadores de poblaciones de células basales, multiciliadas y secretoras (células Clara y caliciformes). Además, comprobamos mediante microscopía electrónica de barrido la morfología y abundancia de los cilios en las células tratadas con Nutlin3a.

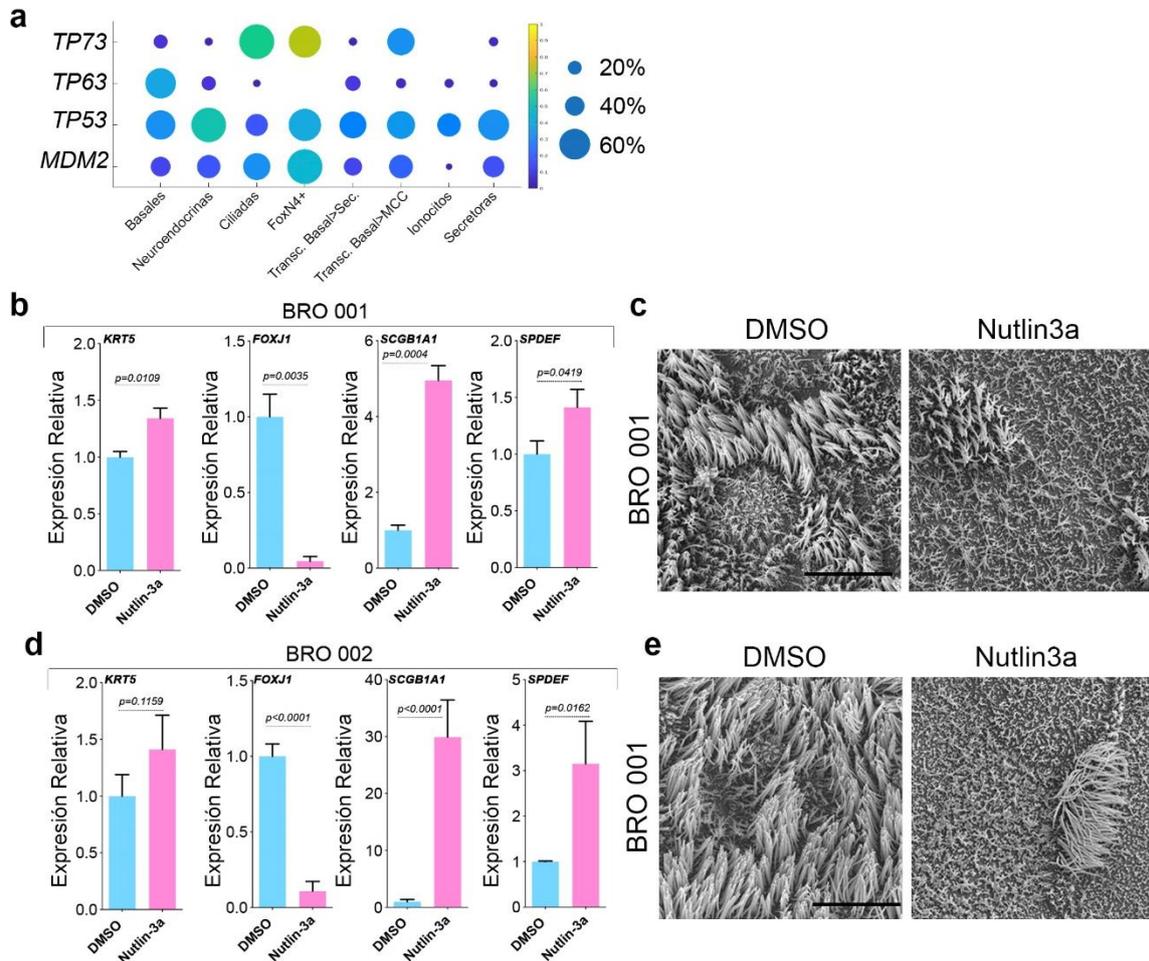


Figura RII.27: Estudio de la inhibición de MDM2 en el epitelio de las vías respiratorias humanas. a, representación *dot blot* de los niveles de ARN mensajero de *TP73*, *TP63*, *TP53* y *MDM2* en los tipos celulares mayoritarios del epitelio respiratorio humano, obtenidos mediante datos de secuenciación de célula única. b, d, niveles de ARN mensajero analizados mediante qPCR tras el tratamiento con DMSO (control) y Nutlin3a en cultivos de dos pacientes, BRO001 (b) y BRO002 (d). Se analizaron los marcadores *Krt5* para células basales, *Foxj1* para células multiciliadas, y *Scgb1a1* para células secretoras. Se utilizó la expresión de *Eif1a* para normalizar los niveles de expresión. Las columnas representan la media, y las barras de error representan la desviación estándar para cada condición. Las cuantificaciones se hicieron relativas a las condiciones control (DMSO) n=8. c, e, imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) para el análisis de la morfología de los cilios. Las barras de escala en c y e representan 15µm.

Los resultados obtenidos en análisis de marcadores específicos de poblaciones celulares mostraron una dramática reducción de los niveles de expresión de *FOXJ1* en los cultivos procedentes de ambos pacientes, resultados que se corresponden con los obtenidos en las células de ratón (Figura RII.27 b, d). Los marcadores para las células

secretoras, a diferencia de los analizados en los cultivos de células de tráquea de ratón, revelaron un incremento significativo de la abundancia de células Clara y caliciformes en las muestras tratadas con Nutlin3a. Por último, las células basales también mostraron un leve incremento en tras la inhibición de la interacción MDM2/p53.

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido confirmaron la disminución en la abundancia de células multiciliadas, mostrando además cilios más cortos en las células diferenciadas en presencia de Nutlin3a similares a las encontradas en las células de ratón, como se puede observar en los paneles c y e de la figura RII.27.

Estos resultados revelaron que, al igual que ocurre en el epitelio de las vías respiratorias de ratón, la interacción MDM2/p53 juega un papel clave en la configuración celular del epitelio pseudoestratificado que tapiza las vías respiratorias de humanos.

El tratamiento con Nutlin3a reduce la densidad celular en los cultivos del epitelio respiratorio humano

Para confirmar si, como ocurre durante el tratamiento con AMG232 y Nutlin3a en los cultivos de células de ratón, la inhibición de MDM2 provoca una reducción de la densidad celular y el aumento del tamaño de los núcleos, éstos fueron marcados con DAPI, cuantificando después su tamaño y el número de células por campo. Además, analizamos la resistencia eléctrica transepitelial (TEER), para comprobar si la inhibición de MDM2 afecta a la función de barrera del epitelio respiratorio humano.

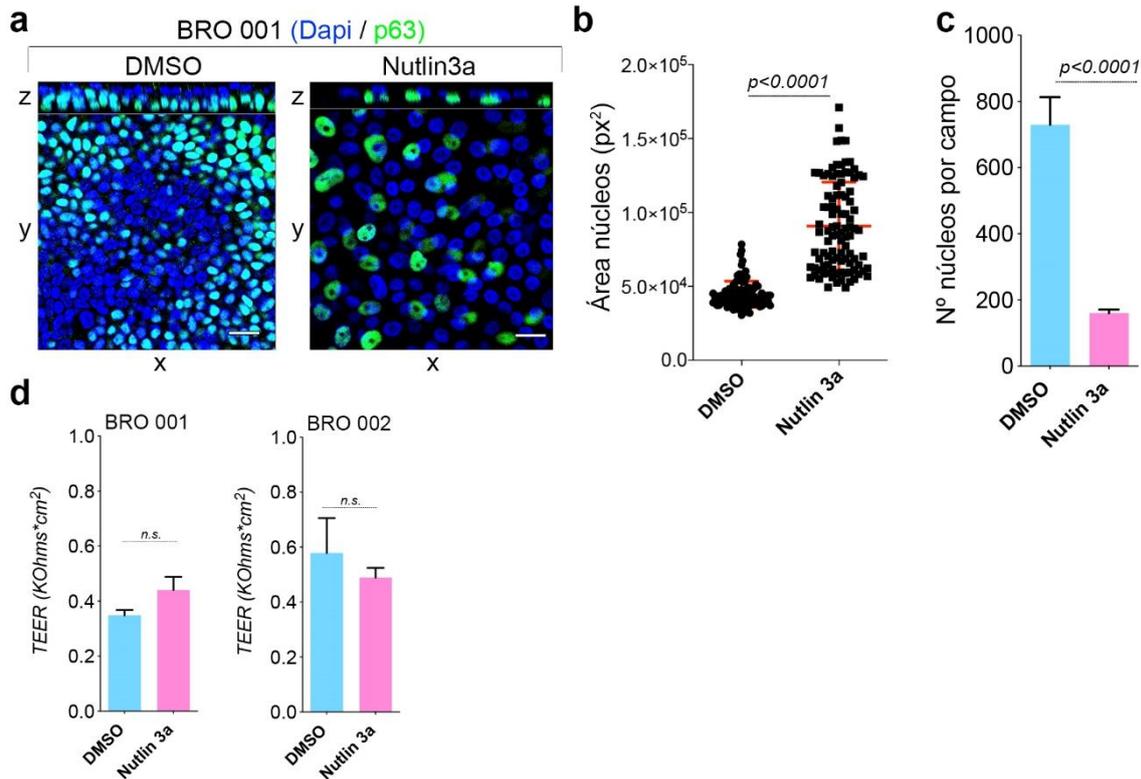


Figura RII.28: Análisis de la densidad celular y la integridad del epitelio en cultivos de células de bronquio humano tratadas con Nutlin3a. a, Imágenes de microscopía confocal para el marcaje de células basales (p63, en verde) y núcleos (DAPI, azul) en células de bronquio humano diferenciadas durante 21 días en presencia de DMSO (control), y Nutlin3a. b, Cuantificación del tamaño de núcleos en las distintas condiciones experimentales, $n > 100$. c, Cuantificación del número núcleos por campo analizado en células tratadas con DMSO y Nutlin3a. d, resistencia eléctrica transepitelial (TEER) medida en ALI 21 en cultivos tratados con Nutlin3a. Las columnas en c y d representan la media y las barras de error muestran la desviación estándar. Las barras de escala en a representan $20\mu\text{m}$.

En las imágenes de microscopía confocal que se muestran en el panel a de la figura RII.28 podemos comprobar que el tratamiento con Nutlin3a provoca un notable incremento en el tamaño de los núcleos, y un descenso de la densidad celular. Además, el análisis ortogonal de estas imágenes mostró que, mientras que en los cultivos control los núcleos se disponen a distintas alturas dentro del epitelio pseudoestratificado, con la población de células basales ($p63^+$) en la zona inferior, las células tratadas con Nutlin3a presentan sus núcleos en un solo plano. Este resultado indica que la inhibición de MDM2 afecta a la estratificación de las células del epitelio de las vías respiratorias humanas. La cuantificación del tamaño de los núcleos y la densidad celular confirmó la observación indicada anteriormente, revelando un incremento significativo en el tamaño de los núcleos en los cultivos tratados con Nutlin3a, y reduciendo notablemente el número de células en los campos analizados (Figura RII.28 b, c). Para comprobar si esta reducción en la densidad celular provocada por el tratamiento con Nutlin3a afecta a la función de barrera del epitelio respiratorio, medimos la resistencia transepitelial de

los cultivos diferenciados. Los resultados, que se muestran en el panel d de la figura RII.27, no revelaron diferencias significativas en los valores obtenidos.

En su conjunto, estos resultados muestran que la interacción MDM2/p53 juega un papel clave en la organización celular del epitelio pseudoestratificado de los bronquios humanos, resultados que coinciden con los obtenidos en el epitelio de las vías respiratorias de ratón.

MDM2 regula la proliferación de células basales en vías respiratorias humanas

Los resultados obtenidos en los cultivos de células progenitoras del epitelio de ratón demostraron que la interacción MDM2/p53 regula la proliferación celular, y que cuando esta interacción se encuentra bloqueada, la tasa de división celular se reduce notablemente. Este efecto en la proliferación celular se refleja en el tamaño de los organoides y en los valores de *doubling time*. Para comprobar si este mismo fenotipo se reproduce también en las células de las vías respiratorias humanas, analizamos la formación de organoides, y cuantificamos su tamaño tras el tratamiento con Nutlin3a y DMSO (control).

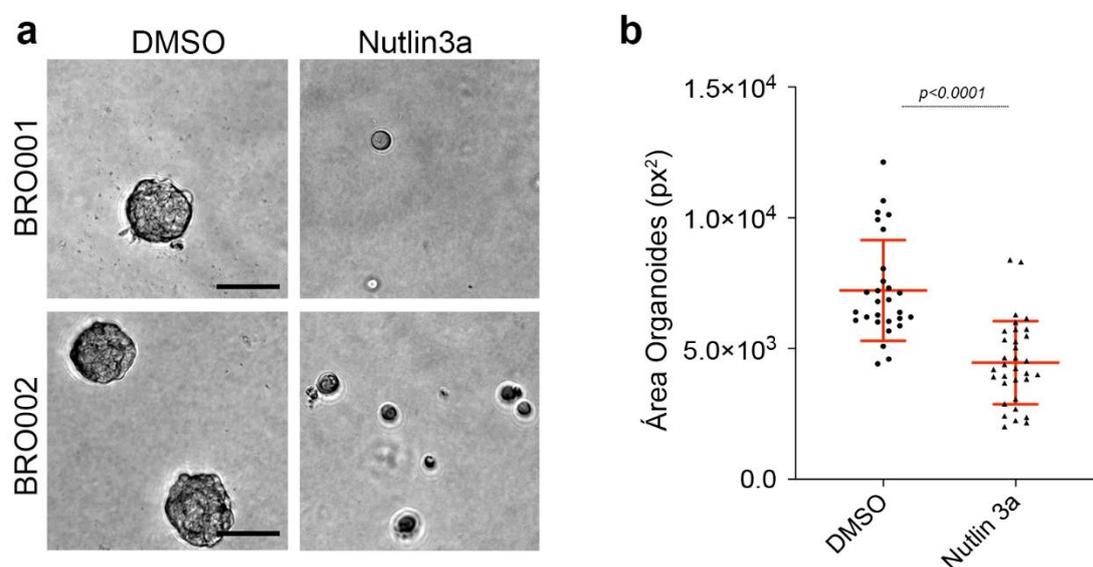


Figura RII.29: Análisis del efecto de la inhibición de MDM2 en la proliferación de células del epitelio respiratorio humano. a, imágenes representativas de organoides cultivados a partir de células de bronquio humano en el día 5 de cultivo, en presencia de Nutlin3a y DMSO. b, cuantificación del tamaño de los organoides a partir de las imágenes de microscopía, n>30. Se representa la media y la desviación estándar.

En los paneles a y b de la figura RII.29 se muestra el análisis del tamaño de los organoides generados a partir de células de bronquio humano y tratados con Nutlin3a. Este análisis reveló una reducción significativa de la proliferación celular cuando se

inhibe la interacción MDM2/p53, del mismo modo que ocurren en las vías respiratorias de ratón.

A partir de los resultados obtenidos en los experimentos con células progenitoras de las vías respiratorias humanas, podemos concluir que MDM2 regula los procesos de diferenciación y proliferación celular, recapitulando gran parte de los resultados obtenidos en las vías respiratorias murinas. Cabe destacar, en cambio, una notable diferencia en la regulación de la diferenciación de células secretoras, donde el efecto de la inhibición de MDM2 provoca un claro descenso de esta población en ratón, mientras que en los cultivos de células humanas se observó un incremento tanto en células Clara como caliciformes.

En suma, los resultados obtenidos en este capítulo ponen de manifiesto que la regulación que MDM2 ejerce sobre p53 juega un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis y la diferenciación de las poblaciones celulares que componen el epitelio de las vías respiratorias. Además, estos hallazgos sugieren que la modulación de la interacción entre MDM2 y p53 podría ser una diana clave para controlar los procesos de regeneración del epitelio de las vías respiratorias.

DISCUSIÓN CAPÍTULO II

DISCUSIÓN CAPÍTULO II

En vertebrados, las vías respiratorias están constantemente expuestas a patógenos y partículas inhaladas, además de a cambios en las condiciones de humedad y temperatura. En este sentido, el epitelio que recubre la tráquea y los bronquios constituye una barrera esencial para hacer frente a estos retos, eliminando activamente las partículas y patógenos que quedan atrapados en el moco secretado, manteniendo así la homeostasis del organismo. La regeneración de este complejo epitelio conlleva una respuesta celular coordinada, en la que tienen lugar multitud de eventos entre los que se encuentran procesos de proliferación y diferenciación celular, y que fueron abordados en este capítulo. El epitelio pseudoestratificado que tapiza las vías respiratorias superiores, también denominadas vías conductivas, está formado fundamentalmente por células basales, secretoras y multiciliadas, dispuestas en agrupaciones a modo de mosaico. El mantenimiento del balance entre las distintas poblaciones celulares es esencial para la función de barrera del epitelio, y alteraciones en este balance pueden provocar infecciones agudas, y están detrás de patologías como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o fibrosis quística^{192, 193}.

En el epitelio de las vías respiratorias, las células multiciliadas desempeñan un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis, generando un flujo orientado del moco que permite la eliminación de patógenos y partículas atrapadas durante la respiración. Para profundizar en el conocimiento sobre los mecanismos moleculares que regulan la diferenciación de células multiciliadas, en este capítulo comenzamos analizando los factores de transcripción e interactores que podrían estar implicados en este proceso. Este análisis, realizado a partir de datos de secuenciación de célula única publicados (GSE102580)¹⁶⁴ reveló, además de los factores de transcripción ya conocidos como *FOXJ1* o *FOXA1*¹²⁸, otros candidatos con una potencial implicación en la diferenciación de las células multiciliadas. Uno de estos candidatos fue el factor de transcripción p53, clásicamente conocido por su papel como supresor tumoral.

En los últimos años se ha demostrado que proteínas pertenecientes a la familia de p53, como p63, p73 y el propio p53, juegan un papel determinante en el desarrollo de las vías respiratorias, regulando la composición celular del epitelio

pseudoestratificado¹⁹⁴. Concretamente se ha comprobado que p63 se expresa mayoritariamente en las células progenitoras de los epitelios mucosos, como es el caso de las vías respiratorias, y ratones defectivos en p63 presentan graves alteraciones en el proceso de regeneración y diferenciación de estos epitelios¹⁵⁸. Por otro lado, se ha identificado que el factor de transcripción p73 está estrechamente implicado en la diferenciación de células multiciliadas, y que actúa a través de la activación directa del núcleo central de la ciliogénesis, en el que se encuentran los factores de transcripción *Foxj1*, *Rfx2* Y *Rfx3*, *Mir34bc*¹⁹⁵. Las células multiciliadas de ratones con deficiencia en la expresión de p73 sufren graves defectos en la ciliogénesis, lo que provoca infecciones recurrentes de las vías respiratorias por la escasa movilidad del moco secretado. Se ha demostrado que estos defectos en la ciliogénesis están causados por alteraciones en el posicionamiento apical de los cuerpos basales, que impide la correcta extensión del axonema. Además, la composición celular del epitelio pseudoestratificado de la tráquea se ve alterada cuando se modifican los niveles de expresión de p73 y p63, reduciéndose significativamente la cantidad de células ciliadas en beneficio de las células secretoras, o incrementándose la proporción de células multiciliadas respectivamente¹⁹⁶.

Como hemos visto, el papel desempeñado por p63 y p73 en la proliferación y la diferenciación del epitelio que tapiza las vías respiratorias está extensamente descrito, sin embargo, el papel de p53 en la especificación celular ha sido abordado más recientemente, y su implicación en la diferenciación de tejidos con bajas tasas proliferativas está aún por esclarecer. Algunos estudios llevados a cabo en los últimos años apuntan a que p53 podría funcionar como un regulador central de la densidad y la composición celular de las vías respiratorias en el proceso de transdiferenciación desde células caliciformes a células multiciliadas, proceso que dependería de los niveles de p53¹⁷². Este mismo estudio, que demostró que p53 actúa bloqueando la proliferación celular y promoviendo la diferenciación de células multiciliadas a partir de células caliciformes, deja abiertos interrogantes acerca del papel de p53 en la diferenciación del epitelio respiratorio a partir de células basales, proceso que abordamos en este capítulo.

Nuestros hallazgos relativos a los niveles de p53 en cultivos epiteliales de las vías respiratorias mostraron cambios en la cantidad de proteína a lo largo del proceso de diferenciación, concretamente un incremento en ALI4, que sin embargo no apreciamos

en el ARN mensajero. Este hecho nos sugiere una posible regulación provocada por la estabilización de la proteína. Estudios recientes han demostrado que la inactivación de MDM2, la principal ubiquitina ligasa que regula los niveles de p53, provoca letalidad en ratones postnatales, observando una drástica reducción en el tamaño de los pulmones¹⁹⁷. Nuestro estudio de los niveles de MDM2 a lo largo de la diferenciación del epitelio respiratorio también reflejó cambios en los niveles de expresión, resultado obtenido en las cuantificaciones de ARN y proteína. En este sentido, el incremento de la cantidad de p53 en las primeras etapas de la diferenciación se corresponde con el acusado descenso de MDM2 observado mediante *western blot*. Estos resultados están en consonancia con lo descrito en otros estudios *in vivo* en los que se encontraron cambios en los niveles de p53 a lo largo de la diferenciación del sistema respiratorio^{198, 199}.

El análisis más detallado de la expresión de p53 y MDM2 en las distintas poblaciones celulares mediante los datos de secuenciación de célula única e inmunofluorescencia reveló que MDM2 se expresa mayoritariamente en las células multiciliadas, donde además la expresión de p53 es menor, lo que coincide con la regulación transcripcional negativa descrita entre ambas proteínas²⁰⁰. El análisis de la expresión de otras E3-ubiquitina ligasa en los distintos tipos celulares no mostró ningún patrón similar al observado para MDM2. Este resultado nos indica un papel relevante de la interacción MDM2/p53 en la diferenciación de las células multiciliadas.

La modulación de los niveles de p53 mediante ARN de interferencia mostró un incremento significativo de células multiciliadas, sin afectar al resto de poblaciones celulares, mientras que el silenciamiento de MDM2, en cambio, disminuyó el número de células multiciliadas y secretoras, lo que sugiere un importante papel en la regulación del destino celular de las células progenitoras de las vías respiratorias. El efecto del silenciamiento de p53 en células basales contradice al publicado en la transdiferenciación a partir de células caliciformes, donde encontraron que la expresión de una copia más de p53 favorecía la diferenciación a células multiciliadas¹⁷², diferencia que podría venir mediada por las diferencias en la expresión de MDM2 entre distintos tipos celulares. Además, en nuestro modelo, la sobreexpresión de p53 WT en células basales también provocó un descenso significativo de la diferenciación a células

multiciliadas, fenotipo que se revertía cuando se expresaba una forma mutada de p53, con defectos en su actividad transcripcional.

La importancia de la interacción MDM2/p53 en la diferenciación de las células progenitoras de las vías respiratorias se pone de manifiesto en la inhibición farmacológica de dicha interacción. El tratamiento con los inhibidores de MDM2 AMG-232 y Nutlin3a, que provoca un notable incremento de p53, bloqueó de forma transitoria la diferenciación de las células basales tanto hacia células secretoras como hacia células multiciliadas, lo que se contradice con la visión general de que p53 bloquea la proliferación y promueve la diferenciación celular^{199, 201}. Este efecto en la diferenciación se revierte una vez retirado el tratamiento, y no afectó a las células ya diferenciadas. En este sentido, y al contrario de lo descrito para el estudio de inactivación génica de *Mdm2*¹⁹⁷, nuestros datos de la inhibición de MDM2 reflejan una pérdida casi completa de células *Scgb1a1*⁺ y *Foxj1*⁺, mientras que en su modelo no encontraron alteraciones significativas en la diferenciación del epitelio afectado. Esta diferencia fenotípica podría explicarse por la existencia de algún mecanismo compensatorio que permitiese la diferenciación en la inhibición génica, pero que no ocurra en nuestro modelo farmacológico más agudo. Se ha demostrado que las células secretoras actúan como progenitores de células multiciliadas en el proceso de transdiferenciación, y que los cambios en los patrones de expresión génica que promueven dicho proceso están mediados por la secreción de ligandos de la ruta de Notch²⁰². La inactivación de la ruta de Notch promueve la diferenciación hacia células multiciliadas, en detrimento de las células secretoras¹²⁷. Nuestros datos, además, reflejan que la interacción MDM2/p53 es imprescindible para la correcta diferenciación hacia células multiciliadas, y que la inhibición de dicha interacción bloquea la producción de células multiciliadas también en condiciones de inactivación de la ruta de Notch. Adicionalmente, las células multiciliadas que consiguen diferenciarse en presencia de los inhibidores de MDM2 presentan un menor número de cilios, que además son más cortos, lo que sugiere que la regulación mediada por MDM2 también está implica en la ciliogénesis.

La inhibición de MDM2 en los cultivos diferenciados también mostró un descenso en la densidad celular, y un notable incremento en el tamaño de los núcleos,

sin afectar a la función de barrera del epitelio. La estabilización de los niveles de p53 en los tratamientos con los inhibidores de MDM2 podría ser la causa de esta menor densidad celular, lo que concuerdan con estudios publicados en los que la expresión de una copia extra de p53 provocó el mismo fenotipo¹⁷². Además, la acumulación de p53 también se ha relacionado con el incremento del tamaño de los núcleos en células de *Drosophila*²⁰³.

Los experimentos con cultivos primarios de bronquio humano como modelo de estudio recapitularon los hallazgos realizados para las vías respiratorias de ratón, a excepción del efecto sobre la población de células secretoras, donde observamos un incremento en condiciones de inhibición de MDM2. El resto de los fenotipos abordados coincidieron en ambos modelos, sugiriendo que la modulación de los niveles de p53 está implicada en la diferenciación de células multiciliadas y la densidad celular. Los datos obtenidos en el análisis del ciclo celular nos permiten proponer que la inhibición de MDM2 induce un estado de quiescencia celular reversible en las células basales, promovido por el incremento de p53, lo que podría provocar un efecto compensatorio en los niveles de ciclina D1, que se ve incrementada a pesar de no traducirse en un incremento de la tasa proliferativa, función canónica descrita para esta proteína²⁰⁴

Los efectos de la modulación de los niveles p53, MDM2, así como el bloqueo de su interacción se esquematizan en la figura DI.1. La diversidad de fenotipos obtenidos tras la inhibición farmacológica de MDM2 nos permite plantear la hipótesis de que MDM2 tendría un papel independiente de p53 en la diferenciación de las células progenitoras del sistema respiratorio. Esta hipótesis estaría además basada en los recientes ejemplos de la implicación de MDM2 en diferenciación celular. Uno de estos estudios demostró que adipocitos defectivos para MDM2 no consiguen diferenciarse, proceso que parece dependiente de los factores de transcripción STAT e independiente de p53²⁰⁵. Además, NUMB, un regulador negativo de la ruta de Notch, que promueve la diferenciación de las células secretoras, ha revelado ser un interactor de MDM2²⁰⁶. Por otro lado, en células mesenquimales, MDM2 mantiene el estado de pluripotencia, y su silenciamiento provoca la diferenciación de forma independiente a p53²⁰⁷.

Los resultados obtenidos en este capítulo podrían ser, además, de gran relevancia clínica, ya que MDM2 es una conocida diana en el tratamiento de multitud

de tipos cáncer, entre los que se encuentran el cáncer de pulmón de célula no pequeña. Este tipo de cáncer está mayoritariamente provocado por células escamosas que expresan marcadores propios de células basales como Sox2, Krt5 o p63²⁰⁸. Además, se ha comprobado que MDM2 está sobreexpresado en multitud de tumores humanos²⁰⁹, y las mutaciones en p53 suponen las alteraciones genéticas más frecuentes en carcinomas pulmonares²¹⁰. Debido a esto, esclarecer la función de MDM2 en el epitelio de las vías respiratorias, así como su relación con p53, resulta de vital importancia para mejorar los tratamientos en estos tipos de cáncer. Más allá de su implicación tumoral, entender el mecanismo a través del cual las células progenitoras de las vías respiratorias restablecen el epitelio después del daño también presenta relevancia clínica, y la modulación de las diversas poblaciones celulares de este epitelio puede ser de gran interés en medicina regenerativa.

Por todo esto, los hallazgos obtenidos en este capítulo tienen profundas implicaciones para pacientes tumorales con tratamientos que modulan la ruta MDM2/p53, así como el abordaje de la medicina regenerativa, donde la modulación de los niveles de p53 puede ser utilizada para controlar los procesos diferenciación celular.

La interacción MDM2/p53 regula la diferenciación celular en el epitelio respiratorio:

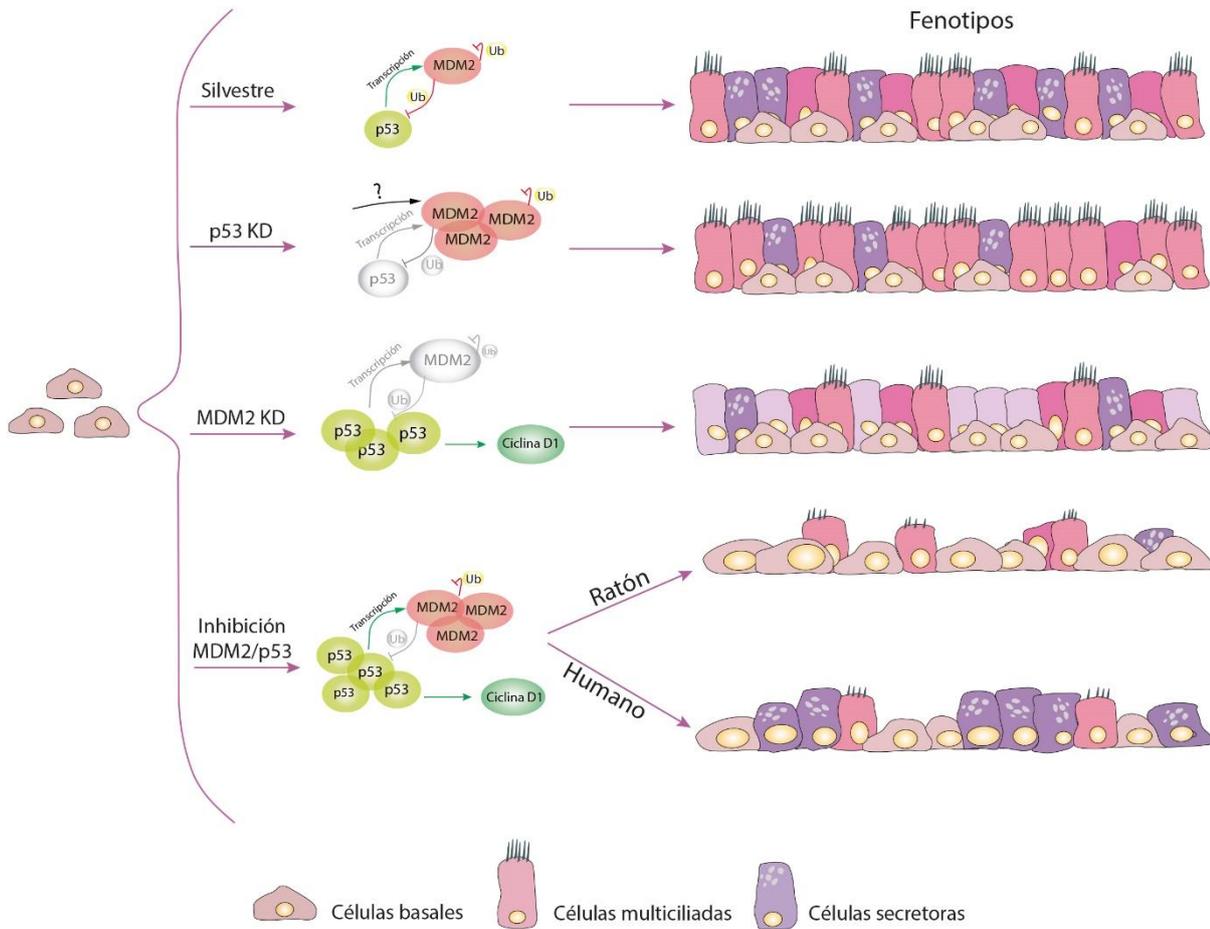


Figura DII.1: Representación esquemática de los fenotipos provocados por la modulación de la ruta MDM2-p53 en la diferenciación del epitelio de las vías respiratorias.

CONCLUSIONES CAPÍTULO II

CONCLUSIONES CAPÍTULO II

- 1.** La regulación de los niveles de p53 promovida por la ubiquitina ligasa MDM2 a lo largo del proceso de diferenciación del epitelio respiratorio de ratón es necesaria para el correcto balance entre las distintas poblaciones celulares.
- 2.** La inhibición de la interacción MDM2/p53 provoca graves defectos en la diferenciación celular del sistema respiratorio murino, así como alteraciones en la formación de los cilios, pero no afecta a la función de barrera del epitelio respiratorio.
- 3.** La interacción MDM2/p53 regula la proliferación y el ciclo celular de las células basales de las vías respiratorias.
- 4.** La inhibición de la interacción MDM2/p53 provoca graves defectos en la diferenciación de las células del epitelio respiratorio humano, recapitulando la mayor parte de los fenotipos obtenidos para nuestro modelo murino.

MATERIALES Y METODOS

1. Métodos en *Drosophila melanogaster*

1.1 Cría y mantenimiento de las moscas

Las líneas de *Drosophila melanogaster* utilizadas durante el transcurso de esta tesis fueron mantenidas en incubadores a temperatura constante (18°C, 25°C y 29°C) en función de los requerimientos de cada experimento. Las moscas fueron alimentadas con una mezcla de harina blanca de trigo (10% p/v), levadura (2% p/v, *MP Biomedicals*, #903312), glucosa (10% p/v, *Alfa Aesar*, #A16822), agar (1,5%p/v *VWR*, #846090500), antifúngico Nipagin (1% p/v, *Sigma*, #W271004) y ácido propiónico (0,1%v/v, *Acros Organics*, #149300010), que se preparó en agua destilada, calentando la mezcla y dispensándola en los viales para después dejarla solidificar y almacenarla a 4°C. Para el mantenimiento de las líneas de moscas utilizamos viales de plástico de 2,5 cm de diámetro y 15 cm de alto (*Dominique D.*, #789009). La amplificación de los cruces y el mantenimiento de las líneas más utilizadas se realizó a 25°C, empleando botellas plásticas de 5x5cm (*Dominique D.*, #94351). A 25°C, la fase larvaria dura aproximadamente 5 días y transcurrido este tiempo se desarrolla la pupa, estadio en el que se forman las estructuras adultas a partir de los denominados discos imaginales. Una vez que la mosca adulta emerge de la pupa, ésta tarda entre 8 y 9 horas en alcanzar la madurez sexual. Esta ventana de tiempo es fundamental para coleccionar hembras vírgenes que serán utilizadas posteriormente en los cruces. Para el mantenimiento de las líneas del laboratorio los individuos fueron transferidos a viales nuevos cada 15 días.

1.2 Cruces y recolección de pupas

Para realizar los cruces, los individuos de los genotipos de interés fueron colocados sobre una plataforma porosa conectada a un sistema de emisión de CO₂, con el fin de anestesiarlos y manipularlos con facilidad. Una vez anestesiadas, bajo lupa binocular se separaron las hembras vírgenes y los machos de cada genotipo. Para coleccionar las hembras vírgenes cuando no se controlaron los periodos de 8h tras la eclosión de la pupa, nos fijamos en los restos de meconio presentes en el intestino o en el plegamiento de las alas, pues las moscas adultas tardan algunas horas en desplegarlas por completo. En cada cruce se colocaron entre 10 y 15 hembras vírgenes y 3-4 machos por vial, que fueron mantenidos a 25°C durante 2-3 días para una puesta de huevos

suficiente. Posteriormente, los individuos adultos se retiraron y fueron transferidos a un nuevo vial para continuar con la puesta. Tras los estadios larvales, se controló el momento en el que los individuos pasaban a fase pupa, y éstas se colectaron con un pincel para transferirlas a nuevos viales, mantenidos a 25°C o 29°C e incubados durante un tiempo comprendido entre 25-30h (25-30h apf, *after puparium formation*), en función del experimento realizado.

1.3 Líneas de *Drosophila* utilizadas

El conocimiento de la genética de *Drosophila* permite controlar la expresión génica y restringirla tanto espacial como temporalmente mediante el uso de secuencias morfogenéticas reguladoras, también conocidas como *drivers*, que dirigen la expresión a una región del organismo conocida. Además, los genotipos de interés pueden ser identificados mediante marcadores fenotípicos observables tanto a simple vista como bajo lupa binocular. Estos marcadores están asociados a cromosomas denominados balanceadores o equilibradores, que no permiten la recombinación homóloga entre parejas de cromosomas, e impiden su transmisión en homocigosis, permitiendo seguir el alelo que porta la construcción o mutación deseada. Los marcadores fenotípicos pueden abarcar desde el color de los ojos (w^- blancos o w^+ rojos) o el pigmento de la cutícula (silvestre $-wt-$ o y para amarillo) hasta el tamaño de las pupas (TM6B) o de determinados apéndices (Ubx). Gracias a estos marcadores pueden identificarse los individuos que presentan mutaciones o construcciones de interés para su posterior estudio.

En este trabajo, la mayor parte de los experimentos con *Drosophila* fueron realizados utilizando el sistema de expresión Gal4/UAS, un sistema de expresión génica de levaduras que permite la expresión dirigida de genes que estén bajo el control de secuencias UAS (*Up-stream Activating Sequence*)²¹¹. Este sistema está basado en cruces entre líneas portadoras de la secuencia codificante para GAL4 con líneas que portan la región UAS seguida de la secuencia de interés. En la descendencia del cruce, el activador transcripcional GAL4 reconoce a las secuencias UAS y se une a ellas, promoviendo la transcripción de cualquier gen localizado en la posición 3' de dichas secuencias. Además de genes, también es posible colocar secuencias de ARN de interferencia bajo la regulación de UAS, lo que permite el silenciamiento de un determinado gen en la

descendencia del cruce UAS x GAL4. Por último, mediante el uso de *drivers* es posible dirigir la expresión del activador GAL4 a una región determinada del organismo, de modo que la expresión del gen de interés o secuencia de ARN de interferencia estará también restringida a esta región. Este sistema de expresión se esquematiza en la figura M.1.

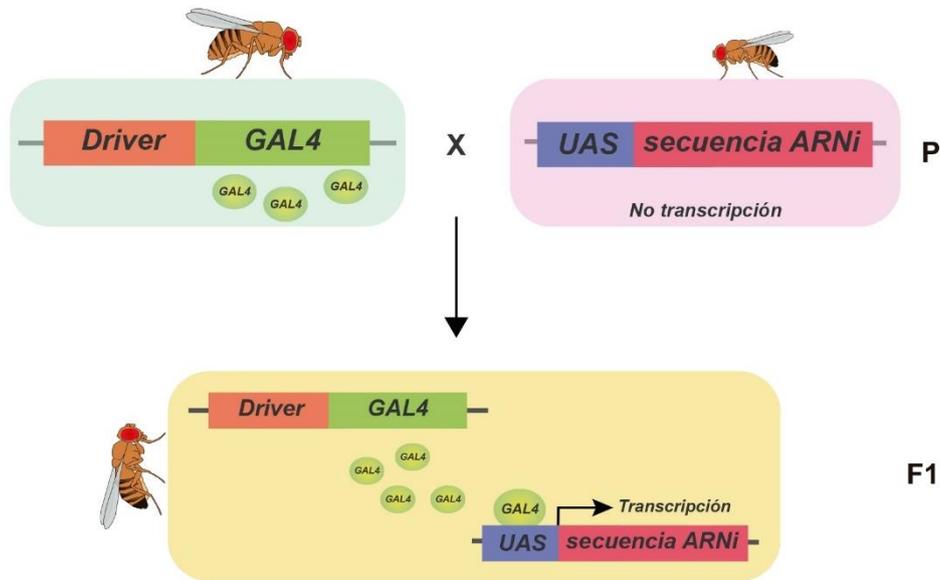


Figura M.1: Esquema del sistema de expresión GAL4/UAS para la transcripción de secuencias de ARN de interferencia. P: parental; F1: descendencia.

Para el cribado inicial de las líneas de *Drosophila* que provocaron fenotipos de alteración de PCP o quetas de actina múltiples, utilizamos el sistema de expresión Gal4/UAS bajo los *drivers* que dirigen la expresión en regiones determinadas del ala de *Drosophila*. Las líneas de mosca con *drivers* utilizadas fueron *engrailed* (*en-Gal4*), que dirige la expresión a la región posterior del ala, *decapentaplegic* (*dpp-Gal4*), dirigido la zona entre las venas longitudinales L3 y L4 en el centro del ala, y *nubbin* (*nub-Gal4*), que se expresa en el ala completa, todas ellas pertenecientes al banco de moscas de *Bloomington*, en la Universidad de Indiana, USA. Estas líneas fueron cruzadas con más de 20 líneas diferentes portadoras de secuencias de ARN de interferencia (UAS-ARNi) para dirigir el bloqueo de la expresión de los genes diana a las distintas regiones del ala, tal y como se esquematiza en el panel a de la figura M.2. En este esquema, cada uno de los cuatro cromosomas de *Drosophila* se nombran separados por “;”, y, en el caso de heterocigosis, cada uno de los alelos se muestran como elementos de una fracción:

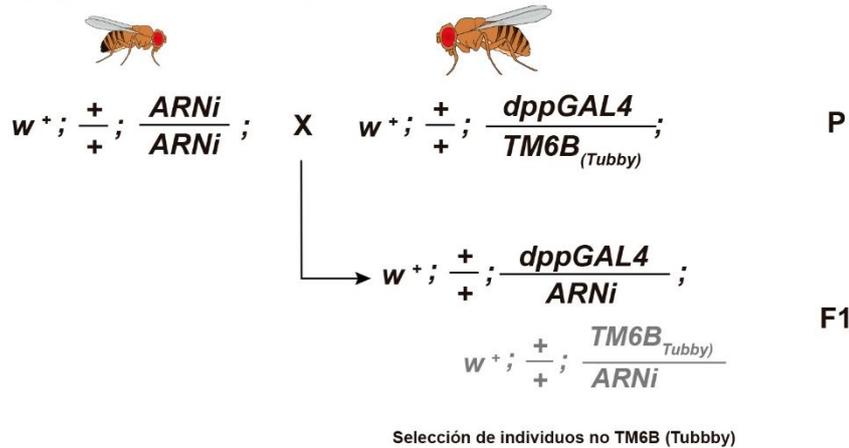
$\frac{Dpp^{GAL4}}{TM6B}$. Las líneas de UAS-ARNi empleadas en esta tesis proceden del repositorio de *Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC)*, Viena (Austria) y se recogen en la tabla M.1.

Tabla M.1: Líneas de *Drosophila* portadoras de secuencias de ARNi

Gen diana	VDRC ID	Librería	Gen diana	VDRC ID	Librería
<i>Mwh</i>	41514	GD	<i>Drok</i>	3793	GD
	45265	GD		104675	KK
<i>Fritz</i>	40088	GD	<i>Rac1</i>	49247	GD
	103611	KK	<i>Cdc42</i>	100794	KK
<i>Inturned</i>	27252	GD	<i>Dachsous</i>	4313	GD
	103407	KK		12555	GD
<i>Rho</i>	51952	GD	<i>Dachs</i>	32142	GD
	107502	KK	<i>Four Jointed</i>	6774	GD
<i>Fuzzy</i>	108550	KK	<i>Fat</i>	9396	GD
<i>Daam1</i>	24885	GD		108863	KK
	103921	KK			

Una vez seleccionadas las líneas que provocaron alteraciones en la orientación y/o el número de quetas de actina, se realizaron cruces entre éstas y una línea que contenía la proteína fluorescente GFP en fase con la proteína centriolar Sas4 (Sas4-GFP), además del *driver Dpp-Gal4* con el fin de detectar la localización de los centriolos (Figura M.2 b). Esta línea Sas4-GFP; *DppGal4* fue cedida por el laboratorio de Jordan Raff. Para el estudio del papel de actina en el posicionamiento de los centriolos (tratamiento con citocalasina D) se utilizó la línea *UAS-GFP-CG2919* (AsI), con la proteína centriolar Asterless en fase con GFP, que fue cruzada con la línea *UAS-dcr²; nub-Gal4* como se esquematiza en el panel a de la figura M.3, para dirigir la expresión de *Asterless-GFP* en toda el ala.

a Cruces para el cribado de fenotipos:



b Cruces para el estudio de la distribución de centriolos:

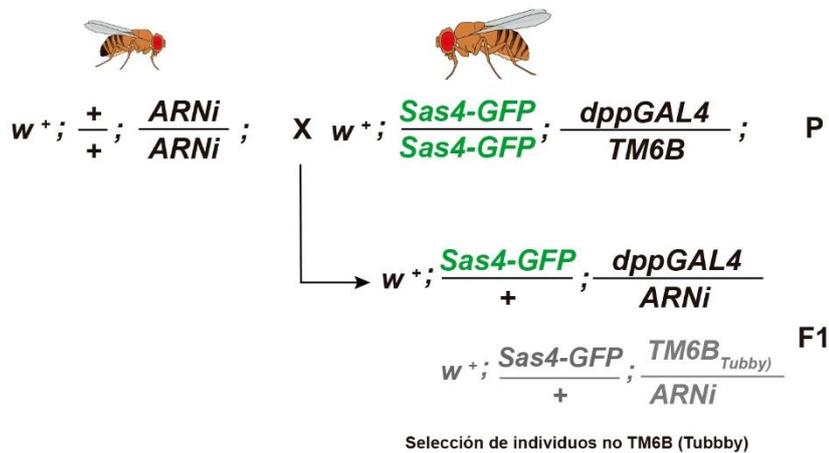


Figura M.2: Representación esquemática de los cruces de *Drosophila* realizados para el cribado de fenotipos (a) y el análisis de la distribución de centriolos (b). w^+ : ojos rojos, +: alelo silvestre, P: generación parental, F1: Descendencia.

1.4 Obtención de alas de *Drosophila*

En esta tesis se utilizaron las alas de individuos adultos para el cribado inicial en busca de fenotipos de PCP, y alas de pupas colectadas en distintos estados de desarrollo para estudiar la distribución de los centriolos.

Las alas de adulto se diseccionaron a partir de los individuos procedentes de los distintos cruces, entre 24h y 48h después de la eclosión de la pupa, para garantizar así el buen estado del ala. Los individuos fueron anestesiados con CO₂ y las alas colectadas bajo lupa binocular con ayuda de pinzas. Una vez obtenidas, las alas fueron lavadas en PBS (Fisher B. #BP2944) con tritón (0,1% v/v, Sigma, #T9284) (PBS-t) y montadas en cubres con glicerol 80% (Panreac, #122329) para su observación.

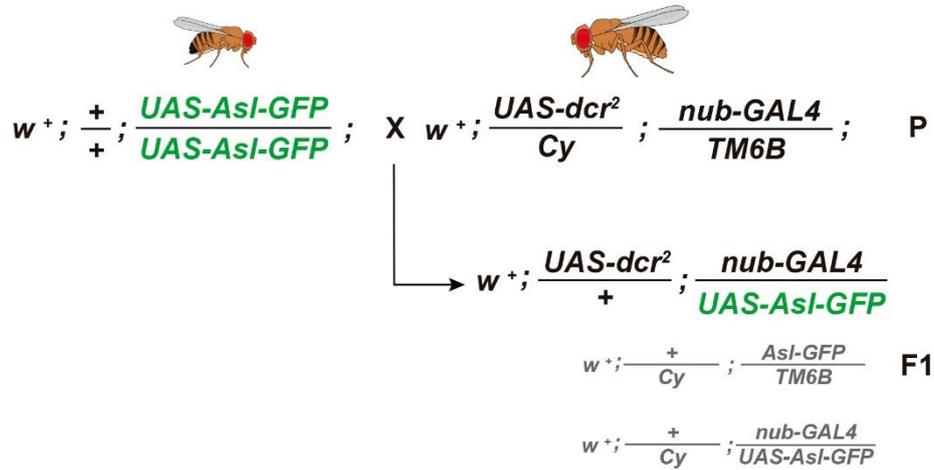
Para obtener las alas de moscas en desarrollo se controló el momento en el que los individuos en fase larval entraron en fase pupa, y se colectaron éstas con la ayuda de un pincel humedecido. Las pupas se incubaron durante 25h o 28'5h a 29°C en función del estado de desarrollo requerido para cada experimento y, transcurrido este tiempo, éstas se colocaron sobre una superficie adhesiva para su disección bajo lupa binocular. Una vez inmovilizadas, realizamos una incisión en la zona anterior de la pupa, por encima del tórax, y otra en la zona posterior del abdomen, tal y como se esquematiza en el panel b de la figura M.3. Con unas pinzas, tomamos al individuo por el extremo anterior y lo separamos del pupario, transfiriendo las moscas a un recipiente con PBS-t 0,1%. Con ayuda de una pipeta, lavamos el interior de la mosca pasando el PBS a través del cilindro de tejido restante, mientras lo inmovilizamos pinzando por la zona anterior. Tras la limpieza, las muestras fueron transferidas a un tubo eppendorf con paraformaldehído 4% (*Polysciences, #18814-20*) durante 1h para su fijación. Después, de nuevo en el recipiente y con la ayuda de una pinza de precisión, se retiró cuidadosamente la cutícula que envuelve al tejido, para hacerlo así accesible a los distintos marcajes. Finalmente, las muestras fueron transferidas a un tubo eppendorf con PBS-t para proceder a la inmunofluorescencia.

1.5 Tratamiento con Citocalasina D

Las pupas procedentes del cruce de *UAS-Asl-GFP* y *UAS-dcr²; nub-Gal4*, que se muestra en el esquema del panel a de la figura M.3 fueron colectadas tras la transición larva-pupa como se ha descrito en el apartado anterior, e incubadas durante 25h a 29°C. Transcurrido este tiempo, las pupas fueron extraídas del pupario siguiendo los pasos anteriormente descritos, y colocadas en un recipiente con medio de cultivo SSM3 (*Sigma, #S3652*) para su limpieza. Una vez limpias, las muestras se transfirieron individualmente a tubos de 200µl y fueron incubadas durante 10h a 29°C en medio SSM3 suplementado con la hormona ecdisona (*Sigma, #E9004*) a una concentración de 100ng/µl para promover el desarrollo. Este procedimiento se muestra en el esquema del panel b de la figura M.3. Para la inhibición de la polimerización de actina, esta incubación se realizó en presencia de 5ng/µl de citocalasina D (*Sigma, #C2618*), mientras que en las muestras control se añadió PBS al medio de cultivo. Una vez transcurridas las

10h, las muestras se lavaron con PBS-t 0,1% y se fijaron con paraformaldehído 4% durante 1h, para proceder después al marcaje mediante inmunofluorescencia.

a Cruces para el estudio de la distribución de centriolos en el tratamiento con Citocalasina D:



Selección de individuos no TM6B (Tubby) y no Cy (Curly)

b

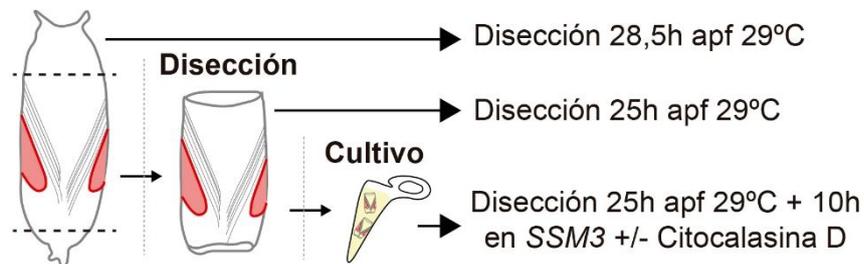


Figura M.3: Cruces realizados para el estudio de la distribución de centriolos tras el tratamiento con citocalasina D (a) y representación esquemática del cultivo *in vitro* de pupas de *Drosophila* (b).

1.6 Inmunofluorescencias en alas de *Drosophila*

La localización celular de los centriolos fue analizada mediante inmunofluorescencia (IF), técnica que permite la detección de una o varias proteínas específicas en una muestra mediante el uso de anticuerpos conjugados con fluoróforos. Concretamente, para caracterizar el posicionamiento de un centriolo en el interior celular es necesario marcar tanto el centriolo como el contorno de la célula que lo contiene. Para ello, las pupas de *Drosophila* fueron procesadas como se detalla en el apartado 1.4, y una vez colectadas y fijadas, las muestras fueron incubadas en PBS-t con albúmina de suero bovino (BSA, Roche, #10735094001) al 2% (p/v) (PBS-BSA-t) durante 45 minutos a temperatura ambiente, para bloquear las uniones inespecíficas de los

anticuerpos. Para marcar la membrana de las células epiteliales del ala, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario anti-Flamingo (*DSHB clone 74, mouse*), utilizado a una dilución 1:20. Esta incubación fue realizada a 4°C durante toda la noche.

Transcurrido este tiempo, las alas se lavaron con PBS-t (cinco lavados de 10 minutos), y se realizó una incubación de 1h en oscuridad con el anticuerpo secundario anti-mouse Alexa-Fluor 405 (*Invitrogen, #A31553*) diluido 1:500 en PBS-BSA-t. En esta misma solución se preparó el marcaje de F-actina, que utilizamos para detectar las quetas de las células del ala de *Drosophila*. Para este marcaje se utilizó Faloidina-Alexa 594 (*Invitrogen, #A12381*) 1:500, que permite su visualización mediante microscopía de fluorescencia. Una vez transcurrida esta incubación, las muestras fueron lavadas con PBS-t (seis lavados de 10 minutos), y posteriormente fueron separadas del resto del tejido. Por último, las alas fueron colocadas sobre un portaobjetos con ayuda de una pinza y montadas en medio de montaje *Vectashield* (*Vector laboratories, #H1000*). Los distintos marcajes utilizados se muestran en el esquema de la figura M.4.

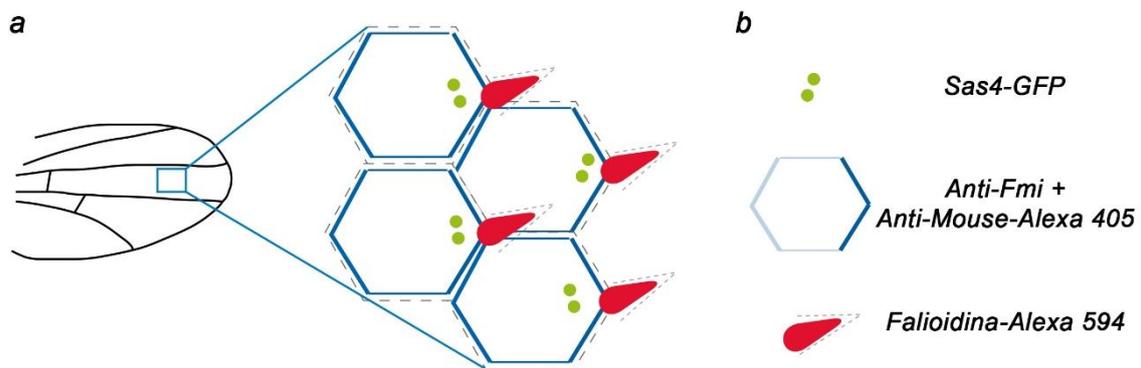


Figura M.4: Esquema de los marcajes de fluorescencia realizados para el estudio de la distribución de los centriolos.

1.7 Adquisición y procesamiento de imágenes de microscopía

Como hemos mencionado anteriormente, en esta tesis utilizamos alas de adulto para el cribado inicial en busca de fenotipos de PCP y quetas múltiples, y alas de pupas para el estudio de la distribución de centriolos. Para las alas de adulto se empleó microscopía de luz transmitida, utilizando el microscopio óptico *Olympus BX51*, de la Unidad de Microscopía del Servicio de Técnicas Aplicadas a las Biociencias (STAB) de la universidad de Extremadura. Las imágenes fueron adquiridas a tres aumentos distintos

(4X, 10X y 20X) con la cámara *Olympus DP72*, y procesadas con el software *CellID* (*Olimpus*) y *Adobe Photoshop CC 2015*.

La adquisición de imágenes de inmunofluorescencia en alas de pupas se llevó a cabo mediante microscopía de fluorescencia confocal. Se utilizaron los objetivos 20X y 40X del microscopio *Olympus FV 1000*, con un zoom 2x y una resolución de imágenes de 1024x1024. Las imágenes adquiridas fueron seleccionadas utilizando el software *ImageJ* para identificar las áreas que presentasen defectos relacionados con PCP. Estas imágenes fueron separadas en canales, y se utilizó el marcaje de la proteína Flamingo para delimitar el contorno de las células mediante el *plugin* de *ImageJ Tissue Analyzer*, creando así una máscara que fue después utilizada en el análisis con nuestro software. Para identificar el centriolo, se utilizó la señal de la construcción de *Sas4-GFP*, y para detectar células con quetas múltiples utilizamos el marcaje con faloidina. Para el análisis con el método RPCD, que se detalla más adelante, utilizamos *Adobe Photoshop CC 2015* para identificar, mediante un código de colores, el nivel de alteración fenotípica de cada célula teniendo en cuenta el número de quetas.

1.8 Métodos para el análisis de la distribución de centriolos

En este trabajo se utilizaron tres métodos distintos para analizar la distribución de los centriolos en el interior celular, una vez procesadas las imágenes de microscopía confocal como se ha detallado anteriormente. El primero de estos métodos, conocido como ABP (*Average Basal Body Position*), mide la polarización de los centriolos en una dimensión. Mediante el cálculo de la distancia del centroide de los centriolos al centroide de la célula, se asigna el valor -1 la coordenada más proximal de la célula, 0 el centroide celular, y 1 la coordenada más distal, como se esquematiza en el panel a de la figura M.5. Mediante el análisis con un software específico basado en MATLAB podemos extraer los valores para cada célula en una región de interés y calcular la media de estos valores, para comparar así la polarización de los centriolos. Los valores más altos (más cercanos a 1), representan centriolos polarizados distalmente, mientras que los valores cercanos a 0 representarían centriolos no polarizados.

El segundo método utilizado se denomina método Q (del inglés *Quartile*), y en él, cada célula analizada se divide en cuatro cuartiles de igual área, y cada centriolo es

asignado a un cuartil determinado en función de su posición. Posteriormente se cuantifica el número de centriolos presentes en cada cuartil para una población de células determinada. Los cuartiles en los que se divide cada célula quedan definidos mediante el trazado de dos líneas imaginarias, que unen el centroide con los puntos $\pi/4$ y $-\pi/4$, definiendo los cuatro cuadrantes (Figura M.5 b). Si el centriolo está localizado en el cuartil comprendido entre los ángulos $\pi/4$ y $-\pi/4$, se le asigna el Q1, entre los ángulos $\pi/4$ y $3\pi/4$ será la región Q2, entre $3\pi/4$ y $-3\pi/4$ se le asigna la región Q3, y, por último, el resto de los centriolos son asignados al Q4.

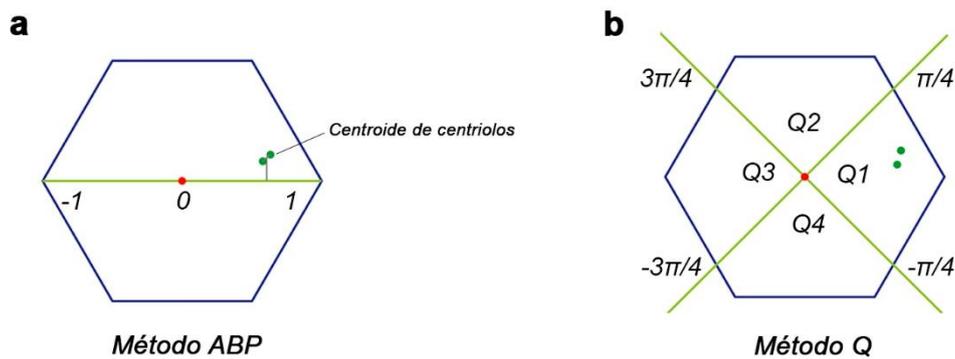


Figura M.5: Esquema de los métodos de cuantificación de centriolos ABP (a) y Q (b).

El tercer método de cuantificación, denominado sistema RPCD, del inglés *Representative Polarized Centriole Distribution*, fue específicamente diseñado durante el desarrollo de este trabajo, y se recoge más detalladamente en el apartado de resultados (Figura RI.9). Este método está basado en el desarrollo de una librería de imágenes de células con centriolos correctamente posicionados, obtenidas de células del ala de pupas silvestres e incubadas durante 28,5h a 29°C. Mediante esta librería de imágenes se generó un mapa de densidad de posiciones de centriolos acumulados sobre una célula modelizada, que representa la distribución silvestre de los centriolos en las células epiteliales del ala de *Drosophila*. Este mapa de densidad se segmentó utilizando líneas imaginarias concéntricas, dentro de las cuales la probabilidad de encontrar un centriolo es la misma, a las que denominamos isolíneas. Los centriolos encontrados dentro de cada isolínea pueden ser comparados entre distintas condiciones experimentales. Concretamente, para un número determinado de células, la distribución de centriolos cubierta por cada isolínea puede confrontarse con la librería de células silvestres, obteniendo así un ratio observado/esperado, ($R_{0,05}$) que será

próximo a 1 en el caso de células con los centriolos polarizados, y menor que 1 si la distribución de los centriolos se encuentra alterada. El flujo de trabajo seguido para el desarrollo de este sistema de cuantificación se esquematiza en la figura M.6.

Método RPCD

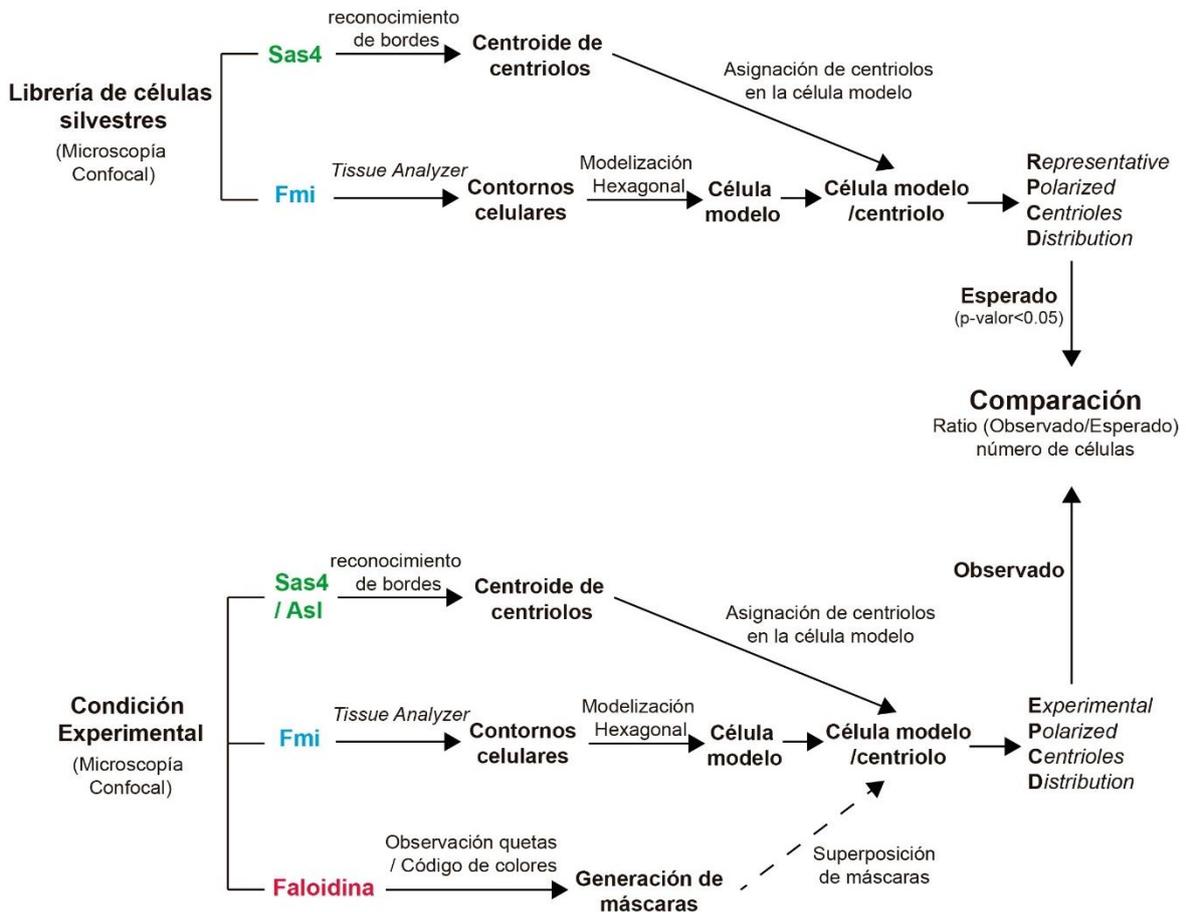


Figura M.6: Flujo de trabajo para el análisis de la distribución de los centriolos mediante el sistema RPCD.

2. Modelo murino

Para el estudio del papel de p53 y MDM2 en la diferenciación del epitelio respiratorio de vertebrados utilizamos tanto células progenitoras de la tráquea de ratón como células de bronquio humano. Los ratones empleados en esta tesis doctoral fueron obtenidos en el Centro Usuario de Animales de Experimentación de Cáceres. Todos los individuos presentaban un fondo genético *wild-type* C57BL/6J, y las células fueron aisladas a partir de ejemplares adultos y sanos, tanto hembras como machos.

2.1 Obtención de las células progenitoras de tráquea de ratón

Para la obtención de las células progenitoras de las vías respiratorias de ratón, los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical, prestando especial atención a no dañar el tejido de la tráquea en este paso. Una vez sacrificados, los ratones se inmovilizaron y se rociaron con etanol 70% (*Panreac, #131086.1211*) para prevenir contaminaciones. Posteriormente, se realizó una pequeña incisión en la piel por debajo del esternón, y con ayuda de las tijeras, se separó la piel del tejido conjuntivo para después cortarla longitudinalmente, dejando así visible la caja torácica y la región donde se sitúa la tráquea. Tras esto, realizamos un corte en el tejido muscular que rodea la tráquea y una vez liberada, la separamos mediante un corte transversal por encima de la laringe y otro por encima de los pulmones, obteniendo una sección de aproximadamente 7.5mm que transferimos a un tubo con medio Ham's F12 (*Gibco, #11765-054*) suplementado con penicilina/estreptomicina (P/S, *Gibco, #15140-122*) al 1% a 4°C mientras continuamos con el resto de las disecciones. Una vez aisladas, las tráqueas fueron transferidas a una placa Petri con el mismo medio y se limpiaron bajo lupa con la finalidad de retirar vasos sanguíneos y tejido conectivo adherido a la tráquea. Posteriormente, se eliminó la laringe y se abrió la tráquea longitudinalmente.

Tras la extracción y la limpieza de las tráqueas, las secciones se transfirieron a un tubo estéril y se incubaron toda la noche en agitación en una solución de pronasa (*Roche, #10165921001*) a 1.5mg/ml diluida en medio Ham's F12 con P/S 1%, para disgregar el tejido (utilizamos 15ml de medio para 20 tráqueas). Transcurrido este tiempo, añadimos a la suspensión del medio con las células el 10% de suero fetal bovino (*Fetal Bovine Serum, FBS. Gibco, #10500-064*) para detener la digestión con pronasa. Después, se colectó el medio y los restos de tejido de las tráqueas fueron lavados con medio Ham's F12 para recuperar más células, transfiriendo todo el sobrenadante a un mismo tubo, y centrifugándolo a 1000xg durante 5 minutos. Una vez centrifugadas, las células se resuspendieron en Ham's F12 con DNAsa de páncreas bovino (*Sigma, #DN25*) a 0,5mg/ml, y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos para eliminar las hebras de ADN en las que pueden quedar retenidas las células (utilizamos 10ml para las células obtenidas de 20 tráqueas). Tras la digestión, se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones, y resuspendimos las células en medio de expansión de células

respiratorias, *Pneumacult ExPlus* completo (*StemCell*, #05041), añadiendo 3ml por cada placa de cultivo utilizada. Este medio se suplementó con inhibidores de la ruta de TGF β /SMAD para inhibir la diferenciación de las células basales, así como para promover la proliferación: 1 μ M DMH-1 (*Tocris*, #4126) y 1 μ M A83-01 (*Tocris*, #2939). Además, se añadió el inhibidor de apoptosis Y-27632 (*StemCell* #72304) a una concentración de 10 μ M.

Esta suspensión de células se sembró en placas de cultivo primario *Primaria plates* (*Corning* #353802) para favorecer la rápida adhesión de los fibroblastos procedentes del tejido conectivo, y así retirarlos de nuestra suspensión celular. Utilizamos dos placas *Primaria plate* para las células procedentes de 20 tráqueas. La suspensión celular se incubó en estas placas durante 4h, manteniéndose a 37°C y al 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo, las células no adheridas se transfirieron a placas de cultivo de 60mm (*Falcon*, #353004) previamente tratadas durante al menos 4h con una solución de colágeno (*Gibco* #A10483-01) a 50 μ g/ml, preparada en ácido acético 0.02N (*Fluka*, #34254). Para expandir el cultivo celular, pasamos de las dos placas de cultivo primario a ocho placas de 60mm pretratadas, por lo que añadimos el medio de cultivo restante suplementado con los inhibidores de diferenciación y apoptosis. Dejamos que las células se adhieran durante toda la noche y transcurrido este tiempo se realizó un lavado con PBS para retirar las células muertas y un cambio de medio (*Pneumacult Explus* completo suplementado con los inhibidores). En este momento, se consideró que las células basales se encuentran en fase 0. El medio fue renovado cada dos días y las células se mantuvieron en el incubador a 37°C y al 5% de CO₂.

2.2 Cultivo primario de células de tráquea. Expansión y diferenciación

Una vez que el cultivo celular en fase 0 alcanzó una confluencia del 70-80% de la placa, en aproximadamente 4-5 días, las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron durante 15 minutos a 37°C con PBS-EDTA 0,02% (*Fisher*, #010700153) para promover la separación de las uniones célula-célula. Transcurrido este tiempo, se retiró el PBS-EDTA y se añadió acutasa (*Corning*, #25058051), que se incubó a temperatura ambiente hasta que las células se despegaron de la placa, obteniendo una suspensión celular. Finalmente, se añadió medio *Pneumacult Explus*, y la suspensión se centrifugó a

1000xg durante 5 minutos, resuspendiéndose después en el mismo medio y quedando así el cultivo preparado para la realización de los distintos experimentos.

Para promover la diferenciación del epitelio pseudoestratificado a partir de las células progenitoras de las vías respiratorias de ratón se utilizó el sistema de cultivo ALI (*Air-Liquid Interface*), en el cual las células se sembraron sobre membranas porosas fijadas a un soporte plástico en forma de cesto, que se inserta en los pocillos de una placa de cultivo multipocillo. Estas membranas porosas, también denominadas *transwells* (*Corning, #3460*), se trataron previamente con colágeno a 50µg/ml durante un tiempo mínimo de 4h, y fueron después lavadas con PBS antes de añadir la suspensión celular. Al iniciar este sistema de cultivo, la suspensión celular fue añadida en la cámara superior. En la cámara inferior se añadió *Pneumacult ExPlus*, hasta cubrir la base del soporte plástico. Las células se sembraron a una confluencia de 9×10^4 células/cm², y tras incubarlas toda la noche se renovó el medio de la cámara superior para retirar las células no adheridas. El medio de ambas cámaras fue renovado cada dos días hasta que las células tapizaron por completo la membrana porosa (unos 4 días).

Transcurrido ese tiempo, el medio de la cámara inferior fue sustituido por medio de diferenciación ALI (*Stemcell, #05002*), mientras que en el espacio superior el medio de cultivo fue retirado para simular así la organización del tejido en las vías respiratorias, donde las células están en contacto con el aire en su cara apical, y en contacto con la lámina basal del epitelio en su región más basal. Este sistema de cultivo se esquematiza en la figura M.7. El cultivo en ALI fue mantenido durante 14 días, tiempo en el que las células progenitoras completaron la diferenciación del epitelio pseudoestratificado. Durante este proceso, el medio inferior fue renovado cada 2 días.

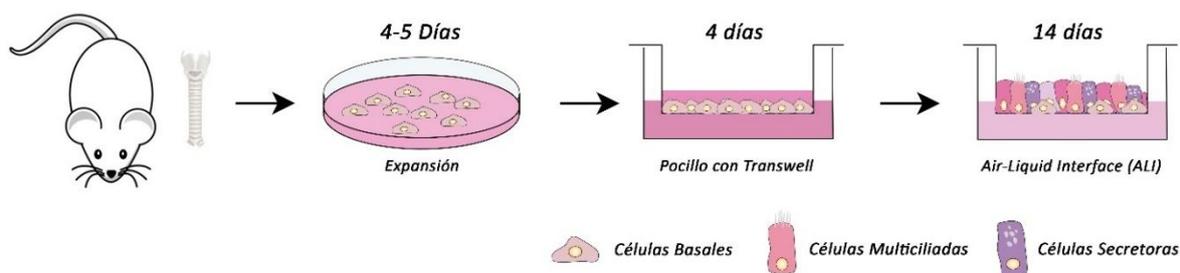


Figura M.7: Representación esquemática sistema de cultivo y diferenciación de las células progenitoras de las vías respiratorias de ratón.

2.3 Cultivos 3D: Organoides de tráquea de ratón

Para la generación de cultivos 3D a partir de células progenitoras de las vías respiratorias de ratón, las células se expandieron previamente en *Pneumacult ExPlus* suplementado con los inhibidores de diferenciación y apoptosis como se detalla en el apartado anterior. Debido a que la matriz de gel utilizada en este proceso solidifica a temperatura ambiente, fue necesario enfriar previamente la placa multipocillo donde sembramos las células, así como las puntas de pipeta y tubos Eppendorf. Antes de resuspender las células, se preparó una mezcla de matrigel reducido en factores de crecimiento (*Corning, #354230*) al 25% en medio de expansión frío. Una vez preparada la mezcla fue dispensada en los pocillos necesarios para cada experimento. Para tratar un pocillo de una placa de 96 pocillos utilizamos un volumen total de 100 μ l (25 μ l de matrigel y 75 μ l de *Pneumacult ExPlus*). Tras dispensar todos los pocillos necesarios para el experimento, la placa multipocillo fue incubada a 37°C durante 15 minutos, para dejar así que el matrigel se solidifique.

Las células fueron despegadas de las placas de expansión y se resuspendieron como se ha descrito previamente. Una vez contadas, preparamos una suspensión celular en *Pneumacult* con matrigel al 2%, suplementada con el inhibidor de apoptosis Y-27632 a 20 μ M. Esta suspensión fue dispensada sobre los pocillos con el matrigel al 25%, y transcurridas 8-16h las células se sitúan dentro de esta fase más densa. En los experimentos realizados en esta tesis se plaquearon entre 300 y 500 células para cada pocillo de una placa de 96. El medio superior se renovó cada 2 días, y las células se cultivaron durante 5 días, adquiriendo imágenes del crecimiento de los organoides para su cuantificación a día 1, 3 y 5 con el microscopio *EVOS Flouid Cell Imaging Station* (Invitrogen).

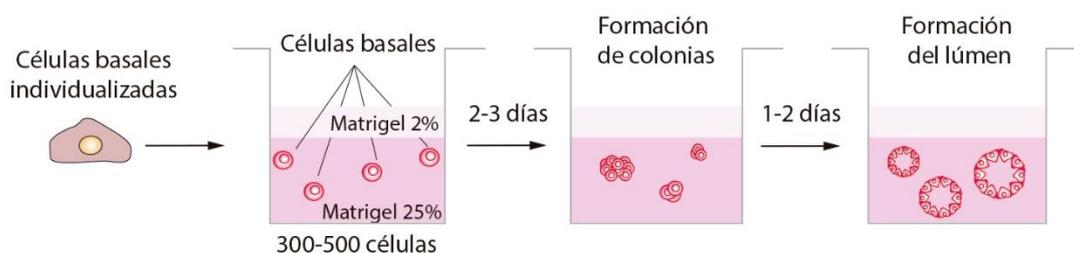


Figura M.8: Representación esquemática sistema de cultivo de organoides de las vías respiratorias de ratón.

3. Células de bronquio humano

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

3.1 Obtención y cultivo de células progenitoras de bronquio humano

Las muestras de biopsias de bronquio humano fueron recibidas en PBS, y lavadas dos veces con el mismo tampón. Una vez lavadas, se retiró el PBS y las muestras fueron resuspendidas en pronasa a 1mg/ml, preparada en medio Ham's F12 con P/S 1%, para disgregar el tejido y liberar las células progenitoras. A esta mezcla se añadió también DNAsa 0,5mg/ml, para eliminar las hebras de ADN procedentes de las células muertas. Las muestras se incubaron en esta solución durante toda la noche a 4°C, y después se centrifugaron a 1000xg durante 5 minutos. Una vez centrifugadas, se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en *Pneumacult ExPlus* con los inhibidores de diferenciación y apoptosis DMH-1 1µM, A8301 1µM y Y-27632 10µM. Posteriormente, las células sembraron en 2 placas de 60mm tratadas con colágeno a 50µg/ml. El medio fue renovado cada 2 días hasta que la monocapa de células basales alcanzó una confluencia del 70-80%, momento en el que las células se resuspendieron utilizando PBS-EDTA y acutasa, siguiendo el protocolo descrito para células de ratón y quedando así listas para utilizar en los distintos experimentos.

Para los experimentos con células diferenciadas llevamos a cabo el mismo tipo de cultivo ALI ya descrito para las células de tráquea de ratón. En este caso, los *transwells* previamente tratados con colágeno se sembraron con 5×10^4 células/cm², y el cultivo se mantuvo en medio de expansión *Pneumacult ExPlus* suplementado con los inhibidores de diferenciación y apoptosis durante aproximadamente 7 días, tiempo en el que la monocapa tapizó por completo la membrana porosa. En ese momento, se retiró el medio de la cámara superior, mientras que el de la cámara inferior fue sustituido por medio de diferenciación ALI, y renovado cada 2 días hasta que concluyó la diferenciación del cultivo, 21 días en el caso de las células humanas. Para eliminar el moco producido por el cultivo según avanzó la diferenciación, la cámara superior fue lavada cada 2 días con PBS, incubando 5 minutos a 37°C y retirándolo después. Este paso es importante

para que las células sean accesibles a los anticuerpos en los ensayos de inmunofluorescencia con células humanas.

3.2 Organoides de células de bronquio humano

El protocolo para el cultivo de organoides a partir de células de bronquio humano difiere considerablemente del seguido para las células de ratón. Para generar cultivos 3D a partir de células humanas, las células fueron expandidas hasta alcanzar una confluencia del 70-80%. Antes de resuspender e individualizar las células, se preparó una mezcla de matrigel al 40% en medio de diferenciación ALI completo en frío, y se dispensó en los pocillos necesarios para realizar el experimento. La mezcla de matrigel y medio ALI se incubó a 37°C durante 15 minutos para permitir que solidificase. Para los organoides humanos utilizamos placas multipocillo de 24 pocillos, y añadimos 500µl de la mezcla de matrigel (300µl de medio ALI y 200µl de matrigel). Una vez que se solidificó, se preparó una suspensión celular con medio ALI y matrigel al 5%. En este caso se sembraron 30.000 células en 500µl de matrigel al 5%, que fueron después dispensados sobre los pocillos con el matrigel 40% ya solidificado. El medio superior se renovó cada 2 días y los organoides se cultivaron durante 21 días. Para la cuantificación del tamaño de los organoides, las imágenes adquiridas en los distintos días de crecimiento utilizando el sistema *EVOS Flouid Cell Imaging Station* (Invitrogen) fueron procesadas con *ImageJ*.

4. Tratamientos en cultivos celulares

Los reactivos químicos empleados en esta tesis se prepararon siguiendo las indicaciones de cada fabricante. En el caso de los cultivos control, éstos fueron incubados con los volúmenes correspondientes del solvente. A continuación, se detallan los principales reactivos utilizados:

- **AMG-232** (*Biovision, #9556-1*): Inhibidor de la interacción entre la proteína p53 y su ubiquitina-ligasa MDM2. Fue utilizado en los cultivos de células del sistema respiratorio, tanto en expansión como en diferenciación, así como en cultivos 3D. Disuelto en DMSO (*Corning, #25-950*) y utilizado a 2,5µM.

- **Nutlin-3a** (*Sigma, #SML0580*): Inhibidor de la interacción entre p53 y MDM2. Fue utilizado en los cultivos de células del sistema respiratorio, tanto en

expansión como en diferenciación, así como en cultivos 3D. Disuelto en DMSO y utilizado a 2 μ M.

- **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 y utilizado a una concentración de 50 μ M.

5. Silenciamiento de proteínas en cultivos primarios

Para estudiar el papel de p53 y su ubiquitina ligasa MDM2 en las células epiteliales de las vías respiratorias, se generaron construcciones lentivirales que contenían las secuencias de ARN de interferencia (*short hairpin RNA, shRNA*), que median el silenciamiento de la expresión de estas proteínas a través de la degradación de su ARN mensajero. Para ello, se accedió a la secuencia de los transcritos de estos genes, se diseñaron las secuencias de ARN de interferencia y se clonaron en el vector lentiviral, que fue después transfectado junto a otros dos vectores de empaquetamiento en la línea celular HEK293 para la producción de lentivirus. Una vez producidos, fueron concentrados y los cultivos primarios infectados para el silenciamiento específico de nuestras proteínas.

5.1 Generación del vector lentiviral. Clonación

Las secuencias de los transcritos de *Trp53* y *Mdm2* fueron obtenidas de la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Una vez obtenidas, se utilizó la herramienta de diseño de secuencias de *shRNA* del *GPP Web Portal* (*Broad Institute*), mediante la cual se obtuvieron varias secuencias candidatas para cada uno de nuestros transcritos. Las secuencias fueron escogidas en función del nivel de silenciamiento que reportaron en la validación de éstas. Además de las regiones complementarias a nuestros transcritos, que comprenden los 21 pares de bases centrales y que generarán la horquilla de ARN, la colección del *GPP Web Portal* contiene secuencias para la clonación en el vector lentiviral comercial pLKO.1. Estas secuencias hibridan con los extremos generados por las enzimas de restricción AgeI (*New England*

Biolabs, #3552L) y *EcoRI (New England Biolabs, #31015)*, que se utilizaron en este protocolo de clonación. Se seleccionaron tres secuencias de shRNA para cada gen, que se detallan a continuación:

Tabla M.2: Secuencias para Trp53 (Código del transcrito: NM_011640.3)

shRNA 1	F	CCGGCCACTACAAGTACATGTGTAACCTCGAGTTACACATGTACTTGTAGTGGTTTTTG
	R	AATTCAAAAACCACTACAAGTACATGTGTAACCTCGAGTTACACATGTACTTGTAGTGG
shRNA 2	F	CCGGCTCCAGAAGATATCCTGCCATCTCGAGATGGCAGGATATCTTCTGGAGTTTTTG
	R	AATTCAAAAACCTCCAGAAGATATCCTGCCATCTCGAGATGGCAGGATATCTTCTGGAG
shRNA 3	F	CCGGCACACCCTGTAAGATTCTATCCTCGAGGATAGAATCTTACAGGGTGTGTTTTTG
	R	AATTCAAAAACACACCCTGTAAGATTCTATCCTCGAGGATAGAATCTTACAGGGTGTG

Tabla M.3: Secuencias para Mdm2 (Código del transcrito: NM_010786.4)

shRNA 1	F	CCGGGTGTACCTCATGCAATGAAATCTCGAGATTTTCATTGCATGAGGTACACTTTTTG
	R	AATTCAAAAAGTGACCTCATGCAATGAAATCTCGAGATTTTCATTGCATGAGGTACAC
shRNA 2	F	CCGGCGGAACAAGAGACTCTGGTTACTCGAGTAACCAGAGTCTCTTGTCCGTTTTTG
	R	AATTCAAAAACGGAACAAGAGACTCTGGTTACTCGAGTAACCAGAGTCTCTTGTCCG
shRNA 3	F	CCGGGTGACGACTATTCCCAACCATCTCGAGATGGTTGGGAATAGTCGTCACTTTTTG
	R	AATTCAAAAAGTGACGACTATTCCCAACCATCTCGAGATGGTTGGGAATAGTCGTCAC

Una vez reconstituidas a una concentración de 100µM, estas parejas de oligonucleótidos fueron anilladas siguiendo el protocolo *10878 pLKO.1 – TRC Cloning protocol* del repositorio *Addgene*:

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

Esta mezcla se incubó en el termociclador con el siguiente programa:

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

El vector lentiviral utilizado en esta tesis fue cedido por Miguel Fidalgo, y presenta una modificación sobre el vector comercial, ya que contiene la proteína fluorescente mCherry a modo de proteína reportera, con lo que podemos verificar la transfección de las células de empaquetamiento para la producción de lentivirus, así como la infección de nuestras células de las vías respiratorias.

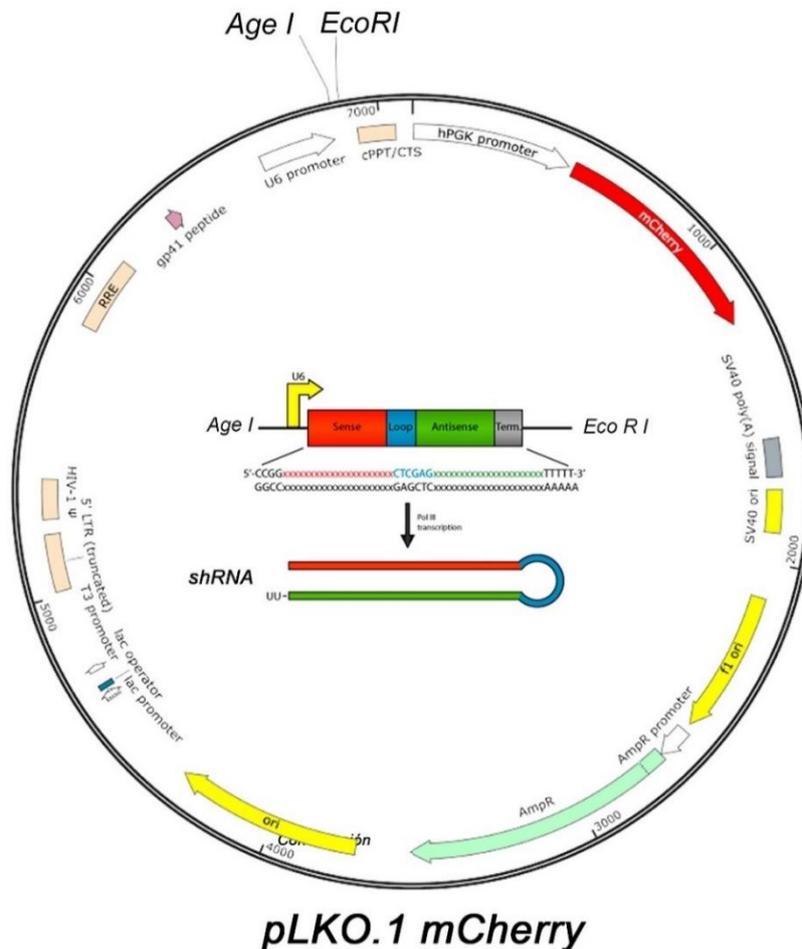


Figura M.9: Esquema del vector utilizado para la clonación de las secuencias de ARN de interferencia.

De forma simultánea al anillamiento de las secuencias de ARNi, 7,5µg del vector pLKO.1-mCherry fueron digeridos con las enzimas de restricción AgeI y EcoRI, según las especificaciones de la casa comercial, y purificados mediante el kit Nucleospin (Macherey-Nagel, #740609.250). Una vez purificado, se procedió a la ligación entre las secuencias anilladas y el vector cortado mediante el siguiente protocolo:

- 5µl de la ligación de los oligonucleótidos F+R (IDT)
- 50ng vector pLKO.1 digerido y purificado

- 10µl tampón *Quick ligase 2X* (*New England Biolabs*, #M2200L)
- 1µl T4 DNA ligasa (*New England Biolabs*, #M0201S)
- Hasta 20µl con ddH₂O

Mediante este diseño, las secuencias de ARNi quedan bajo el promotor U6, que promoverá su transcripción. El proceso fue el mismo para cada una de las construcciones de ARNi producidas, tres para p53 y otras tres para MDM2.

Tras la ligación, se transformaron bacterias competentes Stbl3 (*Thermoscientific*, #C7373-03), que fueron crecidas toda la noche en placas con ampicilina 100µg/ml (*Sigma*, #A0166-5G), y posteriormente se realizaron cultivos líquidos de éstas para proceder a aislar el ADN plasmídico utilizando el kit de purificación *Plasmid miniprep kit* (*Thermoscientific*, #K0503). Una vez purificadas, las construcciones fueron secuenciadas en el Servicio de Técnicas Aplicadas a las Biociencias (STAB) de la UEx. El cebador utilizado para la secuenciación de los plásmidos pLKO.1 fue: 5'GACTATCATATGCTTACCGT-3' (*IDT*). Tras secuenciar los fragmentos, los clones seleccionados fueron crecidos en cultivos de 100ml para extraer el ADN plasmídico por Midiprep mediante el kit *NucleoBond Extra Midi* (*Macherey-Nagel*, #740410.50).

5.2 Producción de partículas lentivirales

Para el empaquetamiento de nuestros vectores de ARNi en partículas lentivirales utilizamos la línea celular HEK293T, cedida por el laboratorio Miguel Fidalgo. Esta línea celular fue mantenida en medio DMEM (*Gibco*, #21969-c35) suplementado con FBS al 10%, además de L-Gln 1% (*Gibco*, #25030-024) y P/S 1%. El día previo a la transfección de nuestros vectores lentivirales, plaqueamos 9×10^6 de células en placas de cultivo de 150mm (*Falcon*, #353025) (tantas placas como construcciones de ARNi deseemos producir), y las dejamos crecer durante toda la noche, hasta alcanzar una confluencia del 60-70%.

Además de las construcciones generadas en el apartado anterior, para la producción de lentivirus fueron necesarias dos construcciones más: el vector psPAX2 (*Addgene*, #12260), que codifica para proteínas lentivirales de empaquetamiento (Gag-Pol-Rev), y el vector pMD2.G (*Addgene*, #12259), que contiene la información para generar proteínas de la envoltura vírica (VSV-G). En los experimentos de silenciamiento

con ARNi, se utilizó como control negativo un vector lentiviral que contiene como diana una secuencia del gen de *Photinus pyralis* que codifica para la proteína Luciferasa (GenBank nº M15077), además de la proteína fluorescente *mCherry*, vector que fue cedido por el laboratorio de Miguel Fidalgo.

Una vez que el cultivo celular alcanzó la confluencia deseada, se utilizó el método de la polietilenimina (PEI) (*Sigma*, #919012) para cotransfectar las construcciones necesarias para la producción de lentivirus. Para ello se preparó una mezcla de los vectores lentivirales pMD2.G y psPAX2 en NaCl (*Panreac*, #131659.1214) 150mM, además de la construcción generada para cada uno de nuestros ARNi. En nuestro caso, preparamos 1'6ml de NaCl 150mM en los que resuspendimos 20µg tanto del vector de empaquetamiento como del de envoltura, y 40µg para las construcciones de pLKO.1-ARNi. En otro tubo con en el mismo volumen de NaCl se añadieron 16µl de PEI 5X, que se mezclaron con la solución de ADN anterior y, tras incubar 30 minutos a temperatura ambiente, se dispensaron por goteo sobre el medio de cultivo fresco de las placas de HEK293T. Las células se incubaron a 37°C y al 5% de CO₂ durante toda la noche y transcurrido este tiempo el medio fue reemplazado por medio fresco.

Tras otras 24h de incubación (48h desde el momento de la transfección), el medio fue colectado y este sobrenadante con nuestras partículas víricas se concentró mediante centrifugación en los filtros *Amicon Ultra 100KDa* (*Merk* #UFC910096) durante 30min a 3.500xg. Los concentrados de lentivirus fueron alícuotados en volumen reducido (75µl) para evitar ciclos de descongelado-recongelado. Este proceso fue realizado también 72h después de la transfección, obteniendo así nuestro concentrado de lentivirus listo para infectar en los cultivos de interés.

La titulación de las partículas lentivirales se realizó utilizando el kit *UltraRapid Lentiviral Global Titer Kit* (*SBI* #LV961A-1), que se basa en la extracción de ARN de células infectadas para evaluar, mediante qPCR, la proporción de células infectadas a través del análisis de secuencias específicas de la construcción que se integran en el ADN celular. El título de partículas lentivirales en nuestros concentrados fue establecido en aproximadamente 1×10^6 partículas infectivas/ml.

5.3 Transducción con lentivirus y selección de los cultivos celulares

Las partículas víricas producidas fueron utilizadas para el silenciamiento de p53 y MDM2 en cultivos de células progenitoras de las vías respiratorias de ratón, inicialmente expandidas como se detalla en el apartado 2.2. Una vez crecidas, las células se resuspendieron y se contaron, preparando una suspensión de 25.000 células en 100µl de *Pneumacult ExPlus*. Se emplearon 25µl de cada concentrado de lentivirus, que fueron utilizados conjuntamente para cada proteína, de tal forma que el volumen total de lentivirus añadido a nuestra suspensión celular fue de 75µl. 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): $0.075\text{ml de concentrado} \times 10^6 \text{ partículas víricas/ml} = 75.000 \text{ partículas víricas añadidas a las } 25.000 \text{ células}$, lo que nos da un MOI de 3. Además, para incrementar la eficiencia de la infección, se añadió polibrene (*Sigma, TR-1003*) a una concentración de 8µg/ml, un polímero catiónico que actúa neutralizando la repulsión de cargas entre el virus y la membrana plasmática. Una vez añadido el polibrene, la mezcla fue homogeneizada e incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos. Tras la incubación, se centrifugó la suspensión celular durante 5 minutos a 1000xg para favorecer más la interacción célula-virus, y las células se resuspendieron en el mismo medio, añadiendo 2,5ml de *Pneumacult ExPlus* con polibrene y sembrando las células en placas de 60mm previamente tratadas con colágeno como se describió anteriormente.

Transcurridas 16-18h desde la infección, el medio fue renovado y las células se incubaron durante toda la noche. Después de este tiempo, se procedió a seleccionar las células que habían sido infectadas, para lo que utilizamos puromicina (*MP Biomedicals, #100552*) a una concentración de 3µg/ml. La selección se mantuvo durante 48h, renovando después el medio a *Pneumacult ExPlus* sin selección durante 24h más. Transcurrido este tiempo, se comprobó la eficiencia de infección analizando la fluorescencia procedente de la proteína reportera mCherry. Una vez seleccionadas, las células fueron utilizadas para los distintos experimentos.

6. Sobreexpresión de p53 en cultivos primarios

Con el fin de estudiar el efecto de la sobreexpresión de p53 en la proliferación y diferenciación de nuestro cultivo primario de epitelio de las vías respiratorias, se

generaron partículas lentivirales que se utilizaron para dirigir la sobreexpresión de esta proteína en las células infectadas. Además, se utilizó también la construcción de p53 R175H, una mutación que afecta a la actividad transcripcional de esta proteína. Como control se utilizó una construcción sin el inserto para p53. Los vectores lentivirales utilizados para la sobreexpresión fueron adquiridos comercialmente en el repositorio *Addgene*: *pLenti6/V5-p53-WT* (plasmid #22945), *pLenti6/V5-p53-R175H* (plasmid #22936). Estos vectores contenían la etiqueta proteica V5 en fase con p53, además de resistencia a blasticidina (*Gibco*, #A11139-03) para su selección en células de mamífero.

La producción de las partículas lentivirales se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 5.2, utilizando los vectores pMD2.G y psPAX2 para el empaquetamiento y la envoltura, y siendo sustituidas las construcciones de ARNi por los vectores lentivirales *pLenti6*. Tras la cotransfección de la línea HEK293T, los sobrenadantes de 48h y 72h fueron colectados, modificando el protocolo de concentración de partículas víricas. En este caso, los sobrenadantes se concentraron por centrifugación, utilizando un gradiente discontinuo de sacarosa. Para ello, los 25ml de medio colectados se dispensaron sobre un tubo Falcon de 50ml que contenía 6,5ml de sacarosa 10% a 4°C. Los tubos se centrifugaron a 10.000xg durante 4h a 4°C, y una vez centrifugados, se retiró el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en 250µl de PBS, quedando así listos para su utilización.

La infección se realizó como se describe en el apartado 5.3, variando la cantidad de células utilizadas, 30.000 en este caso, y los volúmenes de virus, ya que en este protocolo de infección utilizamos 100µl de los concentrados para incrementar el número de células infectadas. La titulación, que se realizó con el kit anteriormente descrito, aportó una concentración de 2×10^6 , y la MOI fue de 6.67. Una vez que la suspensión celular para cada construcción estaba lista para sembrar, se plaqueó en una placa de 35mm (*Corning* #430165) previamente tratada con colágeno. Tras 24h se renovó el medio y la selección se realizó durante 72h con blasticidina a una concentración de 5µg/ml. Las células crecieron sin selección durante otras 72h quedando así listas para los distintos experimentos.

7. Inmunofluorescencias en células de las vías respiratorias

La localización subcelular de las proteínas estudiadas en este trabajo de tesis, así como sus niveles de expresión, fueron analizados mediante inmunofluorescencia (IF). Esta técnica se realizó en cultivos de células de las vías respiratorias de ratón y humano sembradas sobre *transwells*.

Para realizar los marcajes, las muestras fueron inicialmente lavadas utilizando PBS Ca⁺²/Mg⁺² para preservar así las uniones célula-célula. Tras esto, las células se fijaron con PFA 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente, lavando después las muestras dos veces con PBS-Tritón 0.1% (PBS-t) durante 10 minutos. Tras el lavado, las membranas porosas sobre las que crecieron las células fueron separadas de los soportes con ayuda de un bisturí y colocadas en oscuridad en una cámara húmeda. Las muestras fueron entonces bloqueadas con PBS-t- BSA al 2% durante 45 minutos, y posteriormente incubadas con los anticuerpos primarios recogidos en la tabla M.4, preparados en la solución anterior a 4°C durante toda la noche.

Tabla M.4: Anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas por inmunofluorescencia

Anticuerpo primario	Dilución	Fuente	Casa Comercial, Referencia
Anti-p53	1:100	Ratón	<i>Cell Signaling, #2524s</i>
Anti-MDM2	1:100	Ratón	<i>Santa Cruz, #86934s</i>
Anti-p63	1:200	Conejo	<i>Abcam, #124762</i>
Anti-SCGB1A1	1:50	Cabra	<i>Santa Cruz, #sc9772</i>
Anti-p73	1:200	Conejo	<i>Cell Signaling, #14620s</i>
Anti-FOXJ1	1:200	Ratón	<i>Invitrogen, #14-9965-82</i>
Anti-MUC5AC	1:100	Ratón	<i>Invitrogen, #MA5-12178</i>
Anti-Acetil Tubulina	1:200	Ratón	<i>Sigma, #6793</i>
Anti-V5	1:200	Ratón	<i>Sigma, #V8012-50UG</i>
Anti-mCherry	1:200	Conejo	<i>Invitrogen, #9A5-34974</i>

Una vez transcurrido este tiempo, las muestras se lavaron con PBS-t durante 1h (seis lavados de 10 minutos), quedando listas para el marcaje con los anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos (tabla M.5), preparados también en PBS-BSA-t.

En esta misma solución se preparó, cuando fue necesario, la Faloidina fluorescente, así como el marcaje de los núcleos con DAPI (*4',6-diamidino-2-fenilindol*, *Sigma*, #62248) a una concentración de 0,3µM. Tras 1h de incubación a temperatura ambiente, las muestras se lavaron con PBS-t durante 1h, y los filtros fueron montados sobre portaobjetos utilizando el medio *Vectashield*, quedando listos para la adquisición de imágenes.

Tabla M.5: Anticuerpos secundarios utilizados para la detección de proteínas por inmunofluorescencia

Anticuerpo secundario	Dilución	Fuente	Casa Comercial, Referencia.
Alexa-Fluor 568 Anti-Rabbit	1:500	Cabra	<i>Invitrogen</i> , #A11036
Alexa-Fluor 488 Anti-Rabbit	1:500	Cabra	<i>Invitrogen</i> , #A21206
Alexa-Fluor 594 Anti-Goat	1:500	Burro	<i>Invitrogen</i> , #A11058
Alexa-Fluor 594 Anti-Mouse	1:500	Cabra	<i>Invitrogen</i> , #A11031
Alexa-Fluor 488 Anti-Mouse	1:500	Cabra	<i>Invitrogen</i> , #A11001

8. Adquisición y análisis de imágenes de microscopía

La adquisición de imágenes de IF se llevó a cabo en la Unidad de Microscopía del Servicio de Técnicas Aplicadas a las Biociencias (STAB) de la universidad de Extremadura. Se utilizó el sistema de microscopía confocal *Olympus FV 1000*, y las imágenes fueron procesadas utilizando los softwares *ImageJ* y *Adobe Photoshop CC 2018*.

Las imágenes obtenidas de los cultivos de células de las vías respiratorias fueron procesadas para cuantificar las poblaciones celulares, para lo que se utilizó la señal procedente del marcaje con anticuerpos específicos de cada tipo celular. Las áreas para cuantificar fueron definidas a partir de las imágenes obtenidas con el objetivo 40X del microscopio *Olympus FV 1000*, con un zoom 2x y una resolución de 1024x1024. Las imágenes se separaron por canales y se utilizó el software *ImageJ*. Para la cuantificación del área de los núcleos se empleó la señal procedente del marcaje con DAPI, utilizando la herramienta de *definición de forma* del mismo software.

9. Análisis de proteínas mediante *Immunoblotting* (*Western-blot*)

Para el análisis de los niveles de expresión y estados de fosforilación de proteínas se utilizó la técnica de *immunoblotting*, que consiste en la separación de proteínas en

geles de acrilamida, y su posterior transferencia a una membrana, para permitir así el marcaje con anticuerpos para su posterior detección.

9.1 Preparación de los extractos proteicos. Lisado

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

Para la preparación de los extractos, las células fueron lavadas con PBS y una vez retirado, se añadió el tampón de lisis a 4°C sobre las placas de cultivo en el caso de las células en expansión, transfiriendo después el volumen a un Eppendorf. Para los *transwells*, las membranas fueron cortadas con bisturí e introducidas en tubos Eppendorf. La lisis se realizó en agitación y a 4°C, incubando durante 1h. Una vez transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron en frío durante 30 minutos a 14.000xg para eliminar los restos de membrana y fragmentos celulares no lisados. El sobrenadante fue transferido a otro tubo y se separaron 5µl para la cuantificación de la concentración de proteínas.

9.2 Cuantificación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas de los extractos celulares se determinó por el método colorimétrico de *Bradford* empleando el reactivo *Coomassie G250* (*Bio-Rad, #5000205*) y albúmina de suero bovino (BSA, *Panreac, # A8412*) para elaborar la recta patrón. Para ello, se tomaron cantidades crecientes de BSA, desde 0,25µg hasta 2,5µg que se diluyeron en agua hasta un volumen final de 160 µl. Las muestras se prepararon en una placa de 96 pocillos, añadiendo 1 µl de extracto proteico en 159 µl de agua. Tanto en las muestras como en la recta patrón, se añadieron 40 µl de reactivo de *Coomassie*, se homogenizó y se midió la absorbancia a 595 nm en el lector de placas multipocillo *Infinite M Plex* (*Tecan*). La concentración de proteína de cada uno de los extractos se determinó por extrapolación a partir de regresión lineal determinada con la recta patrón construida con las cantidades conocidas de BSA.

9.3 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Una vez conocida la concentración de proteínas, nuestras muestras fueron mezcladas con el volumen apropiado de tampón de carga (1/5 del volumen total) para mantener así las condiciones desnaturizantes, incrementar la densidad de la muestra y permitir la visualización del frente por la adición de azul de bromofenol. Este tampón de carga contenía 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). Una vez mezcladas, las muestras de proteínas fueron incubadas a 95°C durante 5 minutos para su desnaturización térmica, quedando así listas para ser separadas en geles de acrilamida.

La separación de las proteínas en función de su peso molecular se llevó a cabo en geles de acrilamida–bis-acrilamida según el método establecido por Laemmli²¹². Para ello se preparó primero el gel inferior, con una concentración de acrilamida que osciló entre el 7,5% y el 12% en función del tamaño molecular de las proteínas de interés. Este gel estaba constituido por acrilamida 40% (18,5-30% v/v, *Alfa Aesar, #J60868*), Tris 1,5M 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*). Una vez polimerizado, se preparó el gel superior, con la misma composición, pero una menor concentración de acrilamida (4%), y utilizando Tris 0.5M pH 6.8 en lugar del Tris 1,5M. Se cargaron alícuotas de entre 10 μ g y 40 μ g, además del marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Standards* (*Bio-Rad, #161-0374*) y la electroforesis se realizó en tampón Tris/Glicina/SDS (*Fisher, #BP13414*). Se empleó un voltaje constante inicial de 75V hasta el empaquetado del frente, modificándose después a 125V. Se utilizó el sistema de electroforesis *Miniprotean 3* (*Bio-Rad*), y la fuente de alimentación *Power Pac 300* (*Bio-Rad*).

9.4 Electrotransferencia en húmedo

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas separadas en el gel se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (*Bio-Rad, #1620112*) por aplicación de un campo eléctrico en una cubeta con tampón de transferencia compuesto por Tris 25 mM, Glicina 1,9M y metanol al 20% (v/v). La transferencia se realizó a 4°C aplicando una intensidad de campo eléctrico constante de 1000mA totales por membrana en cada cubeta. Se utilizó la fuente de alimentación *Consort EV261* (*Bio-Rad*). Las membranas se

tiñeron con el colorante reversible *Pounceau S.* (Sigma #P7170) con el fin de comprobar la eficacia de la transferencia y la homogeneidad de carga para las diferentes muestras. Tras esto, el colorante se retiró de las membranas mediante lavados con una solución de Tris-HCl 50mM pH 7,5 y tween-20 (0.05% v/v, Fisher #BP337) (TBS-T).

9.5 Marcaje con anticuerpos y revelado de las membranas

Antes de realizar el marcaje de nuestras proteínas con anticuerpos específicos, las membranas fueron bloqueadas con una solución de TBS-T a la que se añadió leche desnatada al 5% (p/v) con el fin de evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos. La incubación se realizó a temperatura ambiente en agitación durante 1h. Los anticuerpos primarios utilizados para la inmunodetección que se recogen en la tabla M.6 se prepararon en la misma solución de bloqueo, y se incubaron durante toda la noche a 4°C y en agitación.

Tabla M.6: Anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas mediante *western blot*

Anticuerpo primario	Dilución	Fuente	Casa Comercial
Anti-p53	1:1000	Ratón	Cell Signaling, #2524s
Anti-MDM2	1:250	Conejo	Santa Cruz, #86934s
Anti-p63	1:1000	Conejo	Abcam, #124762
Anti-P73	1:1000	Conejo	Cell Signaling, #14620s
Anti-Numb	1:1000	Conejo	Cell Signaling, #2756
Anti-Ciclina D1	1:1000	Ratón	Cell Signaling, #2978
Anti-V5	1:1000	Ratón	Sigma, #V8012-50UG
Anti-mCherry	1:1000	Conejo	Invitrogen, #9A5-34974
Anti-Vinculina	1:1000	Ratón	Sigma, #V4505
Anti-GAPDH	1:250	Ratón	Santa Cruz, #sc-365062
Anti-P-p53 (Ser9)	1:1000	Conejo	Cell Signaling, #9288
Anti-P-p53 (Ser15)	1:1000	Conejo	Cell Signaling, #9284
Anti-P-p53 (Ser20)	1:1000	Conejo	Cell Signaling, #9287
Anti-P-p53 (Ser33)	1:1000	Conejo	Cell Signaling, #2526
Anti-P-p53 (Ser46)	1:1000	Conejo	Cell Signaling, #2521
Anti-P-p53 (Ser392)	1:1000	Conejo	Cell Signaling, #9281

Anti-Ac-p53 (Lys379)	1:1000	Conejo	<i>Cell Signaling, #2570</i>
Anti-Ac-p53 (Lys382)	1:1000	Conejo	<i>Cell Signaling, #2525</i>

Transcurrido el tiempo de incubación, las membranas fueron lavadas con TBS-T cinco veces durante 10 minutos en agitación, quedando listas así para el marcaje con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con la enzima peroxidasa de rábano (HRP), recogidos en la tabla M.7. Los anticuerpos secundarios se prepararon también en solución de bloqueo, y se incubaron a temperatura ambiente durante 1h.

Tabla M.7: Anticuerpos secundarios utilizados para la detección de proteínas mediante *western blot*

Anticuerpo secundario	Dilución	Fuente	Casa Comercial
Anti-Mouse-HRP	1:1000	Cabra	<i>Cell Signaling, #7076s</i>
Anti-Rabbit-HRP	1:1000	Cabra	<i>Invitrogen #31460</i>

Tras este tiempo, las membranas de nitrocelulosa se sometieron a cinco lavados con TBS-T, y se incubaron durante 5 minutos con el sustrato quimioluminiscente *Supersignal West Dura (Thermo Scientific)*. Una vez incubadas, las membranas se revelaron utilizando el equipo *iBright CL1000 (Invitrogen)*. Como control interno, para normalizar los niveles de proteínas entre todas nuestras muestras se utilizó la inmunodetección de vinculina, así como la tinción de la membrana con *Ponceau*. La cuantificación de la señal adquirida se realizó por densitometría, utilizando el software *ImageJ*.

10. Análisis de los niveles de expresión por PCR cuantitativa

El análisis de los niveles de expresión de los distintos genes en nuestros cultivos celulares se realizó mediante la cuantificación del ARN mensajero (ARNm) presente en la muestra. Para ello fue necesario extraer el ARNm, que se sometió después a una reacción de retrotranscripción para sintetizar el ADN complementario (ADNc), utilizado como molde para la PCR cuantitativa.

10.1 Extracción de ARN

Para la extracción del ARN mensajero, los cultivos celulares fueron inicialmente lavados con PBS. La purificación del ARNm se realizó mediante el kit *ilustra RNAspin Mini*

(*GE Healthcare #2505500-71*), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit incluyó una lisis inicial, un posterior filtrado del lisado total para su precipitación con etanol 70%, la transferencia de este volumen sobre una columna de afinidad, donde se realizó una incubación con DNAsa para eliminar el ADN genómico, y tras varios lavados, la elución en agua mili-Q libre de RNAsa. Una vez purificado, se determinó la concentración de ARN midiendo su absorbancia espectrofotométrica a 260nm, así como la presencia de proteínas contaminantes mediante la relación A_{260}/A_{280} . Para ello se utilizó el equipo espectrofotométrico *BioPhotometer (Eppendorf)*.

10.2 Retrotranscripción

Para realizar la retrotranscripción del ARN mensajero al ADNc, se utilizó el kit *High-Capacity cDNA reverse transcription (Applied Biosystems, #4368814)*. Siguiendo el protocolo establecido por el fabricante, se retrotranscribieron entre 200 y 400ng de ARN totales.

En este protocolo, la cantidad de ARN establecida se lleva a 10µl de agua destilada libre de RNAsa para cada muestra. En otro tubo, de forma conjunta para todas las muestras, se prepara la mezcla del tampón 10x, los cebadores aleatorios para la enzima, la mezcla de dNTPs y la retrotranscriptasa. Una vez preparada, se añaden 10µl de esta mezcla en los tubos con el ARN, quedando listos para la reacción en el termociclador. Las muestras se incubaron primero a 25°C durante 10 minutos, después 2h a 37°C y, por último, a 85°C durante 5 minutos. El equipo termociclador utilizado fue *Veriti 96-well Therman Cycler (Applied Biosystems)*. Una vez finalizada la reacción de retrotranscripción, las muestras se diluyeron 10 veces con agua mili-Q y se utilizaron para la reacción de PCR cuantitativa.

10.3 PCR cuantitativa

El análisis de la expresión génica se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa (qPCR, *Quantitative Polymerase Chain Reaction*), utilizando el kit *PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems #A25742)*, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

Se utilizó 1µl de cada muestra del ADNc sintetizado en el paso anterior, que fue transferido a una placa de 96 pocillos (*MicroAmp EnduraPlate Optical 96-Well, Applied Biosystems, #4483354*). En un tubo a parte se preparó una mezcla de 2µl de agua mili-

Q, 2µl de la mezcla de cebadores específicos para cada gen, y 5µl de la *master mix* del kit, (9µl en total) que fueron añadidos sobre la muestra de ADNc. Se realizaron duplicados técnicos de cada gen analizado sobre la misma muestra. El protocolo de qPCR utilizado consistió en un primer paso de desnaturalización a 95°C durante 10 min, seguida de una repetición de 50 ciclos, cada uno de los cuales consistió en las tres siguientes etapas: desnaturalización del ADN a 95°C, hibridación de los cebadores al ADN molde a 60°C, y extensión de la nueva cadena de ADN, paso tras el cual es medida la señal fluorescente en cada pocillo. Una vez terminada la reacción, se incluyó un paso para analizar la temperatura de desnaturalización de cada producto de PCR, con el fin de comprobar la presencia de un único producto, validando la especificidad de nuestros cebadores. Para ello se midió la emisión de fluorescencia de *SYBR Green* durante el cambio paulatino de temperatura de 60°C a 95°C. El equipo utilizado fue el termociclador *QuantStudio 3* de *Applied Biosystems*.

Para la cuantificación, se determinó el ciclo en el que cada muestra superó un determinado umbral de fluorescencia (Ct) y la amplificación de los genes *Eif1a* y *Gapdh* se utilizó como control interno para normalizar la cantidad de ADNc inicial entre las distintas muestras, calculando así la expresión de los genes estudiados (ΔCt). La expresión relativa de los transcritos se calculó refiriendo los valores obtenidos a nuestra condición basal (sin tratamientos, no diferenciadas, etc), calculando el $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Las secuencias de los cebadores utilizados en la qPCR para los genes estudiados se diseñaron a partir de los exones obtenidos de la base de datos *Ensembl* y el software *Primer3*, y todos los oligonucleótidos fueron diseñados con una temperatura de hibridación de 60°C y un tamaño de entre 18 y 25 nucleótidos. Las secuencias para el estudio de la expresión de genes murinos se recogen en la tabla M.8.

Tabla M.8: Listado de oligonucleótidos utilizados como cebadores en qPCR en muestras procedentes de ratón

Nombre del gen	Secuencia F	Secuencia R
<i>Trp63</i>	CAGATTCAGAACGGCTCCTC	GATGGAGAGAGGGCATCAAA
<i>FoxJ1</i>	GTTTCATCCACCCATGTTCC	GTAGGACCCTTCTGGGCTTC
<i>Scgb1a1</i>	CATCATGAAGCTCACGGAGA	AGGTGAGATGCTCGAGTTT
<i>Scgb3a2</i>	TTCCCTCATTTGATCCCTTG	CACGTAGCAAAGGCTTCTCC

<i>Spdef</i>	CAGGGCCTGTCTGCTTTCTA	CATCGATTGCACCTGCTCTA
<i>Krt5</i>	CATCGATTGCACCTGCTCTA	TCCAGCAGCTTCCTGTAGG
<i>Trp53</i>	TTTTGAAGGCCCAAGTGAAG	GCCATAGTTGCCCTGGTAAG
<i>Mdm2</i>	TCGACTTCCAGCAGCATTGT	CCTGGCAGATCACACATGGT
<i>Mcidas</i>	CAGATCAAGGCAACAACGAA	TTAGGGTCACGATTGTGCAG
<i>Wrd19</i>	TCTCCCATAAGCCTTTGCTG	AGCATTTCCTCAGGTCAGT
<i>Ift81</i>	GGGCTTGGTGATTGGAAGTA	CACTTGGCACCTCCAGTTTT
<i>ID2</i>	CTCCAAGCTCAAGGAATGG	AGGCTGACGATAGTGGGATG
<i>Sox2</i>	CACAACCTCGGAGATCAGCAA	CTCCGGGAAGCGTGTACTTA
<i>Sox9</i>	CGACTACGCTGACCATCAGCAA	AGACTGGTTGTTCCAGTGC
<i>Notch1</i>	CACCTGCAGGCAAGATGTTA	AGTTCACAGTGGGGACCAGT
<i>Notch2</i>	ATCTCATCCCTGCGAAAATG	GGCATCTGTAGGAACCAGGA
<i>Dll1</i>	GGTTTGTGTGTGACGAGCAC	AGTGCAGTACTGGCCTTTCC
<i>Jag1</i>	TGCAGAACGTGAATGGAGAG	GCGGGACTGATACTCCTTGA
<i>Jag2</i>	CACACCTGGAGCTGCAGATC	TTCTTTGCCCATCCAGCCAT

Para analizar la expresión génica en muestras humanas por qPCR se utilizaron los cebadores recogidos en la siguiente tabla:

Tabla M.9: Listado de oligonucleótidos utilizados como cebadores en qPCR en muestras procedentes de humano

Nombre del gen	Secuencia F	Secuencia R
<i>TP63</i>	CAGATTCAGAACGGCTCCTC	CTGGGTAGTCGGTGTGGAG
<i>FOXJ1</i>	GAACCCCTCAAAGGCAACTT	CTCATCGAAGTCCAGGCTGT
<i>SCGB1A1</i>	CTTTCAGCGTGTGATCGAAA	TGATGCTTTCTCTGGGCTTT
<i>SCGB3A2</i>	CATCAACAAAGTGCCCCTTC	CCTCTGGTCCCAGCTCATT
<i>SPDEF</i>	GTCCGCCTTCTACCTCTCCT	GAGTGCTCCTCCAAGGTCAG
<i>KRT5</i>	CTTGTGGAGTGGGTGGCTAT	CGAAACCAAATCCACTACCG
<i>TP53</i>	GAAGACCCAGGTCCAGATGA	TTCTGGGAAGGGACAGAAGA

11. Secuenciación masiva de transcritos

Para la secuenciación masiva de transcritos, el ARN de las muestras fue extraído como se detalla en el apartado 10.1. Una vez aislado, y las muestras fueron procesadas

en el Servicio de Técnicas Aplicadas a las Biociencias (STAB) de la Universidad de Extremadura. Las lecturas fueron obtenidas utilizando el equipo *Ion Torrent (Thermo Fisher)* y posteriormente alineadas con el genoma de *Mus musculus* (mm10), normalizando las lecturas a transcritos por millón (tpm) mediante el software *Express*, con el fin de comparar la expresión génica entre las muestras. Las lecturas y el procesamiento de los datos están recogidos en el repositorio *ArrayExpress* (E-MTAB-8852).

12. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido fue utilizada para analizar la morfología, distribución y abundancia de los cilios en las células multiciliadas. Para ello, se diferenciaron cultivos de células progenitoras de vías respiratorias, y una vez diferenciadas, los *transwells* se lavaron con PBS $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$, manteniéndolos en el soporte plástico dentro de la placa multipocillo. Las células fueron fijadas durante 90 minutos a 4°C con glutaraldehído (2,5% v/v, *Sigma*, #G5882) en una solución de cacodilato sódico 0,1M (*Sigma*, #C0250). Tras la fijación, se realizaron tres lavados de 5 minutos con cacodilato sódico 0,1M, y posteriormente se incubó durante 2h a 4°C en tetraóxido de osmio (1% v/v, *Sigma*, #75632). El tetraóxido de osmio en exceso fue eliminado mediante otros tres lavados con cacodilato 0,1M, y las muestras se deshidrataron con incubaciones de 30 minutos a 4°C en concentraciones de etanol crecientes, desde el 10% hasta el 100% (v/v).

Tras la deshidratación de las muestras, la membrana porosa del *transwell* se separó del soporte plástico. A partir de este paso, las muestras fueron procesadas en el Servicio de Análisis y Caracterización de Sólidos y Superficies de la Universidad de Extremadura. El etanol en el que se encontraban los filtros *transwell* fue sustituido progresivamente por CO_2 , y éste fue retirado mediante la técnica del punto crítico para secar por completo las muestras. Una vez secas, las muestras fueron recubiertas de oro mediante pulverización catódica o *sputtering*, y visualizadas utilizando el equipo *Quanta 3D FEG (FEI Company)*. Las imágenes obtenidas fueron procesadas con los softwares *ImageJ* y *Adobe Photoshop CC 2018*.

13. Medida de apoptosis, ciclo celular y senescencia

El análisis cuantitativo de la apoptosis y el ciclo celular tras los tratamientos con AMG-232 2,5 μ M y Nutlin-3a 2 μ M sobre cultivos primarios de tráquea de ratón se llevó a cabo en el Servicio de Técnicas Aplicadas a las Biociencias de la Universidad de Extremadura mediante citometría de flujo. Para ello, se plaquearon 4x10⁵ células en placas de 12 pocillos tratadas previamente con colágeno como se detalla en apartados anteriores. Una vez adheridas, los tratamientos se mantuvieron durante 72h, y las células fueron después resuspendidas con PBS-EDTA y acutasa. Posteriormente las muestras se marcaron con Anexina-FITC (1:40 en *binding buffer* comercial, *Invitrogen*, #A131999) para marcar apoptosis, y Hoechst-42 (10 μ g/ml, *Thermo*, #62249) para analizar el ciclo celular, según las especificaciones del fabricante. Una vez marcadas, se analizaron 10.000 células en el citómetro de flujo *MACSQuant X* (*Milteny Biotec*), y los datos fueron procesados con el software *flowlogic* (*Milteny Biotec*).

Para medir los niveles de senescencia tras el tratamiento con Nutlin-3a se utilizó tanto el sustrato fluorescente de la β -galactosidasa C12FDG (*Invitrogen*, #D2893), ensayo que se realizó mediante citometría de flujo, como el kit de marcaje β -gal staining kit (*Cell Signaling*, 9860s) para su análisis por microscopía. Para el ensayo de citometría, las células en expansión fueron incubadas con Nutlin-3a 2 μ M durante 72h y transcurrido este tiempo fueron marcadas con C12-FDG a una concentración de 60 μ M y Hoechst 3358 a 10 μ g/ml (*Thermo* #H3569), para así ser analizadas en el citómetro *MACSQuant X*. El kit de marcaje β -gal staining kit se utilizó tanto para células en expansión como para cultivos diferenciados. Para las células en expansión, éstas se sembraron sobre placas de cultivo de 35mm, el tratamiento duró 72h y se siguió el protocolo especificado por el fabricante, fijando un tiempo de incubación de 18h para el tampón β -Gal stainnig. En el caso de los cultivos diferenciados, el tratamiento con Nutlin-3a se mantuvo durante toda la diferenciación y tras alcanzar el día 14 de la misma, se siguió el protocolo de marcaje del kit. Las imágenes se obtuvieron con el microscopio óptico Olympus BX51 y la cámara Olympus DP72, y se procesaron con el software *Adobe Photoshop CC 2015*.

14. Ensayo de la integridad de la monocapa celular

Para evaluar la integridad del epitelio pseudoestratificado de los cultivos *in vitro* de células de las vías respiratorias tras los tratamientos con Nutlin-3a y AMG-232, se realizó un ensayo de biotinización apical sobre las células diferenciadas.

Para este experimento se diferenciaron cultivos de células de las vías respiratorias de ratón hasta ALI 14 en presencia de AMG-232 2,5 μ M y Nutlin-3a 2 μ M. Una vez concluida la diferenciación, la placa de cultivo con los *transwells* fue transferida a hielo, se aspiró el medio y se añadió tampón salino HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution, Gibco, #14025-092*) a 4°C en las cámaras superior e inferior para lavar las células. Posteriormente se retiró el tampón de la cámara superior y se sustituyó por una solución fría de Biotina-sulfo-NHS-LC (*Thermo Scientific, #21335*) a una concentración de 2mg/ml en HBSS. En la cámara inferior se mantuvo el HBSS sin biotina. Se realizaron dos incubaciones de 20 minutos cada una y, posteriormente, las muestras se fijaron durante 30 minutos con paraformaldehído 4%, lavando después con HBSS tres veces durante 5 minutos. Tras los lavados, se incubó con Estreptavidina-Alexa 555 (1:500, *Invitrogen, #S32355*), Faloidina-Alexa 488 (1:500, *Invitrogen, #A12379*) y DAPI 3 μ M en PBS-t durante 2h a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido este tiempo, las muestras se sometieron a 4 lavados con PBS-t durante 10 minutos cada uno, y fueron montadas sobre portaobjetos utilizando el medio de montaje *Vectashield*. Las imágenes fueron adquiridas con el microscopio confocal *Olympus FV 1000* y procesadas utilizando los softwares *ImageJ* y *Adobe Photoshop CC 2018*.

15. Ensayo de *Doubling Time*

La capacidad de proliferación celular de los cultivos bajo los distintos tratamientos y silenciamientos génicos fue evaluada mediante el análisis del tiempo en el cual el número de células iniciales se duplicó, conocido como *Doubling time*. Para ello, se plaqueó un número constante de células de entre 8 y 10 x10³ en placas mutlipocillo de 12 pocillos (*Corning, #3513*) y se incubó hasta que los cultivos estuvieron a una confluencia del 70-80%, teniendo en cuenta las horas transcurridas desde la siembra. Tras esto, las células fueron despegadas y contadas para plaquear de nuevo el mismo número de células en el siguiente pase. Se utilizó la ecuación $\frac{(t_2-t_1) \log 2}{\log c_2 - \log c_1}$, donde t_2-t_1 expresa el tiempo transcurrido entre la siembra y la recolección de células, c_1 es el

número de células plaqueadas y c_2 el número de células totales recolectadas del pocillo. El cultivo fue mantenido durante al menos 6 pases y las condiciones experimentales se plaquearon por duplicado.

16. Medida de la resistencia eléctrica Transepitelial (TEER)

Las células epiteliales de las vías respiratorias fueron plaqueadas en *transwells* según se describe anteriormente. Transcurridas 24h desde la siembra y a lo largo del proceso de diferenciación, la resistencia transepitelial (*Transepithelial Electrical Resistance, TEER*) fue medida utilizando el equipo *EVOM3 (World Precision Instruments)*. Para ello el medio *PneumaCult* fue sustituido momentáneamente por medio DMEM suplementado con FBS al 10%, además de Gln 1% y P/S 1%, que se colocó en ambas cámaras del pocillo *transwell*. Como blanco se utilizó un *transwell* con medio de cultivo sin células. Los valores obtenidos fueron normalizados a K-Ohm/cm².

17. Medida del batido de los cilios

Para medir la frecuencia del batido de los cilios de las células multiciliadas, los cultivos se diferenciaron hasta ALI 14, momento en el cual la cámara superior de los *transwells* fue lavada con PBS Ca⁺²/Mg⁺² a 37°C para eliminar el moco secretado por las células. Tras incubar durante 10 minutos, el PBS fue retirado y sustituido por una suspensión que contenía 5µl de bolas magnéticas (*Dynabeads Streptavidin C1, Invitrogen, #65001*) en 300µl de PBS Ca⁺²/Mg⁺², suspensión que fue incubada durante otros 10 minutos para permitir la decantación de las bolas magnéticas sobre las células. Posteriormente se retiró el volumen de la cámara superior y se dejó que las bolas magnéticas se fijasen a las células mediante una incubación de 90 minutos a 37°C. En el momento de adquirir las grabaciones, se añadieron 100µl de PBS Ca⁺²/Mg⁺² sobre los *transwells* y éstos se colocaron en el microscopio invertido *Motic AE20*. Las grabaciones fueron adquiridas con la cámara de un *iPhone XS (Apple Inc.)* a 240 fps y analizadas con el software *MATLAB* a través de una aplicación desarrollada en nuestro laboratorio para seguir el movimiento de las bolas magnéticas en las películas adquiridas. Los resultados de frecuencia se expresaron en s⁻¹.

18. Análisis estadístico

Todos los experimentos descritos en esta tesis se realizaron empleando, al menos, dos réplicas biológicas con al menos cuatro réplicas experimentales de cada

condición. Los datos representados se muestran como media \pm desviación estándar (s.d.) y se han analizado mediante el test *T de Student* para muestras no pareadas. La generación de gráficos y la significación estadística han sido obtenidas empleando el software *GraphPad 6.0*

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Marshall, W.F. Centriole evolution. *Current Opinion in Cell Biology* **21**, 14-19 (2009).
2. Schatten, H., Hueser, C.N. & Chakrabarti, A. Centrosome alterations induced by formamide cause abnormal spindle pole formations. *Cell biology international* **24**, 611-620 (2000).
3. Kushner, E.J. *et al.* Excess centrosomes disrupt endothelial cell migration via centrosome scattering. *Journal of Cell Biology* **206**, 257-272 (2014).
4. Reiter, J.F. & Leroux, M.R. Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **18**, 533-547 (2017).
5. Bettencourt-Dias, M., Hildebrandt, F., Pellman, D., Woods, G. & Godinho, S.A. Centrosomes and cilia in human disease. *Trends in genetics : TIG* **27**, 307-315 (2011).
6. Nigg, E.A. & Raff, J.W. Centrioles, Centrosomes, and Cilia in Health and Disease. *Cell* **139**, 663-678 (2009).
7. de Harven, E. & Bernhard, W. Etude au microscope electronique de l'ultrastructure du centriole chez les vertébrés. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* **45**, 378-398 (1956).
8. Fawcett, D.W. & Porter, K.R. A study of the fine structure of ciliated epithelia. **94**, 221-281 (1954).
9. Anderson, R.G.W. & Brenner, R.M. THE FORMATION OF BASAL BODIES (CENTRIOLES) IN THE RHESUS MONKEY OVIDUCT. *Journal of Cell Biology* **50**, 10-34 (1971).
10. Kobayashi, T. & Dynlacht, B.D. Regulating the transition from centriole to basal body. *J Cell Biol* **193**, 435-444 (2011).
11. Ishikawa, H. & Marshall, W.F. Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**, 222-234 (2011).
12. Marshall, W.F. Basal bodies platforms for building cilia. *Current topics in developmental biology* **85**, 1-22 (2008).
13. Pala, R., Alomari, N. & Nauli, S.M. Primary Cilium-Dependent Signaling Mechanisms. **18**, 2272 (2017).
14. Drummond, I.A. Cilia functions in development. *Current opinion in cell biology* **24**, 24-30 (2012).
15. Nabais, C., Peneda, C. & Bettencourt-Dias, M. Evolution of centriole assembly. *Current biology : CB* **30**, R494-r502 (2020).
16. Kitagawa, D. *et al.* Structural basis of the 9-fold symmetry of centrioles. *Cell* **144**, 364-375 (2011).
17. Rodrigues-Martins, A. *et al.* DSAS-6 Organizes a Tube-like Centriole Precursor, and Its Absence Suggests Modularity in Centriole Assembly. *Current Biology* **17**, 1465-1472 (2007).
18. Carvalho-Santos, Z. *et al.* BLD10/CEP135 is a microtubule-associated protein that controls the formation of the flagellum central microtubule pair. *Dev Cell* **23**, 412-424 (2012).
19. Tang, C.J., Fu, R.H., Wu, K.S., Hsu, W.B. & Tang, T.K. CPAP is a cell-cycle regulated protein that controls centriole length. *Nature cell biology* **11**, 825-831 (2009).
20. Conduit, P.T., Wainman, A., Novak, Z.A., Weil, T.T. & Raff, J.W. Re-examining the role of Drosophila Sas-4 in centrosome assembly using two-colour-3D-SIM FRAP. *Elife* **4**, e08483 (2015).
21. Galletta, B.J., Jacobs, K.C., Fagerstrom, C.J. & Rusan, N.M. Asterless is required for centriole length control and sperm development. *J Cell Biol* **213**, 435-450 (2016).
22. Lopes, C.A. *et al.* PLK4 trans-Autoactivation Controls Centriole Biogenesis in Space. *Dev Cell* **35**, 222-235 (2015).

23. Franz, A., Roque, H., Saurya, S., Dobbelaere, J. & Raff, J. CP110 exhibits novel regulatory activities during centriole assembly in *Drosophila*. *J Cell Biol* **203** (2013).
24. Elric, J. & Etienne-Manneville, S. Centrosome positioning in polarized cells: common themes and variations. *Experimental cell research* **328**, 240-248 (2014).
25. and, A.D. & Mitchison*, T.J. MICROTUBULE POLYMERIZATION DYNAMICS. **13**, 83-117 (1997).
26. Spassky, N. & Meunier, A. The development and functions of multiciliated epithelia. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **18**, 423-436 (2017).
27. de Anda, F.C. *et al.* Centrosome localization determines neuronal polarity. *Nature* **436**, 704-708 (2005).
28. May-Simera, H.L. *et al.* Loss of MACF1 Abolishes Ciliogenesis and Disrupts Apicobasal Polarity Establishment in the Retina. *Cell reports* **17**, 1399-1413 (2016).
29. Vertii, A. & Doxsey, S. The Centrosome: A Phoenix Organelle of the Immune Response. *Single Cell Biology* **5** (2016).
30. Nayak, G.D., Ratnayaka, H.S., Goodyear, R.J. & Richardson, G.P. Development of the hair bundle and mechanotransduction. *The International journal of developmental biology* **51**, 597-608 (2007).
31. Guirao, B. *et al.* Coupling between hydrodynamic forces and planar cell polarity orients mammalian motile cilia. *Nature cell biology* **12**, 341-350 (2010).
32. Carvajal-Gonzalez, J.M., Mulero-Navarro, S. & Mlodzik, M. Centriole positioning in epithelial cells and its intimate relationship with planar cell polarity. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **38**, 1234-1245 (2016).
33. Tang, N. & Marshall, W.F. Centrosome positioning in vertebrate development. **125**, 4951-4961 (2012).
34. Goodrich, L.V. & Strutt, D. Principles of planar polarity in animal development. *Development (Cambridge, England)* **138**, 1877-1892 (2011).
35. Campanale, J.P., Sun, T.Y. & Montell, D.J. Development and dynamics of cell polarity at a glance. *Journal of Cell Science* **130**, 1201-1207 (2017).
36. Goldstein, B. & Macara, I.G. The PAR proteins: fundamental players in animal cell polarization. *Dev Cell* **13**, 609-622 (2007).
37. Bryant, D.M. & Mostov, K.E. From cells to organs: building polarized tissue. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**, 887-901 (2008).
38. St Johnston, D. & Sanson, B. Epithelial polarity and morphogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **23**, 540-546 (2011).
39. Martin-Belmonte, F. *et al.* PTEN-Mediated Apical Segregation of Phosphoinositides Controls Epithelial Morphogenesis through Cdc42. *Cell* **128**, 383-397 (2007).
40. Vorhagen, S. & Niessen, C.M. Mammalian aPKC/Par polarity complex mediated regulation of epithelial division orientation and cell fate. *Experimental cell research* **328**, 296-302 (2014).
41. Shin, K., Straight, S. & Margolis, B. PATJ regulates tight junction formation and polarity in mammalian epithelial cells. *J Cell Biol* **168**, 705-711 (2005).
42. Tanentzapf, G. & Tepass, U. Interactions between the crumbs, lethal giant larvae and bazooka pathways in epithelial polarization. *Nature cell biology* **5**, 46-52 (2003).
43. Cao, F., Miao, Y., Xu, K. & Liu, P. Lethal (2) Giant Larvae: An Indispensable Regulator of Cell Polarity and Cancer Development. *International Journal of Biological Sciences* **11**, 380-389 (2015).
44. Dormoy, V., Tormanen, K. & Sütterlin, C. Par6γ is at the mother centriole and controls centrosomal protein composition through a Par6α-dependent pathway. *J Cell Sci* **126**, 860-870 (2013).
45. Feldman, J.L. & Priess, J.R. A role for the centrosome and PAR-3 in the hand-off of MTOC function during epithelial polarization. *Current biology : CB* **22**, 575-582 (2012).

46. Galli, M. *et al.* aPKC phosphorylates NuMA-related LIN-5 to position the mitotic spindle during asymmetric division. *Nature cell biology* **13**, 1132-1138 (2011).
47. Ezan, J. *et al.* Primary cilium migration depends on G-protein signalling control of subapical cytoskeleton. *Nature cell biology* **15**, 1107-1115 (2013).
48. Guirao, B. *et al.* Coupling between hydrodynamic forces and planar cell polarity orients mammalian motile cilia. *Nature cell biology* **12**, 341-350 (2010).
49. Peng, Y. & Axelrod, J.D. Asymmetric protein localization in planar cell polarity: mechanisms, puzzles, and challenges. *Current topics in developmental biology* **101**, 33-53 (2012).
50. Adler, P.N. The frizzled/stan pathway and planar cell polarity in the Drosophila wing. *Current topics in developmental biology* **101**, 1-31 (2012).
51. Park, T.J., Haigo, S.L. & Wallingford, J.B. Ciliogenesis defects in embryos lacking inturned or fuzzy function are associated with failure of planar cell polarity and Hedgehog signaling. *Nature genetics* **38**, 303-311 (2006).
52. Rock, R., Schrauth, S. & Gessler, M. Expression of mouse dchs1, fjx1, and fat-j suggests conservation of the planar cell polarity pathway identified in Drosophila. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **234**, 747-755 (2005).
53. Janda, C.Y., Waghray, D., Levin, A.M., Thomas, C. & Garcia, K.C. Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science (New York, N.Y.)* **337**, 59-64 (2012).
54. Boutros, M. & Mlodzik, M. Dishevelled: at the crossroads of divergent intracellular signaling pathways. *Mechanisms of development* **83**, 27-37 (1999).
55. Axelrod, J.D., Miller, J.R., Shulman, J.M., Moon, R.T. & Perrimon, N. Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways. *Genes Dev* **12**, 2610-2622 (1998).
56. Klingensmith, J. *et al.* Conservation of dishevelled structure and function between flies and mice: isolation and characterization of Dvl2. *Mechanisms of development* **58**, 15-26 (1996).
57. Taylor, J., Abramova, N., Charlton, J. & Adler, P.N. Van Gogh: a new Drosophila tissue polarity gene. *Genetics* **150**, 199-210 (1998).
58. Torban, E. *et al.* Genetic interaction between members of the Vangl family causes neural tube defects in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 3449 (2008).
59. Usui, T. *et al.* Flamingo, a Seven-Pass Transmembrane Cadherin, Regulates Planar Cell Polarity under the Control of Frizzled. *Cell* **98**, 585-595 (1999).
60. Strutt, H. & Strutt, D. Differential stability of flamingo protein complexes underlies the establishment of planar polarity. *Current biology : CB* **18**, 1555-1564 (2008).
61. Jenny, A., Reynolds-Kenneally, J., Das, G., Burnett, M. & Mlodzik, M. Diego and Prickle regulate Frizzled planar cell polarity signalling by competing for Dishevelled binding. *Nature cell biology* **7**, 691-697 (2005).
62. Feiguin, F., Hannus, M., Mlodzik, M. & Eaton, S. The ankyrin repeat protein Diego mediates Frizzled-dependent planar polarization. *Dev Cell* **1**, 93-101 (2001).
63. Curtin, J.A. *et al.* Mutation of Celsr1 disrupts planar polarity of inner ear hair cells and causes severe neural tube defects in the mouse. *Current biology : CB* **13**, 1129-1133 (2003).
64. Kibar, Z. *et al.* Ltap, a mammalian homolog of Drosophila Strabismus/Van Gogh, is altered in the mouse neural tube mutant Loop-tail. *Nature genetics* **28**, 251-255 (2001).
65. Das, G., Jenny, A., Klein, T.J., Eaton, S. & Mlodzik, M. Diego interacts with Prickle and Strabismus/Van Gogh to localize planar cell polarity complexes. *Development (Cambridge, England)* **131**, 4467-4476 (2004).
66. Narimatsu, M. *et al.* Regulation of planar cell polarity by Smurf ubiquitin ligases. *Cell* **137**, 295-307 (2009).

67. Bastock, R., Strutt, H. & Strutt, D. Strabismus is asymmetrically localised and binds to Prickle and Dishevelled during *Drosophila* planar polarity patterning. *Development (Cambridge, England)* **130**, 3007-3014 (2003).
68. Wu, J., Roman, A.C., Carvajal-Gonzalez, J.M. & Mlodzik, M. Wg and Wnt4 provide long-range directional input to planar cell polarity orientation in *Drosophila*. *Nature cell biology* **15**, 1045-1055 (2013).
69. Bryja, V. & Bernatik, O. Wnt Signaling in Development and Disease: Molecular Mechanisms and Biological Functions, 207-216 (2014).
70. Seifert, J.R.K. & Mlodzik, M. Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nature Reviews Genetics* **8**, 126-138 (2007).
71. Mitchell, B., Jacobs, R., Li, J., Chien, S. & Kintner, C. A positive feedback mechanism governs the polarity and motion of motile cilia. *Nature* **447**, 97-101 (2007).
72. Vladar, E.K., Nayak, J.V., Milla, C.E. & Axelrod, J.D. Airway epithelial homeostasis and planar cell polarity signaling depend on multiciliated cell differentiation. *JCI insight* **1** (2016).
73. Park, T.J., Mitchell, B.J., Abitua, P.B., Kintner, C. & Wallingford, J.B. Dishevelled controls apical docking and planar polarization of basal bodies in ciliated epithelial cells. *Nature genetics* **40**, 871-879 (2008).
74. Boutin, C. *et al.* A dual role for planar cell polarity genes in ciliated cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, E3129-3138 (2014).
75. Pennekamp, P., Menchen, T., Dworniczak, B. & Hamada, H. Situs inversus and ciliary abnormalities: 20 years later, what is the connection? *Cilia* **4**, 1 (2015).
76. Zeidler, M.P., Perrimon, N. & Strutt, D.I. The four-jointed gene is required in the *Drosophila* eye for ommatidial polarity specification. *Current biology : CB* **9**, 1363-1372 (1999).
77. Zeidler, M.P., Perrimon, N. & Strutt, D.I. Multiple roles for four-jointed in planar polarity and limb patterning. *Dev Biol* **228**, 181-196 (2000).
78. Ma, D., Yang, C.-h., McNeill, H., Simon, M.A. & Axelrod, J.D. Fidelity in planar cell polarity signalling. *Nature* **421**, 543-547 (2003).
79. Bosveld, F. *et al.* Mechanical Control of Morphogenesis by Fat/Dachsous/Four-Jointed Planar Cell Polarity Pathway. **336**, 724-727 (2012).
80. Harumoto, T. *et al.* Atypical Cadherins Dachsous and Fat Control Dynamics of Noncentrosomal Microtubules in Planar Cell Polarity. *Developmental Cell* **19**, 389-401 (2010).
81. Merkel, M. *et al.* The Balance of Prickle/Spiny-Legs Isoforms Controls the Amount of Coupling between Core and Fat PCP Systems. *Current Biology* **24**, 2111-2123 (2014).
82. Saburi, S. *et al.* Loss of Fat4 disrupts PCP signaling and oriented cell division and leads to cystic kidney disease. *Nature genetics* **40**, 1010-1015 (2008).
83. Mao, Y. *et al.* Characterization of a Dchs1 mutant mouse reveals requirements for Dchs1-Fat4 signaling during mammalian development. *Development (Cambridge, England)* **138**, 947-957 (2011).
84. Lemullois, M., Boisvieux-Ulrich, E., Laine, M.C., Chailley, B. & Sandoz, D. Development and functions of the cytoskeleton during ciliogenesis in metazoa. *Biology of the cell* **63**, 195-208 (1988).
85. Sedzinski, J., Hannezo, E., Tu, F., Biro, M. & Wallingford, J.B. Emergence of an Apical Epithelial Cell Surface In Vivo. *Dev Cell* **36**, 24-35 (2016).
86. Boisvieux-Ulrich, E., Lainé, M.C. & Sandoz, D. Cytochalasin D inhibits basal body migration and ciliary elongation in quail oviduct epithelium. *Cell Tissue Res* **259**, 443-454 (1990).
87. Kunimoto, K. *et al.* Coordinated ciliary beating requires Odf2-mediated polarization of basal bodies via basal feet. *Cell* **148**, 189-200 (2012).

88. Gubb, D. & García-Bellido, A. A genetic analysis of the determination of cuticular polarity during development in *Drosophila melanogaster*. *Journal of embryology and experimental morphology* **68**, 37-57 (1982).
89. Turner, C.M. & Adler, P.N. Distinct roles for the actin and microtubule cytoskeletons in the morphogenesis of epidermal hairs during wing development in *Drosophila*. *Mechanisms of development* **70**, 181-192 (1998).
90. Devenport, D. Tissue morphodynamics: Translating planar polarity cues into polarized cell behaviors. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **55**, 99-110 (2016).
91. Goodrich, L.V. & Strutt, D. Principles of planar polarity in animal development. *Development (Cambridge, England)* **138**, 1877-1892 (2011).
92. Park, W.J., Liu, J., Sharp, E.J. & Adler, P.N. The *Drosophila* tissue polarity gene *inturned* acts cell autonomously and encodes a novel protein. *Development (Cambridge, England)* **122**, 961-969 (1996).
93. Collier, S., Lee, H., Burgess, R. & Adler, P. The WD40 repeat protein *fritz* links cytoskeletal planar polarity to frizzled subcellular localization in the *Drosophila* epidermis. *Genetics* **169**, 2035-2045 (2005).
94. Lu, Q., Yan, J. & Adler, P.N. The *Drosophila* planar polarity proteins *inturned* and multiple wing hairs interact physically and function together. *Genetics* **185**, 549-558 (2010).
95. Spiering, D. & Hodgson, L. Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell adhesion & migration* **5**, 170-180 (2011).
96. Mezzacappa, C., Komiya, Y. & Habas, R. Activation and function of small GTPases Rho, Rac, and Cdc42 during gastrulation. *Methods Mol Biol* **839**, 119-131 (2012).
97. Eaton, S., Wepf, R. & Simons, K. Roles for Rac1 and Cdc42 in planar polarization and hair outgrowth in the wing of *Drosophila*. *J Cell Biol* **135**, 1277-1289 (1996).
98. Gray, R.S. *et al.* The planar cell polarity effector *Fuz* is essential for targeted membrane trafficking, ciliogenesis and mouse embryonic development. *Nature cell biology* **11**, 1225-1232 (2009).
99. Park, T.J., Mitchell, B.J., Abitua, P.B., Kintner, C. & Wallingford, J.B. Dishevelled controls apical docking and planar polarization of basal bodies in ciliated epithelial cells. *Nature genetics* **40**, 871-879 (2008).
100. Carvajal-Gonzalez, J.M., Roman, A.-C. & Mlodzik, M. Positioning of centrioles is a conserved readout of Frizzled planar cell polarity signalling. *Nat Commun* **7**, 11135 (2016).
101. Eaton, S., Wepf, R. & Simons, K. Roles for Rac1 and Cdc42 in planar polarization and hair outgrowth in the wing of *Drosophila*. *Journal of Cell Biology* **135**, 1277-1289 (1996).
102. Carvajal-Gonzalez, J.M. & Mlodzik, M. Mechanisms of planar cell polarity establishment in *Drosophila*. *F1000Prime Rep* **6**, 98-98 (2014).
103. Buendia, B., Antony, C., Verde, F., Bornens, M. & Karsenti, E. A centrosomal antigen localized on intermediate filaments and mitotic spindle poles. *J Cell Sci* **97 (Pt 2)**, 259-271 (1990).
104. Hagiwara, H., Kano, A., Aoki, T., Ohwada, N. & Takata, K. Localization of gamma-tubulin to the basal foot associated with the basal body extending a cilium. *The Histochemical journal* **32**, 669-671 (2000).
105. Wallingford, J.B. Planar cell polarity signaling, cilia and polarized ciliary beating. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 597-604 (2010).
106. Borovina, A., Superina, S., Voskas, D. & Ciruna, B. *Vangl2* directs the posterior tilting and asymmetric localization of motile primary cilia. *Nature cell biology* **12**, 407-412 (2010).
107. Kaltschmidt, J.A. *et al.* Planar polarity and actin dynamics in the epidermis of *Drosophila*. *Nature cell biology* **4**, 937-944 (2002).
108. Park, T.J., Haigo, S.L. & Wallingford, J.B. Ciliogenesis defects in embryos lacking *inturned* or *fuzzy* function are associated with failure of planar cell polarity and Hedgehog signaling. *Nature genetics* **38**, 303-311 (2006).

109. Pan, J., You, Y., Huang, T. & Brody, S.L. RhoA-mediated apical actin enrichment is required for ciliogenesis and promoted by Foxj1. *Journal of Cell Science* **120**, 1868-1876 (2007).
110. Gray, R.S. *et al.* The planar cell polarity effector Fuz is essential for targeted membrane trafficking, ciliogenesis and mouse embryonic development. *Nature cell biology* **11**, 1225-1232 (2009).
111. Eaton, S., Auvinen, P., Luo, L., Jan, Y.N. & Simons, K. CDC42 and Rac1 control different actin-dependent processes in the Drosophila wing disc epithelium. *Journal of Cell Biology* **131**, 151-164 (1995).
112. Boisvieux-Ulrich, E., Lainé, M.-C. & Sandoz, D. Cytochalasin D inhibits basal body migration and ciliary elongation in quail oviduct epithelium. *Cell and Tissue Research* **259**, 443-454 (1990).
113. Almuedo-Castillo, M., Saló, E. & Adell, T. Dishevelled is essential for neural connectivity and planar cell polarity in planarians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 2813 (2011).
114. Euteneuer, U. & Schliwa, M. Evidence for an involvement of actin in the positioning and motility of centrosomes. *Journal of Cell Biology* **101**, 96-103 (1985).
115. Antoniadou, I., Stylianou, P. & Skourides, Paris A. Making the Connection: Ciliary Adhesion Complexes Anchor Basal Bodies to the Actin Cytoskeleton. *Developmental Cell* **28**, 70-80 (2014).
116. Herriges, M. & Morrisey, E.E. Lung development: orchestrating the generation and regeneration of a complex organ. **141**, 502-513 (2014).
117. Domyan, E.T. *et al.* Signaling through BMP receptors promotes respiratory identity in the foregut via repression of Sox2. *Development (Cambridge, England)* **138**, 971-981 (2011).
118. Bustamante-Marin, X.M. & Ostrowski, L.E. Cilia and Mucociliary Clearance. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **9** (2017).
119. Bertalanffy, F.D. & Leblond, C.P. Structure of respiratory tissue. *Lancet (London, England)* **269**, 1365-1368 (1955).
120. Rock, J.R., Randell, S.H. & Hogan, B.L. Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Disease models & mechanisms* **3**, 545-556 (2010).
121. Rawlins, E.L. & Hogan, B.L.M. Epithelial stem cells of the lung: privileged few or opportunities for many? *Development (Cambridge, England)* **133**, 2455 (2006).
122. Mercer, R.R., Russell, M.L., Roggli, V.L. & Crapo, J.D. Cell number and distribution in human and rat airways. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **10**, 613-624 (1994).
123. 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).
124. 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).
125. 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).
126. Rock, Jason R. *et al.* Notch-Dependent Differentiation of Adult Airway Basal Stem Cells. *Cell Stem Cell* **8**, 639-648 (2011).
127. 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).

128. Lewis, M. & Stracker, T.H. Transcriptional regulation of multiciliated cell differentiation. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **110**, 51-60 (2021).
129. Plopper, C.G., Halsebo, J.E., Berger, W.J., Sonstegard, K.S. & Nettesheim, P. Distribution of nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cells in intra- and extrapulmonary airways of the rabbit. *Experimental lung research* **5**, 79-98 (1983).
130. Basbaum, C.B. & Finkbeiner, W.E. Airway secretion: a cell-specific analysis. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* **20**, 661-667 (1988).
131. van Es, J.H. *et al.* Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* **435**, 959-963 (2005).
132. Radtke, F. & Raj, K. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nature reviews. Cancer* **3**, 756-767 (2003).
133. Morimoto, M. *et al.* Canonical Notch signaling in the developing lung is required for determination of arterial smooth muscle cells and selection of Clara versus ciliated cell fate. *J Cell Sci* **123**, 213-224 (2010).
134. Rawlins, E.L. *et al.* The role of Scgb1a1+ Clara cells in the long-term maintenance and repair of lung airway, but not alveolar, epithelium. *Cell Stem Cell* **4**, 525-534 (2009).
135. Xu, M., Yang, W., Wang, X. & Nayak, D.K. Lung Secretoglobin Scgb1a1 Influences Alveolar Macrophage-Mediated Inflammation and Immunity. **11** (2020).
136. Stupnikov, M.R., Yang, Y., Mori, M., Lu, J. & Cardoso, W.V. Jagged and Delta-like ligands control distinct events during airway progenitor cell differentiation. *Elife* **8**, e50487 (2019).
137. 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).
138. Tsao, P.-N. *et al.* Notch signaling controls the balance of ciliated and secretory cell fates in developing airways. **136**, 2297-2307 (2009).
139. Sleigh, M.A., Blake, J.R. & Liron, N. The propulsion of mucus by cilia. *The American review of respiratory disease* **137**, 726-741 (1988).
140. HOVENBERG, H.W., DAVIES, J.R. & CARLSTEDT, I. 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**, 319-324 (1996).
141. Chen, G. *et al.* SPDEF is required for mouse pulmonary goblet cell differentiation and regulates a network of genes associated with mucus production. *J Clin Invest* **119**, 2914-2924 (2009).
142. Wallmeier, J. *et al.* Mutations in CCNO result in congenital mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. *Nature genetics* **46**, 646-651 (2014).
143. Boon, M. *et al.* in *Nat Commun*, Vol. 5 4418 (2014).
144. Guseh, J.S. *et al.* Notch signaling promotes airway mucous metaplasia and inhibits alveolar development. *Development (Cambridge, England)* **136**, 1751-1759 (2009).
145. Lafkas, D. *et al.* Therapeutic antibodies reveal Notch control of transdifferentiation in the adult lung. *Nature* **528**, 127-131 (2015).
146. Mori, M. *et al.* Notch3-Jagged signaling controls the pool of undifferentiated airway progenitors. *Development (Cambridge, England)* **142**, 258-267 (2015).
147. Marcet, B. *et al.* Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nature cell biology* **13**, 693-699 (2011).
148. Kroll, K.L. Geminin in embryonic development: coordinating transcription and the cell cycle during differentiation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **12**, 1395-1409 (2007).

149. Kyrousi, C. *et al.* Mcidas and GemC1 are key regulators for the generation of multiciliated ependymal cells in the adult neurogenic niche. *Development (Cambridge, England)* **142**, 3661 (2015).
150. Ma, L., Quigley, I., Omran, H. & Kintner, C. Multicilin drives centriole biogenesis via E2f proteins. *Genes Dev* **28**, 1461-1471 (2014).
151. Danielian, P.S. *et al.* E2f4 is required for normal development of the airway epithelium. *Developmental Biology* **305**, 564-576 (2007).
152. 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).
153. 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).
154. Chen, J., Knowles, H.J., Hebert, J.L. & Hackett, B.P. Mutation of the mouse hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 gene results in an absence of cilia and random left-right asymmetry. *J Clin Invest* **102**, 1077-1082 (1998).
155. Didon, L. *et al.* RFX3 modulation of FOXJ1 regulation of cilia genes in the human airway epithelium. *Respir Res* **14**, 70-70 (2013).
156. Stiewe, T. The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer* **7**, 165-167 (2007).
157. Pietsch, E.C., Sykes, S.M., McMahon, S.B. & Murphy, M.E. The p53 family and programmed cell death. *Oncogene* **27**, 6507-6521 (2008).
158. Yang, A. *et al.* p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* **398**, 714-718 (1999).
159. Yang, A. *et al.* p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* **404**, 99-103 (2000).
160. Marshall, C.B. *et al.* p73 Is Required for Multiciliogenesis and Regulates the Foxj1-Associated Gene Network. *Cell reports* **14**, 2289-2300 (2016).
161. Marshall, C.B. *et al.* p73 Is Required for Multiciliogenesis and Regulates the Foxj1-Associated Gene Network. *Cell reports* **14**, 2289-2300 (2016).
162. Gonzalez-Cano, L. *et al.* p73 is required for ependymal cell maturation and neurogenic SVZ cytoarchitecture. *Developmental neurobiology* **76**, 730-747 (2016).
163. Maeso-Alonso, L., López-Ferreras, L., Marques, M.M. & Marin, M.C. p73 as a Tissue Architect. **9** (2021).
164. Plasschaert, L.W. *et al.* A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. *Nature* **560**, 377-381 (2018).
165. Qin, S., Liu, M., Niu, W. & Zhang, C.-L. Dysregulation of Kruppel-like factor 4 during brain development leads to hydrocephalus in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 21117-21121 (2011).
166. Park, K.-S. *et al.* Transdifferentiation of ciliated cells during repair of the respiratory epithelium. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **34**, 151-157 (2006).
167. Fossum, S.L. *et al.* Ets homologous factor regulates pathways controlling response to injury in airway epithelial cells. *Nucleic acids research* **42**, 13588-13598 (2014).
168. Kasthuber, E.R. & Lowe, S.W. Putting p53 in Context. *Cell* **170**, 1062-1078 (2017).
169. Haupt, Y., Robles, A.I., Prives, C. & Rotter, V. Deconstruction of p53 functions and regulation. *Oncogene* **21**, 8223-8231 (2002).
170. Armesilla-Diaz, A. *et al.* p53 regulates the self-renewal and differentiation of neural precursors. *Neuroscience* **158**, 1378-1389 (2009).
171. Li, Y. *et al.* p53 Enables metabolic fitness and self-renewal of nephron progenitor cells. *Development (Cambridge, England)* **142**, 1228-1241 (2015).
172. McConnell, A.M. *et al.* p53 Regulates Progenitor Cell Quiescence and Differentiation in the Airway. *Cell reports* **17**, 2173-2182 (2016).

173. Herriges, M. & Morrisey, E.E. Lung development: orchestrating the generation and regeneration of a complex organ. *Development (Cambridge, England)* **141**, 502-513 (2014).
174. Xu, Y. Regulation of p53 responses by post-translational modifications. *Cell Death & Differentiation* **10**, 400-403 (2003).
175. Raj, N. & Attardi, L.D. The Transactivation Domains of the p53 Protein. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **7**, a026047 (2017).
176. Ito, A. *et al.* MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *The EMBO journal* **21**, 6236-6245 (2002).
177. Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. & Oren, M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**, 296-299 (1997).
178. Sui, P. *et al.* E3 ubiquitin ligase MDM2 acts through p53 to control respiratory progenitor cell number and lung size. *Development (Cambridge, England)* **146**, dev179820 (2019).
179. Hock, A.K. & Vousden, K.H. The role of ubiquitin modification in the regulation of p53. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1843**, 137-149 (2014).
180. Jain, A.K. & Barton, M.C. Making sense of ubiquitin ligases that regulate p53. *Cancer Biol Ther* **10**, 665-672 (2010).
181. Momand, J., Wu, H.H. & Dasgupta, G. MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* **242**, 15-29 (2000).
182. Vaughan, C., Pearsall, I., Yeudall, A., Deb, S.P. & Deb, S. p53: its mutations and their impact on transcription. *Sub-cellular biochemistry* **85**, 71-90 (2014).
183. Chiang, Y.-T. *et al.* The Function of the Mutant p53-R175H in Cancer. **13**, 4088 (2021).
184. Fischer, M. Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene* **36**, 3943-3956 (2017).
185. Ohnstad, H.O. *et al.* MDM2 antagonist Nutlin-3a potentiates antitumour activity of cytotoxic drugs in sarcoma cell lines. *BMC Cancer* **11**, 211 (2011).
186. Rew, Y. & Sun, D. Discovery of a Small Molecule MDM2 Inhibitor (AMG 232) for Treating Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry* **57**, 6332-6341 (2014).
187. Konishi, S. *et al.* Directed Induction of Functional Multi-ciliated Cells in Proximal Airway Epithelial Spheroids from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* **6**, 18-25 (2016).
188. Jain, A.K. & Barton, M.C. p53: emerging roles in stem cells, development and beyond. *Development (Cambridge, England)* **145** (2018).
189. Chen, J. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **6**, a026104 (2016).
190. Fu, M., Wang, C., Li, Z., Sakamaki, T. & Pestell, R.G. Minireview: Cyclin D1: Normal and Abnormal Functions. *Endocrinology* **145**, 5439-5447 (2004).
191. Vousden, K.H. & Prives, C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* **137**, 413-431 (2009).
192. Cardoso, W.V. Molecular regulation of lung development. *Annual review of physiology* **63**, 471-494 (2001).
193. Hogan, B.L.M. *et al.* Repair and regeneration of the respiratory system: complexity, plasticity, and mechanisms of lung stem cell function. *Cell stem cell* **15**, 123-138 (2014).
194. 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-C181 (2004).
195. Nemajerova, A. *et al.* TAp73 is a central transcriptional regulator of airway multiciliogenesis. *Genes Dev* **30**, 1300-1312 (2016).
196. Marshall, Clayton B. *et al.* p73 Is Required for Multiciliogenesis and Regulates the Foxj1-Associated Gene Network. *Cell reports* **14**, 2289-2300 (2016).
197. Sui, P. *et al.* E3 ubiquitin ligase MDM2 acts through p53 to control respiratory progenitor cell number and lung size. *Development (Cambridge, England)* **146**, dev.179820 (2019).

198. Lin, T. *et al.* P53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nature cell biology* **7**, 165-171 (2005).
199. Sabapathy, K., Klemm, M., Jaenisch, R. & Wagner, E.F. Regulation of ES cell differentiation by functional and conformational modulation of p53. *The EMBO journal* **16**, 6217-6229 (1997).
200. Nag, S., Qin, J., Srivenugopal, K.S., Wang, M. & Zhang, R. The MDM2-p53 pathway revisited. *Journal of biomedical research* **27**, 254-271 (2013).
201. Komarov, P. *et al.* A Chemical Inhibitor of p53 That Protects Mice from the Side Effects of Cancer Therapy. *Science (New York, N.Y.)* **285**, 1733-1737 (1999).
202. Pardo-Saganta, A. *et al.* Parent stem cells can serve as niches for their daughter cells. *Nature* **523**, 597-601 (2015).
203. Chang, Y.-C. *et al.* VCP maintains nuclear size by regulating the DNA damage-associated MDC1–p53–autophagy axis in *Drosophila*. *Nat Commun* **12**, 4258 (2021).
204. Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M.J., Pagano, M. & Draetta, G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. **7**, 812-821 (1993).
205. Hallenborg, P. *et al.* MDM2 facilitates adipocyte differentiation through CRTC-mediated activation of STAT3. *Cell death & disease* **7**, e2289 (2016).
206. Colaluca, I.N. *et al.* NUMB controls p53 tumour suppressor activity. *Nature* **451**, 76-80 (2008).
207. Wienken, M. *et al.* MDM2 Associates with Polycomb Repressor Complex 2 and Enhances Stemness-Promoting Chromatin Modifications Independent of p53. *Mol Cell* **61**, 68-83 (2016).
208. Lu, Y. *et al.* Evidence that SOX2 overexpression is oncogenic in the lung. *PLoS One* **5**, e11022-e11022 (2010).
209. Momand, J., Jung, D., Wilczynski, S. & Niland, J. The MDM2 gene amplification database. *Nucleic acids research* **26**, 3453-3459 (1998).
210. Chen, Z., Fillmore, C.M., Hammerman, P.S., Kim, C.F. & Wong, K.K. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nature reviews. Cancer* **14**, 535-546 (2014).
211. Brand, A.H. & Perrimon, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)* **118**, 401-415 (1993).
212. 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).