MICHELLE VASCONCELOS

**O PAPEL DA SINALIZAÇÃO NOTCH NA DIFERENCIAÇÃO DO EPITÉLIO
PULMONAR**

**Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de Doutor
em Ciências.**

**São Paulo
2011**

MICHELLE VASCONCELOS

**O PAPEL DA SINALIZAÇÃO NOTCH NA DIFERENCIAÇÃO DO EPITÉLIO
PULMONAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Dr. Wellington Cardoso

Versão Original

**São Paulo
2011**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Vasconcelos, Michelle.

O papel da sinalização Notch na diferenciação do epitélio pulmonar /
Michelle Vasconcelos. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Wellington Veras Cardoso.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento.
Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa:
Investigar o papel da via de sinalização Notch nos processos de
diferenciação dos tipos celulares que compõem o epitélio pulmonar.

Versão do título para o inglês: The role of Notch signaling in lung
epithelial differentiation.

Descritores: 1. Pulmão 2. Sinalização Notch 3. Células ciliadas 4.
Células secretoras 5. Diferenciação pulmonar 6. Desenvolvimento
pulmonar I. Cardoso, Wellington Veras II. Universidade de São Paulo.
Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0196/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Michelle Vasconcelos.

Título da Tese: O papel da sinalização Notch na diferenciação do epitélio pulmonar.

Orientador(a): Wellington Veras Cardoso.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Institutional Animal
Care and Use
Committee

Tel: 617 638-4263
Fax: 617 638-4686
<http://www.bumc.bu.edu/iacuc>
IACUC@bu.edu

August 06, 2010
WELLINGTON CARDOSO
BOSTON UNIVERSITY MEDICAL CAMPUS
PULMONARY CENTER

AN-14198.2010.08: FIBROBLAST GROWTH FACTORS IN LUNG DEVELOPMENT

APPROVAL VALID FROM August 06, 2010 thru August 06, 2011

Dear Dr. CARDOSO

Your application for use of animals in research or education has been reviewed by the Institutional Animal Care and Use Committee at Boston University Medical Center.

The protocol is APPROVED as being consistent with humane treatment of laboratory animals and with standards set forth in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Animal Welfare Act.

Boston University Medical Center has had an Animal Welfare Assurance on file with the Office of Laboratory Welfare (OLAW) since January 1, 1986. The Animal Welfare Assurance number is A-3316-01. The Laboratory Animal Science Center at Boston University Medical Center has been accredited by the American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) since 1971.

You will be notified should any federal or institutional policies come into effect that would require you to amend your project.

Respectfully,

WILLIAM CRUIKSHANK,
Institutional Animal Care and Use Committee

***Em homenagem ao meu querido avô, Floriano de Moraes (in
memoriam), que esteve sempre presente. Por sua vida de
lutas e vitórias, pelo sonhos que compartilhamos... um
deles, acaba de se tornar realidade!***

AGRADECIMENTOS

Devo a minha mais profunda gratidão ao Dr. Wellington Cardoso, por ter confiado a mim o desenvolvimento de seu trabalho. Agradeço por ter colocado em minhas mãos este projeto tão frutífero, com o qual eu tanto aprendi. Serei eternamente grata pelas preciosas horas dedicadas ao meu aprendizado, desenvolvimento profissional e pessoal, pelas idéias compartilhadas ao longo destes anos, e por estar prontamente disponível para ouvir e encorajar. Agradeço pelo suporte constante em todas as etapas deste projeto, por ter me ensinado não apenas tudo o que sei sobre desenvolvimento pulmonar, mas acima de tudo, por sempre me lembrar que o reconhecimento de nosso potencial tem valor inestimável frente às "eventuais" dificuldades que encontramos pela caminhada. Agradeço por me proporcionar a oportunidade de conhecer, interagir e trabalhar com pessoas maravilhosas que compõem a sua equipe. Fui imensamente abençoada por ter o Dr. Wellington Cardoso como meu orientador e por ter todo o apoio de sua equipe durante o desenvolvimento deste projeto.

Agradeço ao Dr. José Xavier-Neto por ter me introduzido ao Dr. Wellington Cardoso. Obrigada pelo apoio e incentivo durante as diversas fases de minha carreira científica.

Agradeço também ao departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Obrigada por aprovar esta colaboração entre USP e Boston University, a qual certamente renderá muitos outros frutos. Agradeço à professora Dra. Dânia Hamassaki por ter oferecido todo seu apoio durante a inserção do Dr. Wellington Cardoso no programa de pós-graduação, à professora Dra. Marinilce Fagundes e à Celiana Marchiori pela orientação nas diversas etapas deste processo.

There are many people whom I wish to thank for their support during my Ph.D. training. Starting with former members of the laboratory, I would like to thank Po-Nien Tsao for initiating this project and for giving me all support needed to continue this work. I also would like to thank Konstantin Izvolsky for being so helpful with various techniques, mainly with the genotyping of all transgenic mouse lines I worked with.

I would like to also thank Felicia Chen, my bench partner, for all thoughtful scientific conversation, constant guidance on my experimental strategies and data, from the beginning to the end of this project. Her amazing source of knowledge and organization skills, have contributed to my scientific and personal development. Also, her friendship has helped me overcome many personal obstacles. I also need to thank her for all the fun moments and laughter we shared, especially when talking about our babies!!!

I have been blessed to be surrounded by wonderful technicians: Jun Qian and Fengzhi Shao. I truly appreciate their daily support and dedication. They both have contributed to several aspects of my work, especially in the *in situ* hybridization experiments, immunohistochemistry and tissue sectioning techniques. I have learned so much with their experience and will be always grateful for their support.

I am very grateful to Jining Lu for all his help, especially with the microarray data. His expertise and experience helped me at various times during this project. He has always been happy to provide everybody with assistance! I also would like to thank Dr. Steve Shen for his scientific contribution to the bioinformatics analysis of this work.

I would like to thank John Mahoney, a new member of our lab, for the discussions about my data and for sharing his contagious enthusiasm!

Next, I would like to thank Leah Cushing and Catalina Perdomo for the friendship and for the many fun moments shared during this journey!

Além dos que fazem parte do meu ambiente de trabalho, gostaria de agradecer ao meu marido Manfred Kraus por ter incentivado meu crescimento profissional ao longo destes anos e por estar sempre ao meu lado. Agradeço a Deus por ter me concedido, durante a realização deste trabalho, a maravilhosa experiência de ser mãe do “pequeno” Markus Noah, a luz da minha vida, meu sorriso inspirador de cada manhã.

Agradeço aos meus pais, João Marcos e Marisa Vasconcelos, pelas infinitas orações. Pelos anos de investimento em minha educação e formação, serei eternamente grata. Acima de tudo, pelo amor incondicional demonstrado sempre e sempre! Não tenho palavras para exprimir minha gratidão pelo modelo de vida que representam e por suas trajetórias de sucesso na educação de seus filhos, apesar das dificuldades. Agradeço aos meus irmãos

Isabelle e Lucas Vasconcelos pelo carinho e pelos momentos tão especiais que compartilhamos. A saudade de vocês é tão forte, que é melhor parar por aqui! Agradeço a todos os membros da minha grande família, pelo suporte em todas as etapas da minha formação acadêmica, pelos incentivos e gestos de encorajamento!

Quero agradecer em especial a minha irmã Isabelle Vasconcelos e ao meu cunhado Wilton Venturi, pela lovely hospedagem (de quase 5 meses!!!) em São Paulo, durante a realização das disciplinas do programa de pós-graduação. Obrigada de coração!!!!

À minha querida prima Elaine Clemente também tenho muito a agradecer! Primeiramente, por ter passado quinze dias comigo aqui em Boston, na ocasião do nascimento do Markus. Foi uma ajuda inestimável, que jamais esquecerei! Agradeço também pela impressão de todo o material submetido ao exame de qualificação, e também pela impressão desta tese. Obrigada prima!!!

Obrigada a todos que contribuíram para a realização deste trabalho! Foi um imenso prazer ter compartilhado com todos vocês, dias de muito trabalho, lutas e conquistas. Foi uma honra desenvolver este projeto, sou extremamente grata pela oportunidade. Obrigada!

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é a obra de Deus, e a mais notável”

Galileu Galilei

RESUMO

Vasconcelos, M. O papel da sinalização Notch na diferenciação do epitélio pulmonar [tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2011.

O epitélio pulmonar é formado por uma grande diversidade celular, que inclui: células secretoras, ciliadas, basais e neuroendócrinas (NE). A distribuição balanceada destes tipos celulares é crucial para a função pulmonar e pode ser dramaticamente alterada em doenças como a asma. Neste trabalho, estudamos o papel de Notch no pulmão em desenvolvimento ao inativar condicionalmente Rbpjk ou Pofut1, componentes críticos da sinalização Notch. Pulmões mutantes apresentaram-se superpopulados por células ciliadas e NE, além da ausência de células de Clara. Nossos dados sugeriram que Notch suprime os programas de diferenciação de células ciliadas e NE para permitir a diferenciação de células de Clara, através de um mecanismo de inibição lateral. Identificamos também genes associados com a diferenciação de células secretoras e ciliadas através de microarrays. A heterogeneidade no padrão de expressão gênica sugeriu que a via de sinalização Notch estabelece múltiplos subtipos de células ciliadas e secretoras no epitélio pulmonar em desenvolvimento.

Palavras-chave: Pulmão. Desenvolvimento pulmonar. Notch. Células ciliadas. Células secretoras.

ABSTRACT

Vasconcelos, M. The role of Notch signaling in lung epithelial differentiation. [Ph.D. thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2011.

The airway epithelium comprises a diverse population of secretory, ciliated, basal and neuroendocrine cells (NE). The proper balance of these cell types is critical for normal lung function and can be altered dramatically in conditions, such as asthma. We studied the role of Notch in airway progenitor cell fate by conditionally inactivating *Rbpjk* or *Pofut1*, two critical Notch pathway components in mouse mutants. This resulted in airways overpopulated with ciliated and NE cells and absence of secretory Clara cells. We found that Notch suppresses the ciliated and the NE cell programs to allow secretory cell differentiation through a lateral inhibition mechanism. We also identified genes associated with the differentiation of secretory and ciliated cells through a microarray gene profiling experiment. The great heterogeneity of gene expression patterns suggested that Notch plays a role in establishing multiple subsets of secretory and ciliated cells in the developing lung.

Key words: Lung. Lung development. Notch. Ciliated cells. Secretory cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Anatomia do sistema respiratório em humanos.....	21
Figura 2- Fases do desenvolvimento pulmonar segundo critérios histológicos.....	23
Figura 3 - Desenvolvimento pulmonar em camundongos	24
Figura 4- Padrão próximo-distal de diferenciação de células ciliadas pulmonares.....	29
Figura 5 - Estrutura dos receptores Notch e seus ligantes.....	38
Figura 6 - A via de sinalização Notch.....	40
Figura 7 - Mecanismos de ação da via de sinalização Notch.....	44
Figura 8 - Inativação de Notch (in vitro) nas fases iniciais do desenvolvimento pulmonar	47
Figura 9 - Microarrays	63
Figura 10 - Deleção condicional de Pofut1 e expressão de genes-alvo da via de sinalização Notch no pulmão de camundongos.....	66
Figura 11- Anormalidades pós-natais de Pofut1 ^{cnull}	68
Figura 12 - Formação da região distal do pulmão em mutantes Pofut1 ^{cnull}	70
Figura 13 - A inativação epitelial de Notch perturba a formação de células de Clara.....	73
Figura 14 - TUNEL - processos de morte celular não são responsáveis pela ausência de células de Clara em mutantes	74
Figura 15 - Efeito da inativação de Notch em outras linhagens respiratórias	75
Figura 16 - A inativação epitelial de Notch, via Rbpjk, também perturba a formação de células de Clara.	75
Figura 17- A inativação epitelial de Notch aumenta dramaticamente o número de células ciliadas no epitélio pulmonar	78
Figura 18 - Inibição farmacológica de Notch reproduz o padrão anormal de diferenciação observado nos mutantes	80
Figura 19 - Efeito da inativação de Notch em outras linhagens respiratórias	81

Figura 20 - Efeito da inativação de Notch em outras linhagens respiratórias	82
Figura 21 - Diferenciação aberrante é acompanhada por uma redução nos níveis de proliferação celular em pulmões mutantes	84
Figura 22 - Eventos relacionados às fases iniciais do processo de diferenciação em pulmões de Pofut1 ^{cnul}	86
Figura 23 - Efeito da deleção de Pofut1 na expressão de Sox2.....	90
Figura 24 - Expressão dos componentes da via de sinalização Notch no epitélio pulmonar em desenvolvimento.....	92
Figura 25 - Análise do perfil global de expressão gênica nos modelos Pofut1 e Rbpjk.....	94
Figura 26 - Genes subexpressos em Pofut1 ^{cnul} e Rbpjk ^{cnul} estão associados ao fenótipo secretor	98
Figura 27- Heterogeneidade do padrão de expressão de genes associados ao fenótipo secretor	100
Figura 28 - Genes superexpressos em Pofut1 ^{cnul} e Rbpjk ^{cnul} estão associados ao fenótipo ciliado.....	103
Figura 29 - Heterogeneidade do padrão de expressão de genes associados ao fenótipo ciliado.....	104
Figura 30 - Impacto da inativação epitelial de Notch sobre a expressão de genes associados ao fenótipo ciliado	107
Figura 31 - Impacto da inativação epitelial de Notch sobre a expressão de genes associados ao fenótipo ciliado	108
Figura 32 - Impacto da inativação epitelial de Notch sobre a expressão de genes associados ao fenótipo ciliado	109
Figura 33 - Genes diferencialmente expressos entre amostras em triplicata de explantes pulmonares controle VS DAPT.....	111
Figura 34 - Btl9.....	114
Figura 35 - Nov	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers para a amplificação de templates de cDNAs utilizados na síntese de ribossondas	58
Tabela 2 – Genes subexpressos em Pofut1 ^{cnull}	116
Tabela 3 – Genes superexpressos em Pofut1 ^{cnull}	117
Tabela 4 – Genes subexpressos em Rbpjk ^{cnull}	121
Tabela 5– Genes superexpressos em Rbpjk ^{cnull}	122
Tabela 6 – Genes subexpressos em explantes pulmonares tratados com DAPT	125
Tabela 7- Genes superexpressos em explantes pulmonares tratados com DAPT	128

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Anatomia do sistema respiratório	20
1.2 Fases do desenvolvimento pré-natal e pós-natal do pulmão	21
1.3 Indução de células progenitoras do sistema respiratório e formação do pulmão primordial	23
1.4 Formação da árvore brônquica e regulação do processo de morfogênese das vias aéreas por fatores de crescimento e de transcrição	24
1.5 Desenvolvimento do sistema vascular	26
1.6 Diferenciação do epitélio da árvore brônquica: diversidade de tipos celulares.....	28
1.6.1 Células ciliadas	28
1.6.1.1 Expressão de marcadores moleculares de células ciliadas	29
1.6.2 Células secretoras	30
1.6.2.1 Células de Clara	31
1.6.2.2 Células caliciformes.....	32
1.6.2.3 Células serosas	33
1.6.3 Células neuroendócrinas (NE)	33
1.6.4 Células basais	34
1.7 Diferenciação do pulmão distal	35
1.8 Sinalização Notch.....	37
1.8.1 Componentes da via de sinalização Notch.....	37
1.8.2 A via de sinalização Notch	38
1.8.3 Processamento dos receptores Notch.....	40
1.8.4 Sinalização Notch: mecanismos de ação	41
1.8.5 O papel da sinalização Notch no tecido pulmonar	44
1.9 Hipótese de trabalho.....	47
1.9.1 Modelos genéticos <i>Pofut1^{cnull}</i> e <i>Rbpjk^{cnull}</i>	48
2 OBJETIVOS.....	50
2.1 Objetivo geral	51
2.2 Objetivos específicos	51
3 MATERIAL E MÉTODOS	52
3.1 Animais e genotipagem	53
3.2 Cultura de explantes pulmonares.....	53
3.3 Microdissecção do mesênquima e epitélio pulmonar	54
3.4 Hematoxilina-eosina	54

3.5 Ácido periódico de <i>schiff</i> (PAS) e coloração para <i>alcian blue</i> (AB).....	54
3.8 Hibridização <i>in situ</i>	56
3.9 Imunohistoquímica	58
3.10 Morfometria.....	60
3.11 PCR em tempo real	60
3.12 Microarray	61
3.12.1 Sistema <i>in vivo</i>	61
3.12.2 Sistema <i>in vitro</i>	61
3.12.3 Microarray- hibridização e análise dos dados.....	61
4 RESULTADOS.....	64
4.1 Deleção condicional de Pofut1 perturba a sinalização Notch resultando em morte neonatal e defeitos pulmonares	65
4.3 Deleção condicional de Pofut não perturba a formação da região distal do pulmão embrionário.....	68
4.4 A deleção condicional de Pofut1 perturba a formação de células de Clara..	70
4.5 A inativação condicional de Rbpjk resulta nas mesmas anormalidades de Pofut1 ^{cnul}	75
4.6 As vias aéreas de Pofut1 ^{cnul} e Rbpjk ^{cnul} são super-populadas por células ciliadas	76
4.7 As anormalidades na diferenciação epitelial de Pofut1 ^{cnul} e Rbpjk ^{cnul} foram reproduzidas em um modelo farmacológico de inibição da via de sinalização Notch	79
4.8 Efeito da inativação da via de sinalização Notch em outras linhagens respiratórias	80
4.9 O padrão anormal de diferenciação epitelial observado em Pofut1 ^{cnul} e Rbpjk ^{cnul} é acompanhado por uma redução substancial nos níveis de proliferação celular	82
4.10 Notch restringe o comprometimento de progenitores respiratórios ao fenótipo ciliado.....	84
4.11 Efeito da inativação de Notch na expressão de Sox2	87
4.12 Anormalidades no processo de diferenciação celular estão associadas com a expressão anormal dos componentes da via de sinalização Notch.....	91
4.13 Identificação de genes-alvo da sinalização Notch durante a diferenciação do epitélio pulmonar	93
4.13.1 Microarray - sistema <i>in vivo</i>	93
4.13.2 Affymetrix's - mouse genome 430 2.0 array chips.....	93
4.13.3 Genes subexpressos em Pofut1 ^{cnul} e Rbpjk ^{cnul}	96
4.13.4 Genes subexpressos em Pofut1 ^{cnul} e Rbpjk ^{cnul} - confirmação dos dados do microarray através de ensaios de hibridização <i>in situ</i>	97

4.13.5 Genes subexpressos em Pofut ^{cnul} e Rbpjk ^{cnul} – análise do padrão de expressão gênica	99
4.13.6 Genes superexpressos em Pofut ^{cnul} e Rbpjk ^{cnul}	100
4.13.7 Genes superexpressos em Pofut1 ^{cnul} e Rbpjk ^{cnul} - confirmação dos dados do microarray através de ensaios de hibridização <i>in situ</i>	101
4.13.8 Genes superexpressos em Pofut1 ^{cnul} e Rbpjk ^{cnul} – análise do padrão de expressão gênica	105
4.14 Identificação de genes-alvo da sinalização Notch durante a diferenciação do epitélio pulmonar	110
4.14.1 Microarray - sistema <i>in vitro</i>	110
4.14.2 Affymetrix's – mouse genome exon array chips 1.0 ST	110
4.14.3 Confirmação dos dados gerados pelo microarray através de ensaios de hibridização <i>in situ</i>	112
5 DISCUSSÃO	131
5.1 O papel da sinalização Notch na diferenciação do epitélio pulmonar	132
5.2 Microarray - sistema <i>in vivo</i> : Identificação de genes associados ao fenótipo ciliado e secretor.....	135
5.2.1. Microarray - sistema <i>in vitro</i>	136
6 CONCLUSÕES	138
REFERÊNCIAS.....	141
ANEXOS	153
ARTIGOS PUBLICADOS	154
ANEXO A - Notch signaling controls the balance of ciliated and secretory cell fates in developing airways.....	154
ANEXO B - Activation dynamics and signaling properties of Notch3 in the developing pulmonary artery	166
ANEXO C- Artigo em revisão (PNAS): The neuroendocrine microenvironment generates a distinct subpopulation of secretory cell precursors in the developing airways.....	189

1 INTRODUÇÃO

O trato respiratório é um dos sistemas mais complexos do corpo de mamíferos. Formado por uma grande variedade de tipos celulares, o pulmão apresenta uma arquitetura desenhada para otimizar a execução de sua principal função: trocas gasosas. Para tanto, conta com uma sofisticada rede de tubos condutores ramificados acoplada à milhares de unidades alveolares, onde há a realização de trocas gasosas e produção de surfactante.

Descreveremos a seguir como processos celulares, morfológicos e moleculares dão origem ao sistema respiratório. Apresentaremos uma revisão sobre os mecanismos envolvidos na especificação de progenitores respiratórios e na formação dos primórdios pulmonares. Discutiremos também, como a porção condutora e respiratória são formadas no pulmão em desenvolvimento.

Os vários aspectos supracitados terão como base o sistema respiratório de camundongos (a não ser quando especificado de outro modo), o modelo animal que tem permitido investigar as bases genéticas do desenvolvimento pulmonar.

1.1 Anatomia do sistema respiratório

O sistema respiratório de mamíferos é formado por duas porções: a porção condutora e a respiratória. A porção condutora é constituída pela traquéia, brônquios primários e secundários (lobares), que dão origem à várias gerações subsequentes de brônquios e bronquíolos. Esta região é responsável por limpar, humidificar e conduzir o ar inspirado à região respiratória. Traquéia e parte dos brônquios primários constituem a porção extrapulmonar do sistema respiratório (Figura 1, asteriscos vermelhos), enquanto que as demais estruturas se encontram na porção intrapulmonar (Figura 1).

A porção respiratória é formada por bronquíolos respiratórios (presentes apenas em humanos), ductos alveolares e alvéolos (Figura 1), onde ocorrem as trocas gasosas entre o ar (presente nos alvéolos) e as hemácias que circulam pela rede vascular.

Figura 1 - Anatomia do sistema respiratório em humanos

O sistema respiratório é formado por uma porção condutora (situada em uma região mais proximal), e por uma porção respiratória (região mais distal). A porção condutora é constituída por estruturas extra e intrapulmonares. Traquéia e parte dos brônquios primários foram a região extrapulmonar (marcada por *). Parte dos brônquios primários e todos os demais segmentos acima ilustrados, compõem a região intrapulmonar. Brônquios primários, se ramificam e formam brônquios secundários, que após sucessivas ramificações dão origem aos bronquíolos. A região mais distal dos bronquíolos corresponde aos bronquíolos terminais que desembocam na região respiratória do pulmão, formada pelos bronquíolos respiratórios, ductos e sacos alveolares.

FONTE: Adaptado de Junqueira e Carneiro (2005).

1.2 Fases do desenvolvimento pré-natal e pós-natal do pulmão

Com base em critérios histológicos, o desenvolvimento pulmonar é classicamente subdividido em quatro fases: pseudoglandular, canalicular, sacular e alveolar. Estas fases definem eventos de morfogênese que ocorrem a partir da formação dos primórdios pulmonares à formação das estruturas alveolares. O início e a duração de cada uma destas fases variam entre espécies (Figura 2).

A fase pseudoglandular é marcada por um processo dinâmico de ramificação dos brônquios primários em um sistema de condutos que constituirá a porção condutora do trato respiratório (também conhecida como árvore brônquica). Nesta fase, o pulmão embrionário assemelha-se a uma estrutura glandular (daí o termo

pseudoglandular), sendo formado por um conjunto de tubos epiteliais circundados por uma espessa camada mesenquimal. O epitélio proximal (traqueal) apresenta características colunares, enquanto que o epitélio distal, adquire aspecto cuboidal. Também ocorre nesse período, a formação e ramificação da vasculatura pulmonar. Ainda nesta fase, inicia-se a expressão de RNA mensageiro que codifica para proteínas do surfactante pulmonar.

O estágio subsequente, conhecido como fase canalicular, é marcado pela formação completa da árvore brônquica. O mesênquima que circunda os tubos epiteliais passa a ser mais reduzido, aproximando estas estruturas aos vasos sanguíneos em desenvolvimento. Células epiteliais proximais começam a expressar marcadores de diferenciação celular de vias aéreas (Cardoso e Malpel, 2000).

A fase sacular, corresponde ao período em que o pulmão embrionário se prepara para o estabelecimento da região alveolar. Para tanto, a porção distal do pulmão se expande (a fim de acomodar estruturas pré-alveolares ou sáculos), e células epiteliais distais se diferenciam em pneumócitos tipo I e II. Pneumócitos tipo I organizam-se em justaposição aos vasos pulmonares, e pneumócitos tipo II começam a secretar surfactante. Estes sáculos crescerão, sofrerão septação e formarão alvéolos maduros durante a fase de alveolarização. Esta fase inicia-se, em humanos, um pouco antes do nascimento, e a partir do 5º dia de vida pós-natal em camundongos. O processo de septação subdivide os sáculos pré-existentes em unidades menores aumentando, desta maneira, a superfície de contato para as trocas gasosas (Malpel e Cardoso, 2001).

Figura 2- Fases do desenvolvimento pulmonar segundo critérios histológicos

As barras apresentadas acima representam os diferentes períodos do desenvolvimento pulmonar, bem como a duração de cada um deles em camundongos e humanos. S= semanas, dpc= dias pós-coito.

FONTE: Adaptado de Cardoso e Malpel (2001). Com permissão.

1.3 Indução de células progenitoras do sistema respiratório e formação do pulmão primordial

O endoderma do tubo intestinal primitivo dá origem a diversos órgãos como a tireóide, timo, pulmão, estômago, fígado e pâncreas. Embora alvo de muitos estudos, ainda não se conhece o mecanismo pelo qual progenitores endodérmicos são especificados em progenitores respiratórios, tampouco precisamente como estes são expandidos e organizados nas diferentes regiões que formam o trato respiratório.

Logo após a gastrulação, o endoderma embrionário corresponde a uma monocamada celular. Processos morfogênicos transformam essa camada de células em um tubo (denominado tubo intestinal primitivo), que será especificado em brotos (como o broto do pulmão, estômago, fígado e pâncreas) ao longo de seu eixo ântero-posterior.

O primeiro indício de precursores respiratórios no endoderma do tubo intestinal primitivo é registrado pela expressão de TTF1 (*thyroid transcriptional factor 1*, fator de transcrição do tipo homeobox, também conhecido como Nkx2-1) (Cardoso e Lu, 2006, Minoo et al., 1999). A expressão de TTF1 demarca o território onde a tireóide e os pulmões serão formados (Figura 3A -B).

Durante o desenvolvimento embrionário, primórdios pulmonares são estabelecidos através da expansão lateral de progenitores respiratórios presentes na face ventral do tubo intestinal primitivo (Figura 3C) (Cardoso e Lu, 2006).

Estes primórdios expandem-se continuamente e, conseqüentemente, fundem-se na linha média para formar os primórdios dos pulmões direito e esquerdo, que constituirão os brônquios primários do pulmão maduro (Figura 3D, setas vermelhas).

Figura 3 - Desenvolvimento pulmonar em camundongos

Os pulmões se originam a partir de uma região do tubo intestinal primitivo, situada entre áreas que contêm precursores do fígado e tireóide (A). Os precursores da traquéia e pulmão são identificados através da expressão de TTF1 aos 9 dpc em camundongos (B). Estes precursores formam dois botões ventro-laterais (setas) (C) que darão origem aos primórdios pulmonares (setas vermelhas) aos 9.5 dpc (D). Estes primórdios pulmonares se ramificam em novas gerações de pequenos brotos pulmonares (setas vermelhas) (E) formando a árvore brônquica. Aos 12 dpc há o estabelecimento de um eixo proximo-distal onde a região da traquéia e brônquios correspondem à região mais proximal do pulmão (em amarelo), e as regiões mais distais, correspondem a porção alveolar, responsável pelas trocas gasosas. A= Anterior; P= Posterior; V= Ventral; D= Distal; Th= Tireóide; Tr= Traquéia; Lu= Pulmão; Li= Fígado; Pa= Pâncreas; Pd= Pulmão direito; Pe= Pulmão esquerdo, dpc= dias pós-coito.

FONTE: Adaptado de Cardoso e Lu (2006). Com permissão.

1.4 Formação da árvore brônquica e regulação do processo de morfogênese das vias aéreas por fatores de crescimento e de transcrição

A partir da formação dos brônquios primários, uma série de eventos morfogenéticos contribuem para o subsequente estabelecimento da árvore brônquica.

Primórdios dos pulmões direito e esquerdo passam por um processo de sucessivas subdivisões (Figura 3E) (que se assemelha ao padrão de crescimento

de uma árvore, daí o nome árvore brônquica). Este processo gera múltiplos tubos respiratórios, conectados aos brônquios primários, estabelecendo um eixo próximo-distal no pulmão embrionário, onde a região proximal (Figura 3F, em amarelo) dará origem à árvore brônquica do pulmão adulto (brônquios e bronquíolos), e a região distal (Figura 3F, em verde) à área alveolar (responsável pelas trocas gasosas) (Cardoso e Lu, 2006).

Os eventos descritos acima são precisamente regulados através da interação de sinais presentes entre as camadas epiteliais e mesenquimais do pulmão embrionário. O estabelecimento dos primórdios pulmonares, como por exemplo, é dependente da via de sinalização Fgf (*fibroblast growth factor* ou fator de crescimento de fibroblasto) que é ativada através da expressão localizada de Fgf10 no mesoderma e de seu receptor Fgfr2 no endoderma do pulmão em desenvolvimento (Cardoso e Lu, 2006). Bellusci et al. (1997), sugeriram que a interação entre estes componentes determina o estabelecimento dos primórdios pulmonares, uma vez que estes encontraram-se ausentes em camundongos nocaute para Fgf10. Há relatos também sobre a importância desta via de sinalização na indução dos processos de ramificação dos primórdios pulmonares. Experimentos *in vitro* indicaram que Fgf10 estimula a proliferação de células epiteliais durante a fase de ramificação dos primórdios pulmonares (Park et al., 1998).

Enquanto que a sinalização via Fgf induz a ramificação dos primórdios pulmonares, existe um mecanismo que restringe este processo através de um *feedback* que é gerado pela interação epitélio-mesenquimal e envolve a sinalização por Shh (*Sonic Hedgehog*). Shh é expresso na forma de um gradiente próximo-distal, predominantemente, nas extremidades epiteliais distais em ramificação. Seu receptor Ptc1 (*Patched1*) e fatores de transcrição como Gli1-3 (pertencentes à via de sinalização Shh), são expressos no mesênquima pulmonar (Bellusci et al., 1997). O papel de Shh sobre a sinalização Fgf foi demonstrado através de experimentos onde a superexpressão de Shh em camundongos transgênicos resultou na inibição de Fgf10 no mesênquima (Lebeche et al., 1999). Adicionalmente, animais nocaute para Shh apresentaram defeitos na ramificação da árvore brônquica, que foram acompanhados por um padrão difuso de expressão de Fgf10 (Pepicelli et al., 1998). Estes trabalhos sugeriram que a expressão epitelial de Shh no pulmão em

desenvolvimento, age inibindo a expressão local de Fgf10 no mesênquima, de modo a prevenir que o processo de ramificação epitelial ocorra indevidamente.

Entre a lista de fatores de transcrição essenciais à correta morfogênese pulmonar, destaca-se Ttf1 (3º parágrafo de 1.3). Expresso antes mesmo da formação dos primórdios pulmonares, Ttf1 é inicialmente observado uniformemente nos progenitores respiratórios. Com a formação da árvore brônquica (Figura 1E), se estabelece um gradiente próximo-distal de expressão, onde níveis mais intensos são observados nos tubos epiteliais da região mais distal do pulmão embrionário. Camundongos nocaute para Ttf1 morrem logo após o nascimento, apresentando uma série de anormalidades respiratórias caracterizadas, principalmente, pela presença de um pulmão não ramificado sem evidência alguma de diferenciação dos tipos celulares pulmonares (Minoo et al., 1999).

O estabelecimento de identidades próximo-distais no pulmão embrionário também é um processo que depende de uma complexa regulação por vias de sinalização, que inclui membros da família de Tgf β (*transforming growth factor β*) e Wnt (*wingless-type*). Como por exemplo, um estudo realizado em camundongos transgênicos deficientes em Bmp4 (*bone morphogenetic protein 4*, da família Tgf β) no epitélio pulmonar, apresentaram na região distal (região alveolar), tipos celulares típicos da região proximal (como células ciliadas ou secretoras). Este achado sugeriu, portanto, que a via de sinalização Bmp instruí progenitores respiratórios a assumir um fenótipo distal (Weaver et al., 1999).

Em resumo, a regulação do desenvolvimento pulmonar conta com a interação de uma grande variedade de vias de sinalização e com a coordenação de múltiplas atividades celulares, tais como, crescimento, padronização e diferenciação.

1.5 Desenvolvimento do sistema vascular

O desenvolvimento do sistema vascular ocorre concomitantemente com o estabelecimento da árvore brônquica e é essencial ao adequado funcionamento do pulmão pós-natal. Os processos de trocas gasosas dependem da interação entre o epitélio alveolar e a rede de vasos sanguíneos circundante.

A vascularização pulmonar ocorre através de processos de vasculogênese e angiogênese. Na vasculogênese, precursores endoteliais provenientes do mesênquima pulmonar se diferenciam e formam uma rede vascular *in situ*, ou seja, ao redor do epitélio distal em desenvolvimento. Na angiogênese, vasos sanguíneos se formam a partir de vasos que migram dos arcos aórticos ao pulmão em desenvolvimento (deMello et al., 1997).

Atualmente é aceito que a vasculatura distal se origina por vasculogênese, enquanto que a proximal, é estabelecida via angiogênese (Parera et al., 2005). Logo nas fases iniciais do desenvolvimento pulmonar, plexos capilares proximais e distais se fundem para estabelecer a futura barreira alvéolo-capilar. Artérias e veias se desenvolvem a partir do arco aórtico e átrio esquerdo, respectivamente. Vasos da região proximal e distal se conectam para estabelecer uma rede vascular no pulmão em desenvolvimento. A união destas estruturas vasculares é acompanhada por um processo de ramificação das artérias, seguindo o padrão de ramificação das vias aéreas (Cardoso, 2001).

A contribuição relativa dos processos de angiogênese e vasculogênese no crescimento vascular pulmonar é desconhecida. Modelos experimentais apropriados serão necessários para investigação destes mecanismos.

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um mitógeno envolvido nos processos de angiogênese e vasculogênese. O VEGF, expresso no epitélio pulmonar, se liga aos receptores de tirosina-kinase transmembrana VEGFR-1 (flt-1) e VEGFR-2 (flk-1/KDR), expressos por precursores endoteliais. Uma série de estudos sugeriu que VEGFs desempenham papel crítico no desenvolvimento do sistema vascular pulmonar. Como por exemplo, camundongos deficientes em VEGFa apresentaram problemas na formação de vasos sanguíneos na região distal do pulmão. Por outro lado, a super expressão de VEGFs no pulmão em desenvolvimento resultou na estimulação do crescimento de vasos sanguíneos (Drake e Little, 1995; Flamme et al., 1995a,b; Gebb e Shannon, 1998; Yamaguchi et al., 1993).

1.6 Diferenciação do epitélio da árvore brônquica: diversidade de tipos celulares

O epitélio da árvore brônquica é caracterizado por uma grande variedade de tipos celulares que inclui: células ciliadas, secretoras, basais e neuroendócrinas. Estas células são distribuídas diferencialmente ao longo do eixo traqueo-bronquial, sendo que a abundância e o padrão de distribuição que apresentam no epitélio, podem variar entre espécies e também entre os diferentes segmentos da árvore brônquica.

A seguir, descreveremos como estes tipos celulares são distribuídos e identificados no pulmão em desenvolvimento. Discutiremos em mais detalhes aspectos morfológicos e moleculares que definem cada um destes tipos celulares, já que estes constituem uns dos focos desta tese.

1.6.1 Células ciliadas

Células ciliadas são amplamente distribuídas, sendo encontradas da traquéia ao segmento mais distal da árvore brônquica (bronquíolos terminais).

Estas células atuam como protagonistas nos mecanismos de defesa do sistema respiratório, participando eficientemente do transporte muco ciliar ao propelir do pulmão partículas tóxicas que são inaladas. Falha no transporte mucociliar é uma das características de doenças crônicas como a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), a fibrose cística e doenças genéticas, como a displasia ciliar primária (Bateman et al., 1983; Miller, 1973; Veerman et al., 1983).

Em camundongos e humanos, o processo de diferenciação de progenitores pulmonares em células ciliadas começa no final da fase pseudoglandular, estendendo-se à vida pós-natal. Um estudo realizado por Toskala et al. (2005), demonstrou que células ciliadas do pulmão adulto se organizam diferencialmente ao longo dos diversos segmentos do trato respiratório (Figura 4A-C). De acordo com este trabalho, células ciliadas da traquéia e dos brônquios primários dispõem-se em agrupamentos de 4 a 6 células e apresentam cílios que cobrem toda a superfície celular. Células ciliadas dos bronquíolos, entretanto, organizam-se isoladamente ou em pares, com cílios de tamanho reduzido.

O mesmo estudo revelou que o padrão de distribuição de células ciliadas observado no pulmão adulto é recapitulado durante o desenvolvimento embrionário. Os autores demonstraram que células ciliadas aparecem na traquéia pela primeira vez aos 16 dpc (dias pós-coito) de forma isolada, mas com o desenvolvimento, se agrupam em um conjunto de 4 a 5 células portadoras de longos cílios. Porém, mais distalmente, relataram a presença de células ciliadas apenas a partir dos 18 dpc, sendo estas dispostas isoladamente e com estrutura ciliar bastante reduzida (Toskala et al., 2005).

Portanto, este trabalho deixou claro que células ciliadas seguem um padrão próximo-distal de diferenciação, o qual é estabelecido durante as fases de formação do pulmão embrionário.

Figura 4- Padrão próximo-distal de diferenciação de células ciliadas pulmonares

Imagens de microscopia eletrônica da traquéia (A) brônquio primário e (C) bronquíolo terminal de camundongos adultos. A diferenciação próximo-distal de células ciliadas estabelece diferenças entre os diversos segmentos respiratórios. Na traquéia (A), região mais proximal, células ciliadas apresentam cílios longos que revestem toda a superfície celular, e encontram-se dispostas em agrupamentos de 4 a 6 células. No brônquio primário (B) e bronquíolo terminal (C), há uma redução gradativa no tamanho ciliar, sendo que células ciliadas são observadas em agrupamentos de 3 a 4 células, e apenas aos pares ou isoladamente, respectivamente.

FONTE: Adaptado de Toskala et al. (2005). Com permissão.

1.6.1.1 Expressão de marcadores moleculares de células ciliadas

De acordo com critérios morfológicos, cílios podem ser detectados pela primeira vez na traquéia e nos brônquios primários aos 16 dpc (Toskala et al., 2005).

Molecularmente, estas estruturas são convencionalmente identificadas através do uso de anticorpos contra β -tubulina IV, um dos componentes protéicos dos microtúbulos que formam os cílios, e que é expressa a partir dos 16 dpc no

epitélio respiratório. O fator de transcrição denominado Foxj1 (*Forkhead box transcription factor*) identifica progenitores respiratórios que darão origem às células ciliadas. Atualmente, Foxj1 é considerado o marcador mais precoce do fenótipo ciliado, dado que sua expressão é observada aos 14.5 dpc em células que, mais tardiamente, manifestarão fenótipos característicos de células ciliadas (como a expressão de β -tubulina IV, por exemplo) (Blatt et al., 1999; Rawlins et al., 2007).

Foxj1 regula uma série de genes associados à ciliogênese no epitélio pulmonar, como ezrin e calpastatina (Gomperts et al., 2004; Huang et al., 2003). Brody et al. (1997) e Chen et al. (1998), demonstraram que camundongos nocaute ou mutantes para Foxj1 (respectivamente), não apresentavam cílios. Este dado contribuiu com a idéia onde Foxj1 seria crucial para especificar progenitores respiratórios ao fenótipo ciliado. Estudos mais recentes, entretanto, indicaram que Foxj não é suficiente para induzir o fenótipo ciliado, mas está envolvido em processos mais tardios da ciliogênese. Gomperts et al. (2004) e You et al. (2004) revelaram que Foxj1 regula o ancoramento de corpos basais (estruturas que formam uma superfície de ancoragem ciliar) ao citoesqueleto das células ciliadas, conferindo orientação e alinhamento adequados para a projeção ciliar.

1.6.2 Células secretoras

Crítérios morfológicos como abundância de grânulos secretores e presença de um retículo endoplasmático agranular foram, por muito tempo, utilizados na classificação de células secretoras (Dodge et al., 1993). De acordo com esta classificação, três categorias de células secretoras foram definidas, sendo elas: células de Clara, células serosas e células caliciformes (células muco-secretoras) (Basbaum e Finkbeiner, 1988).

Atualmente, sabemos que esta classificação apresenta sérias discrepâncias quando contextualizada a critérios moleculares e funcionais. Estudos mais recentes demonstraram que, embora morfológicamente distintas, células secretoras do trato respiratório podem desempenhar funções extremamente semelhantes. Trabalhos baseados em critérios moleculares também revelaram que, dentro desta três categorias de células secretoras, há múltiplos subtipos celulares com funções diversas (que serão descritos a diante) (Reynolds et al., 2002). Portanto,

atualmente, células secretoras do epitélio pulmonar são, quando possível, discriminadas de acordo com duas identidades moleculares.

1.6.2.1 Células de Clara

Células de Clara são células epiteliais não-ciliadas, colunares, que podem ser identificadas logo aos 16.5 dpc pela expressão do produto que secretam CC10 (*Clara cell secretory protein 10 KD*) (também denominado Scgb1a1- Reynolds, 2002). No pulmão adulto, a porção apical destas células assume um formato de cúpula, fazendo com que estas sejam prontamente distinguidas dos demais tipos epiteliais.

Há evidências na literatura de que durante o desenvolvimento pulmonar, células de Clara se diferenciam através de um programa genético mediado pela sinalização Notch (descrito em maiores detalhes mais adiante) (Ito et al., 2000).

Células de Clara são amplamente distribuídas, sendo encontradas na região traqueal, nos brônquios primários e nos bronquíolos do pulmão de camundongos. Apresentam como função a proteção do epitélio pulmonar através de seus produtos de secreção, além de degradarem toxinas do ar pela ação de enzimas citocromo P-450 em seu retículo endoplasmático liso. Células de Clara também agem como progenitores de células epiteliais pulmonares mediante a processos de regeneração pós-injúria, e desempenhando funções imuno-regulatórias (Pack et al., 1981).

A expressão do marcador CC10 exemplifica as discrepâncias entre definições morfológicas e moleculares mencionadas anteriormente. Acreditava-se, inicialmente, que a expressão de CC10 era restrita às células de Clara (Singh et al., 1997). Todavia, observou-se que este marcador também era expresso por subtipos de células serosas e caliciformes do pulmão adulto de humanos (Boers et al., 1999; Engelhardt et al., 1994; Hay et al., 1995).

Evidências sobre a existência de subpopulações de células de Clara não são recentes. Há quase duas décadas atrás, uma rara subpopulação de células de Clara foi identificada. Este tipo celular, designado, Células de Clara do tipo variante (*Variant Clara Cells*) se distingue das outras células de Clara pela sua resistência ao tratamento com naftalina (um hidrocarboneto aromático capaz de danificar o epitélio respiratório). Tal resistência é conferida graças à ausência da expressão de enzimas do complexo citocromo P450, como a Cyp2f2, que metabolizam a naftalina

em produtos tóxicos. Células de Clara do tipo variante são, tipicamente, encontradas em contato com células neuroendócrinas nos brônquios principais ou em sítios de ramificação situados na altura da terminação bronquíolo-alveolar (Giangreco et al. 2002; Hong et al., 2001; Stripp et al., 1995). Este subtipo celular responde rápida e efetivamente aos processos de injúria do tecido pulmonar, agindo como progenitores (dado que são capazes de dar origem a tipos celulares ciliados e não ciliados) (Lawson et al., 2002; Plopper et al., 1994; Rawlins e Hogan, 2006; Stripp et al., 1995; Van Winkle et al., 2001).

A caracterização de dois membros da família das secretoglobinas, Scgb3a1 e Scgb3a2 ressaltou a existência de múltiplas subpopulações de células de Clara. O padrão de expressão de Scgb3a2 indicou que este gene é um marcador precoce de células de Clara sendo expresso em células positivas para CC10, ao longo da traquéia e árvore brônquica. Scgb3a1, por sua vez, apresentou um padrão de expressão mais localizado, apresentando-se restrito aos subtipos de células de Clara (positivos para CC10) presentes na traquéia e brônquios primários (Reynolds et al., 2002).

1.6.2.2 Células caliciformes

Células caliciformes são amplamente distribuídas ao longo da árvore brônquica em humanos. Em camundongos, entretanto, estas células são raramente observadas em indivíduos saudáveis. Quando presentes, apresentam-se restritas à região traqueal. Doenças como asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e contato com agentes alergênicos, resultam em um aumento relevante no número destas células no epitélio pulmonar (Aikawa et al., 1992; Vestbo, 2002). De acordo com critérios histopatológicos, esta condição também é conhecida como metaplasia das células caliciformes.

Células caliciformes são capazes de secretar mucinas para formação da camada de muco que protege as vias aéreas contra patógenos inalados. Apesar de sua importância em doenças respiratórias, pouco se sabe sobre a origem e desenvolvimento deste tipo celular.

Uma série de estudos demonstrou que interleucinas (como IL4 e IL-13), fatores de transcrição como Foxa2 e Spdef (*SAM pointed domain-containing etc transcription factor*), influenciam a diferenciação de células caliciformes (Chen et al.,

2009; Grunig et al., 1998; Jain-Vora et al., 1997; Park et al., 2007; Wan et al., 2004; Wills-Karp et al., 1998). Evidências recentes sugerem que a sinalização Notch desempenha um papel crucial no controle da diferenciação deste tipo celular (Tsao et al., 2011).

Em contraste com os outros tipos celulares descritos acima, células caliciformes desenvolvem-se apenas durante o período pós-natal (Pack et al., 1980), podendo ser identificadas através da expressão de marcadores como Muc5ac (principal mucina constituinte do muco) e Spdef.

1.6.2.3 Células serosas

Células serosas constituem um tipo celular muito raro no tecido pulmonar. Estão localizadas nas proximidades das glândulas da submucosa presentes na região mais proximal do sistema respiratório. Estas células secretam um fluido aquoso rico em antibióticos considerados importantes para a defesa contra infecções pulmonares (Finkbeiner et al., 1992).

Adicionalmente, produtos de secreção de células serosas contribuem para o volume, composição e consistência das secreções das glândulas submucosas (Devor et al., 1999).

Devido ao fato de ser raramente encontrado no tecido pulmonar e, pela dificuldade de mantê-lo em cultura, pouco se sabe sobre esse tipo celular.

1.6.3 Células neuroendócrinas (NE)

Células neuroendócrinas pulmonares representam um tipo celular relativamente raro, que organiza-se tanto isoladamente como em agrupamentos celulares (clusters celulares, conhecidos como *neuroendocrine bodies*). Estas células são observadas a partir da região dos brônquios primários aos ductos alveolares (região limite entre bronquíolos e alvéolos) (Ito et al., 2000; Linnoila, 2006). A partir de 16.5 dpc, células NE podem ser identificadas através do uso de anticorpos contra produtos que secretam como, CGRP (*Calcitonin gene related peptide*) e PGP 9.5 (*Protein gene product 9.5*).

As funções que exercem no epitélio respiratório não são precisamente conhecidas. Entretanto, há evidências que lhes atribuem um papel no controle do

crescimento e morfogênese do pulmão embrionário, servindo como sensores de oxigênio durante a vida adulta (Hoyt et al., 1991; Sunday et al., 1993; Youngson et al., 1993).

Estudos genéticos em camundongos demonstram que Mash1 (*achaete-scute complex-like1*), um fator de transcrição da família *basic helix-loop-helix*, é fundamental para a formação deste tipo celular. Camundongos deficientes para Mash1 morrem ao nascimento e não apresentam células NE no pulmão nem no sistema nervoso (Guillemot et al., 1993).

1.6.4 Células basais

Células basais estão dispostas nas proximidades da lâmina basal do epitélio respiratório. Em camundongos, são encontradas restritamente na região traqueal e dos brônquios principais. Em humanos, em contraste, são amplamente distribuídas, estando presentes a partir da região traqueal aos bronquíolos terminais (Boers et al., 1998; Evans et al., 2001; Nakajima et al., 1998).

Estas células podem ser identificadas pela expressão de marcadores moleculares específicos como o fator de transcrição Trp-63 (*transcription factor transformation-related protein*, também conhecido como p63), citoqueratina 14 (Krt14) e citoqueratina 5 (Krt 5) (Daniely et al., 2004; Evans et al., 2001; Schoch et al., 2004).

Há, atualmente, um corpo substancial de evidências indicando que células basais compreendem uma população de progenitores multipotentes, capazes de dar origem aos demais tipos celulares do epitélio respiratório durante os processos de regeneração pós-injúria (Randell, 2006; Rawlins e Hogan, 2006).

Borthwick et al. (2001), demonstraram que células basais reconstituem o epitélio respiratório após este ser exposto a injúria com SO₂ (dióxido de enxofre). Adicionalmente, foi relatado que estas células não apenas se auto-renovam, mas são capazes de originar células ciliadas e secretoras, durante os processos de regeneração pós-injúria com a naftalina (Hong et al., 2004). Outros trabalhos revelaram que células basais reconstituem o epitélio traqueal descamado em modelos experimentais de xenografts (Randell et al., 1991).

Embora haja inúmeras evidências sobre a importância de células basais na renovação do epitélio danificado, pouco se sabe sobre sua biologia e sobre os mecanismos que controlam suas propriedades de célula progenitora.

1.7 Diferenciação do pulmão distal

Com a árvore brônquica estabelecida, o pulmão embrionário começa a se preparar para a formação da região alveolar. Assim, durante a fase sacular, há uma grande expansão das porções terminais dos sistema de condutos que viabiliza o desenvolvimento de sáculos (estruturas pré-alveolares). O número de capilares entre estas estruturas aumenta, e a camada mesenquimal circundante começa a ser reduzida (Cardoso, 2001; Mallampalli et al., 1997). É nesta fase que o endoderma alveolar começa a se diferenciar em tipos celulares especializados .

Durante a fase de alveolização, estes sáculos crescerão, sofrerão uma adicional septação (também chamada de septação secundária) e formarão alvéolos maduros: estruturas delgadas responsáveis pelas trocas gasosas. A septação secundária subdivide os sáculos pré-existentes em unidades menores aumentando, desta maneira, a área de superfície para as trocas gasosas (Cardoso, 2001). Ainda para facilitar este processo, há uma aproximação entre o plexo capilar e as paredes alveolares de modo que, células endoteliais encontram-se justapostas aos pneumócitos tipo I. Capilares se organizam em camadas duplas na região da troca gasosa e, mais tardiamente, se remodelam para formar uma camada única (Rock et al., 2010).

Em humanos, a formação de alvéolos ocorre entre o final da embriogênese e início da vida pós-natal. Em camundongos, este processo só se inicia após o nascimento (Cardoso, 2001).

Dois tipos celulares constituem o epitélio alveolar: pneumócitos tipo I e II. Pneumócitos tipo I são células extremamente finas e planas que constituem cerca de 90% da área de superfície alveolar. Pneumócitos tipo II são células mais robustas, cuboidais, produtoras de surfactante e correspondem em cerca de 10% a área de superfície alveolar. Em casos de injúria, estas células atuam como células-tronco do epitélio alveolar, uma vez que pneumócitos tipo I não se dividem (Crapo et al., 1982; Evans et al., 1973).

Uma vez diferenciados, pneumócitos tipo I expressam, tipicamente, T1- α , uma proteína da membrana plasmática, amplamente caracterizada na literatura (Williams et al., 1996). Outros marcadores frequentemente utilizados para identificação de pneumócitos tipo I, são as aquaporinas 4 e 5 (Kreda et al., 2001).

Antígenos como ICAM-I (*intercellular adhesion molecule*) são abundantemente expressos por pneumócitos tipo I e podem estar envolvidos no estabelecimento e manutenção de características morfológicas como por exemplo, o achatamento celular (Attar et al., 1999).

Pneumócitos tipo I são caracterizados também por abundante expressão de caveolinas tipo I, proteínas transmembranas que desempenham funções no transporte de materiais celulares e na estocagem de mediadores de sinal (Newman et al., 1999).

Pouco se sabe sobre a regulação da diferenciação de pneumócitos tipo I. Há relatos sobre um papel potencial de BMP-4 favorecendo a formação destas células em detrimento da formação de pneumócitos tipo II. Em contrapartida, Fgf7 parece inibir a expressão de marcadores típicos de pneumócitos I, induzindo a expressão de genes que codificam para proteínas surfactantes (Borok et al., 1998)

Pneumócitos tipo II, por sua vez, expressam proteínas associadas ao surfactante pulmonar, como SP-A, SP-B, SP-C e SP-D (Creuwels et al., 1997) e começam a se diferenciar por volta da 24ª semana de gestação em humanos e 18 dpc em camundongos (Costa et al., 2001). Estas células apresentam corpos lamelares, inclusões citoplasmáticas que estocam fosfolipídios, principal componente do surfactante (Williams et al., 1996).

Fatores de transcrição como Gata-6, Ttf1, Hnf3 β , C/ebp α , hormônios glicocorticóides e Fgfs estão envolvidos na diferenciação de pneumócitos II e na expressão de proteínas associadas ao surfactante (Cardoso et al., 1997; Deterding et al., 1996; Melnick et al., 1996; Tichelaar et al., 2000).

A composição da matriz extracelular do epitélio alveolar influencia significativamente o status de diferenciação dos tipos celulares alveolares. A laminina, por exemplo, parece regular negativamente a diferenciação de pneumócitos tipo II *in vitro* (Schuger, 1997). Adicionalmente, o crescimento da vascularização pulmonar pode influenciar a diferenciação do epitélio adjacente, provavelmente, promovendo a diferenciação de pneumócitos tipo I (tipo celular que está em íntima associação com a rede capilar) (Schuger, 1997). Finalmente, há

relatos que pneumócitos tipo II localizam-se, preferencialmente, ao redor de fibras de elastina na parede alveolar (Honda et al., 2000).

1.8 Sinalização Notch

A sinalização Notch é uma via altamente conservada durante a evolução. Notch desempenha múltiplas funções na organização de embriões de vertebrados e também em processos celulares essenciais à sobrevivência de um organismo durante a vida pós-natal. Durante o desenvolvimento embrionário, mecanismos mediados pela sinalização Notch estão frequentemente associados aos processos de especificação, proliferação e diferenciação celular, estabelecimento de assimetrias e limites entre os tecidos e também à formação de compartimentos celulares (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Lewis, 1998; Radtke et al., 2005).

1.8.1 Componentes da via de sinalização Notch

A sinalização Notch é resultante da interação entre células adjacentes. Receptores e ligantes desta via de sinalização, são proteínas transmembranas cujos domínios apresentam-se evolutivamente conservados (Figura 5).

Em *Drosophila melanogaster*, apenas um receptor (dNotch) e dois ligantes (Serrate e Delta) foram caracterizados. Em mamíferos, quatro receptores (Notch1-4) e cinco ligantes (Jagged1 e 2, homólogos de Serrate; Delta1, 3 e 4, homólogos de Delta) foram identificados até o momento.

Receptores Notch são formados por dois domínios estruturais: um domínio extracelular (NED – *Notch extracellular domain*) e outro intracelular (NICD- *Notch intracellular domain*). NED é formado por um domínio de 29 -36 repetições em tandem do fator de crescimento epidérmico (EGF- *epidermal growth factor*), essencial para que haja uma eficiente interação entre receptores e ligantes. Este domínio está associado a três repetições de unidades ricas em cisteína (LIN), que parecem inibir a sinalização Notch quando o ligantes não estão presentes. NICD apresenta dois grandes domínios de interação protéica. O primeiro é formado por seis repetições em tandem de anquirina (ANK) intercaladas às unidades de sinais de localizações nucleares (NLS – *nuclear localizations signals*). Este complexo contém também um segmento de domínio RAM (R). Um segundo domínio é

constituído por uma região de transativação (TAD) (ainda não definido para os receptores Notch 3 e 4), conectado a uma sequência PEST (P) (Figura 5).

Os ligantes são formados por um domínio amino-terminal DSL (Delta, Serrate e Lag2) seguidos de repetições EGF. Em *Drosophila*, o ligante Serrate apresenta um domínio rico em cisteína (CR), bem como seus homólogos Jagged 1 e 2 em camundongos (Figura 5).

Figura 5 - Estrutura dos receptores Notch e seus ligantes

Receptores e ligantes da via de sinalização Notch são proteínas transmembranas. *Drosophila melanogaster* apresenta um receptor Notch (dNotch) e dois ligantes (Serrate e Delta). Em mamíferos quatro receptores (Notch1-4) e cinco ligantes (Jagged1 e 2, Delta 1,3 e 4) já foram caracterizados. Receptores de Notch são formados por domínios intra e extracelulares. O domínio extracelular é constituído por repetições EGF e agrupamentos ricos em cisteína (LIN). O domínio intracelular é formado por RAM (R), repetições de anquirina (ANK), duas unidades de sinais de localizações nucleares (NLS), uma região de transativação (TAD) (não definido para os receptores Notch 3 e 4) e por uma sequência PEST. Os ligantes de Notch apresentam um domínio amino-terminal DSL, repetições EGF e um domínio rico em cisteína (CR- apenas Serrate, Jagged 1 e 2). MP= membrana plasmática.

FONTE: Adaptado de Radtke et al. (2005). Com permissão.

1.8.2 A via de sinalização Notch

A ativação da sinalização Notch é induzida através da interação receptor-ligante entre células adjacentes. Tal interação resulta na clivagem do domínio extracelular do receptor Notch (NED – *Notch extracellular domain*) pela ação de uma metaloprotease (TACE- *tumour necrosis factor α converting enzyme*). O fragmento clivado sofre endocitose pela célula que expressa o ligante, induzindo uma segunda reação proteolítica, que desta vez, é restrita ao domínio intracelular do receptor Notch (NICD – *Notch intracellular domain*). Esta clivagem ocorre graças à

ação de um complexo enzimático denominado gama-secretase (formado por presenilinas, nicastrina, APH1 e PEN2) e resulta na liberação de NICD, que migra ao núcleo celular e age como um co-ativador transcricional. NICD não pode ligar-se diretamente ao DNA, mas se heterodimeriza com uma proteína ligada ao DNA, chamada CSL (ou RBPjk – *recombination signal sequence-binding protein Jk* - em camundongos). Esta interação resulta na remoção de co-repressores e recrutamento de co-ativadores (como proteínas da família Mastermind-like) e assim, via RBPjk, a expressão de genes-alvo (como genes da família Hes - Hairy/Enhancer of Split e Hey - Hairy-related transcription factor) pode ser ativada. Estas proteínas são consideradas efetoras da sinalização Notch, podendo agir, tanto na forma de homo ou heterodímeros, como repressores transcricionais de vias tecido-específicas (Figura 6) (Fortini, 2002; High e Epstein, 2007). A ativação de genes-alvo da sinalização Notch via Rbpjk é também conhecida como a via canônica da sinalização Notch.

Quando não há interação receptor-ligante, Rbpjk recruta complexos repressores suprimindo, conseqüentemente, a expressão de genes-alvo da sinalização Notch (Borggreve e Oswald, 2009).

Rbpjk é, portanto, um elemento crítico para que haja transição de um estado de repressão a um estado de ativação transcricional (Borggreve e Oswald, 2009).

animais nocaute para Pofut1, demonstrarm que este constitui um dos principais componentes da via de sinalização Notch (Shi e Stanley, 2003). Neste trabalho observou-se que o fenótipo de animais nocaute para Pofut1 foi extremamente semelhante ao fenótipo previamente descrito em animais nocaute para componentes essenciais da sinalização Notch, como Rbpjk. Com este estudo ficou claro que Pofut1 não se limita em gerar substrato para glicosiltransferases mas atua como componente de fundamental importância para a ativação da via de sinalização Notch.

É importante mencionar que as O-fucosiltransferases também participam de processos de modificação de outras proteínas que carregam a sequência consenso de sítios sujeitos à adição de fucose, como proteínas da via de ativação de receptores plasminogênio tipo-uroquinase (uPA) e da via de ativação de Nodal mediada por Cripto (Harris et al., 1993; Okajima et al., 2003).

Porém, existem evidências na literatura de que durante o desenvolvimento, a via de sinalização Notch consiste no alvo primário dos processos de O-fucosilação. Por exemplo, camundongos deficientes para a via uPA sobrevivem até a vida adulta, sem apresentar anormalidades fenotípicas. Adicionalmente, o fenótipo de animais deficientes para Cripto/Nodal não é observado em animais nocaute para Pofut1 (Shi e Stanley, 2003; Shi et al., 2005). Em contrapartida, animais nocaute para Pofut1 apresentam um fenótipo extremamente semelhante aos embriões deficientes para um componente crítico da via de sinalização Notch, o efector transcricional Rbpjk.

Estes dados enfatizam a idéia de que Pofut1 tem a via de sinalização Notch como principal alvo.

1.8.4 Sinalização Notch: mecanismos de ação

A sinalização Notch exerce seus efeitos através de diversos mecanismos. Dentre eles, destacam-se: mecanismos de inibição lateral e de indução lateral (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Radtke et al., 2005).

O mecanismo de inibição lateral explica como a sinalização Notch induz, em progenitores idênticos, destinos completamente distintos. Neste caso, a partir de um agrupamento de progenitores com quantidades equivalentes de receptor e ligante, surge uma célula que começa a se diferenciar, expressando altos níveis de ligante.

A presença do ligante nesta célula faz com que ela interaja com as células vizinhas, ativando nelas a sinalização Notch (dado que a sinalização Notch é sempre ativada na célula que expressa o receptor – Figura 6). Neste caso, a ativação da sinalização Notch nas células vizinhas, faz com que estas adotem um destino celular distinto da célula que expressa o ligante (Figura 7A) (Borggreve e Oswald, 2009).

Estudos funcionais realizados em embriões de *Xenopus* sugeriram que a aquisição do fenótipo não-ciliado em progenitores presentes na epiderme, ocorre através de um mecanismo de inibição lateral mediado pela sinalização Notch. Deblandre et al. (1999), observaram que a expressão seletiva do ligante Delta em progenitores de células ciliadas impedia que as mesmas ativassem a sinalização Notch, ao passo que a expressão do receptor Notch nas células vizinhas, promovia a diferenciação das mesmas em um tipo celular não-ciliado.

A sinalização Notch também pode agir através de um mecanismo de indução lateral. Neste caso, precursores que expressam o receptor Notch situados ao redor de células que não expressam o ligante são instruídos, pela ausência da sinalização Notch, a assumirem um determinado destino celular. Em contrapartida, quando tais precursores situam-se ao redor de células que expressam o ligante, a consequente ativação da sinalização Notch, faz com este precursor assumira um destino celular distinto (Figura 7B).

Este tipo de regulação é bem estudada nos processos de diferenciação de progenitores do ouvido interno. Hartman et al. (2010), demonstraram que a ativação da sinalização Notch em células não-sensoriais induz, em células adjacentes, a expressão do ligante Jag1. A expressão de Jag1 induz, consequentemente, a especificação de células pré-sensoriais em regiões específicas do otocisto em desenvolvimento.

A sinalização Notch também pode agir na manutenção de um estado indiferenciado (Figura 7C). Esta situação ocorre quando um determinado tipo celular (que expressa o ligante), induz a ativação da sinalização Notch na célula adjacente (neste caso correspondente a uma célula-tronco que expressa o receptor Notch). A ativação da via Notch na célula-tronco, impede que esta se diferencie, mantendo assim suas características de célula-progenitora.

Okamura e Saga (2008), examinaram o papel da sinalização Notch no sistema nervoso entérico, através da deleção do gene *Pofut1* especificamente em células da crista neural (células que contribuem para a formação do sistema

nervoso entérico). Em virtude da inibição da sinalização Notch, foi observado uma redução no número de células da crista neural, acompanhada de neurogênese prematura. Estes resultados sugeriram que a sinalização Notch exerce papel fundamental na manutenção de progenitores entéricos da crista neural (Okamura e Saga, 2008).

Figura 7 - Mecanismos de ação da via de sinalização Notch

Notch age através de diferentes mecanismos. **(A)** Inibição lateral: dentre células que expressam quantidades equivalentes de receptor e ligante, uma célula começa a se diferenciar e expressar níveis elevados de ligante (a direita). A alta expressão de ligante em sua superfície ativa a sinalização Notch nas células vizinhas fazendo que estas assumam um destino distinto da célula que expressava altos níveis de ligante. **(B)** Um precursor é instruído a adotar o destino celular A pela célula adjacente que não expressa o ligante. Quando o ligante está presente, a via Notch é ativada e um precursor é instruído a adotar um destino B. **(C)** Um dado tipo celular induz a sinalização Notch em células-tronco para manter seu estado indiferenciado.

FONTE: Adaptado de Borggreve e Oswald (2009). Com permissão.

1.8.5 O papel da sinalização Notch no tecido pulmonar

A importância da sinalização Notch no desenvolvimento do trato respiratório foi inicialmente sugerida por uma série de estudos que revelou a presença de componentes desta via de sinalização no pulmão embrionário (Kong et al., 2004; Post et al., 2000; Taichman et al., 2002; van Tuyl et al., 2005).

Experimentos baseados na perda de função dos componentes da sinalização Notch, demonstraram (*in vitro*) como estes atuam na diferenciação epitelial e vascular do pulmão em desenvolvimento. Kong et al. (2004) relataram que o tratamento de explantes pulmonares com oligonucleotídeos antisense para o receptor Notch1, resultou em um aumento no número de ramificações dos primórdios pulmonares epiteliais. Foi observado também um aumento significativo no número de células neuroendócrinas, quando tais explantes foram tratados com nucleotídeos antisense para Notch1 ou Jagged1. Adicionalmente, observaram que o tratamento com oligonucleotídeos antisense para Notch3, promoveu a formação demasiada de tecido de origem neural no mesênquima pulmonar. Estes resultados sugeriram que os componentes da sinalização Notch agem durante a morfogênese dos primórdios pulmonares, nos subsequentes processos de diferenciação celular e também na composição celular do mesênquima pulmonar (Kong et al., 2004).

O papel da sinalização Notch também foi demonstrado em abordagens mais sofisticadas, como em experimentos *in vivo*. Ito et al. (2000) relataram que camundongos nocaute para o gene Hes1 (um dos genes-alvo da sinalização Notch) apresentaram um excesso de células neuroendócrinas e uma redução de células de Clara no pulmão em desenvolvimento. Neste trabalho foi proposto que a sinalização Notch age, através de um mecanismo de inibição lateral, na diferenciação de células de Clara e de células neuroendócrinas no epitélio pulmonar. De acordo com o modelo sugerido, a expressão do ligante Delta1 em células neuroendócrinas ativa a sinalização Notch em progenitores de célula de Clara (célula vizinha), inibindo o fenótipo neuroendócrino e promovendo a diferenciação destes progenitores em células de Clara (Ito et al., 2000).

Em um estudo subsequente foi demonstrado que, em virtude da ativação constitutiva de Notch3 na região distal do pulmão de camundongos, progenitores distais não são capazes de se diferenciar (Dang et al., 2003).

É importante mencionar que os trabalhos descritos acima avaliaram o papel da sinalização Notch através de experimentos onde os componentes desta via de sinalização foram inativados ou super-expressos isoladamente. Embora informativos, os resultados obtidos não procederam de uma inativação generalizada da via de sinalização Notch e, portanto, não refletiram o papel integral desta via de sinalização no desenvolvimento pulmonar.

Assim, com o objetivo de bloquear todos os possíveis modos de ativação da via de sinalização Notch, um estudo mais recente se beneficiou do uso de um inibidor clássico desta via de sinalização: DAPT, (*N*-[*N*-(3,5-DIFLUOROPHENACETYL-L-ALANYL)]-S-PHE), um inibidor do complexo gama-secretase, cuja ação impede a clivagem de NICD e a consequente ativação da sinalização Notch em todos os níveis (Tsao et al., 2008).

Neste trabalho, Tsao et al. (2008) investigaram o papel da sinalização Notch em fases precoces do desenvolvimento pulmonar ao administrarem DAPT ao meio de cultura de explantes pulmonares durante fases que antecedem (8.0 dpc) (Figura 8A-D) e sucedem (11.5 dpc) (Figura 8E-H) o estabelecimento dos primórdios do pulmão. A administração de DAPT ao meio de cultura garantiu com que a via de sinalização Notch fosse inativada em todo tecido pulmonar (epitélio e mesênquima).

Como resultado, os autores relataram que a inativação de Notch, na primeira fase, expandiu a porção distal do pulmão (evidenciada pela expressão do marcador TTF1 que neste estágio do desenvolvimento é normalmente expresso na tireóide e nas regiões mais distais) (Figura 8A-B). Foi observado ainda que o domínio de expressão de Sox2, um marcador da região proximal do pulmão, apresentou-se extremamente reduzido (Figura 8C-D).

De acordo com estes investigadores, a inativação de Notch na segunda fase (aos 11.5 dpc, quando os primórdios pulmonares já estão formados), resultou na formação ectópica de pequenos botões pulmonares (nas regiões mais proximais), acompanhada de uma dramática redução dos domínios de expressão de Sox2 (Figura 8E-H).

Com base nestes resultados, os autores deste trabalho sugeriram que Notch é responsável em estabelecer o equilíbrio entre progenitores das regiões proximais e distais, sendo também essencial para o desenvolvimento adequado dos progenitores proximais do pulmão embrionário (Tsao et al., 2008).

Figura 8 - Inativação de Notch (in vitro) nas fases iniciais do desenvolvimento pulmonar

(A-D) Explantes do tubo intestinal primitivo cultivados por 48 horas em condições controle e tratados com DAPT (inibidor farmacológico de Notch). Hibridização *in situ* para Ttf1 em A-B, e para Sox2 em C-D (colchetes indicam o domínio de expressão de Sox2, o qual foi reduzido com o tratamento por DAPT). (E-H) Pulmões embrionários cultivados aos 11.5 dpc por 48 horas em condições controle e tratados com DAPT. Hibridização *in situ* para Ttf1 em E-F (setas em F revelam a presença ectópica de botões pulmonares em segmentos proximais), e para Sox2 em G-H (asterisco em H aponta à ausência da expressão de Sox2). STF= estômago.

FONTE: Adaptado de Tsao et al. (2008). Com permissão

1.9 Hipótese de trabalho

O papel de Notch na manutenção do equilíbrio entre progenitores proximais e distais e no desenvolvimento adequado de progenitores proximais (proposto por Tsao et al., 2008), nos conduziu a hipótese de que Notch poderia atuar também em fases mais avançadas do desenvolvimento, influenciando o equilíbrio entre tipos celulares da região proximal do pulmão (árvore brônquica).

Esta hipótese também foi suportada pelos achados de Ito et al. (2000), quando demonstraram que camundongos nocaute para Hes1 (um dos genes-alvo da sinalização Notch), apresentaram um aumento no número de células neuroendócrinas e uma redução na quantidade de células de Clara no pulmão em desenvolvimento. Este resultado sugeriu que a sinalização Notch influencia os destinos celulares de progenitores respiratórios em diferenciação.

Embora extremamente informativos, entendemos que os achados de Ito e colaboradores não refletiram o papel integral da sinalização Notch sobre o desenvolvimento pulmonar, dado que a estratégia utilizada não inativou esta via de sinalização em sua totalidade.

Contudo, questionamos se a inibição total da via de sinalização Notch revelaria aspectos importantes sobre o papel de Notch na diferenciação epitelial pulmonar.

Assim, no presente estudo, propomos investigar o papel de Notch na diferenciação do epitélio pulmonar através de dois modelos independentes de inativação da sinalização Notch em camundongos: *Pofut1^{cnul}* e *Rbpjk^{cnul}* (descritos na seção a seguir). Propomos também identificar genes-alvo desta via de sinalização através da análise do perfil de expressão gênica (microarrays) de pulmões *Pofut1^{cnul}* e *Rbpjk^{cnul}*.

1.9.1 Modelos genéticos *Pofut1^{cnul}* e *Rbpjk^{cnul}*

Para inativar a sinalização Notch, dois componentes-chave desta via de sinalização são frequentemente utilizados como alvos de deleção: os genes *Pofut1* e *Rbpjk*. Como mencionado anteriormente, *Pofut1* e *Rbpjk* são ubiquamente expressos durante a organogênese, sendo *Pofut1* essencial para uma eficiente ligação entre os receptores de Notch e seus ligantes e *Rbpjk*, o efetor transcricional da via canônica da sinalização Notch (Okamura e Saga, 2006; Radtke et al., 2005; Shi e Stanley, 2003; Tsao et al., 2008).

Por participarem da formação cardiovascular, a deleção sistêmica destes componentes resulta em letalidade embrionária durante os estágios que precedem a formação dos primórdios pulmonares (Gale et al., 2004; Shi e Stanley, 2003). Assim, a fim de viabilizar a investigação do papel de Notch nos processos de diferenciação celular, deletamos *Pofut1* ou *Rbpjk* apenas da camada epitelial do pulmão em desenvolvimento (processo conhecido com deleção condicional).

Para tanto, cruzamos camundongos portadores de alelos *flox* entre os genes *Pofut1* (*Pofut1^{F/F}*) (Shi et al., 2005) e *Rbpjk* (*Rbpjk^{F/F}*) (Han et al., 2002) com camundongos da linhagem deletora *Shh^{Cre/+}* (Harfe et al., 2004). *Shh* é expresso no tecido endodérmico (epitelial) do trato respiratório a partir do dia 9 dpc, antes mesmo da formação dos primórdios pulmonares (Harfe et al., 2004; Harris et al., 2006). Com a ativação de *Shh* e (consequentemente de *Cre*), o gene flanqueado pelos sítios *flox* é removido (no endoderma) pela ação da recombinase *Cre*.

Shh^{Cre/+} foi escolhido como linhagem deletora devido à ativação precoce de sua expressão e também por ser expresso uniformemente ao longo do endoderma do tubo intestinal primitivo, incluindo os domínios ocupados por precursores respiratórios (Harris et al., 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estabelecer o papel de Notch na diferenciação dos tipos celulares que compõem o pulmão embrionário.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as anormalidades pulmonares resultantes da deficiência de Notch no epitélio;
- Identificar o mecanismo pelo qual a sinalização Notch regula os destinos celulares no epitélio pulmonar durante o desenvolvimento;
- Identificar genes associados ao fenótipo ciliado e secretor do epitélio pulmonar.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e genotipagem

Para gerarmos o modelo genético Pofut1, cruzamos camundongos Pofut^{+/-} (Shi e Stanley, 2003) com camundongos da linhagem Shh^{Cre/+} (Harfe et al., 2004) a fim de obtermos o genótipo Pofut^{+/-};Shh^{Cre/+}.

Camundongos Pofut^{+/-};Shh^{Cre/+} foram então cruzados com camundongos da linhagem Pofut^{F/F} (Shi et al., 2005) para gerarmos animais com a deleção condicional de Pofut1 com ambos (Pofut^{F/-};Shh^{Cre/+}) ou com apenas um alelo (Pofut^{F/+};Shh^{Cre/+} e Pofut^{F/-}), ou com alelos intactos (Pofut^{F/+}).

Para o modelo Rbpjk, aplicamos a mesma estratégia, utilizando camundongos Shh^{Cre/+}, Rbpjk^{+/-} e Rbpjk^{F/F} (Han et al., 2002) (Bioresource Center, Tsukuba, Japan).

Os camundongos obtidos com os cruzamentos acima mencionados foram genotipados por PCR (*Polymerase chain reaction*), como descrito por (Han et al., 2002; Harris et al., 2006; Shi et al., 2005).

Neste trabalho, camundongos do tipo selvagem foram designados como “controle”, e mutantes foram nomeados: “Pofut1^{cnul}” e “Rbpjk^{cnul}” (*cnul*= nocaute condicional).

3.2 Cultura de explantes pulmonares

Embriões de variados genótipos foram isolados aos 11.5 dpc de fêmeas Pofut^{F/F} (cruzadas com machos Pofut^{+/-};Shh^{Cre/+}), e os pulmões dissecados foram cultivados por 48 horas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) contendo 1% de soro fetal bovino (FBS) a 37 °C, como previamente descrito por Tsao et al. (2008). Tecido embrionário foi coletado para genotipagem para permitir comparações entre pulmões controle e mutantes.

Em outro experimento, pulmões provenientes de embriões do tipo selvagem (linhagem CD1), foram isolados aos 13.5 dpc e cultivados por 4 dias em meio contendo DAPT {*N*-[*N*-(3,5-difluorophenacetyl)-*L*-alanyl]-*S*-phenylglycine *t*-butyl ester} (50µM, Sigma) ou DMSO (*Dimethyl sulfoxide*) (controle).

Explantes pulmonares cultivados foram fixados com 4% de paraformaldeído em PBS (*Phosphate buffered saline*) por 12 horas a 4 °C, e processados para

imunohistoquímica. Pelo menos 3 explantes por grupo (controle, mutante) foram analisados.

3.3 Microdissecção do mesênquima e epitélio pulmonar

Pulmões controle e mutante foram isolados aos 11.5 dpc de fêmeas Pofut^{F/F} (cruzadas com machos Pofut^{+/-}; Shh^{Cre/+}). Estes foram incubados em dispase (B&D; diluída 1:3 em PBS) por 12 minutos a 37 °C e lavados 3 vezes em PBS para microdissecção das camadas mesenquimais e epiteliais, as quais foram separadas através do uso de pinças apropriadas. O tecido dissecado foi transferido aos tubos do tipo Eppendorf, contendo RNeasy Lysis Reagent (Qiagen) e processado para os ensaios de PCR em tempo real, onde a expressão de Pofut1 e dos genes das famílias Hes e Hey foram analisadas. Tecido embrionário foi coletado para genotipagem. A contaminação mesenquimal de tecidos epiteliais foi normalizada pela expressão de um gene associado ao colágeno (Col1a2).

3.4 Hematoxilina-eosina

Primeiramente, cortes histológicos foram submetidos a 2 lavagens com xilol para remoção da parafina. Para a etapa de hidratação realizamos lavagens seriadas de etanol (100, 95 e 80%, 3 minutos cada) seguidas por uma lavagem de 5 minutos com água destilada. Para a etapa de coloração submetemos lâminas de cortes histológicos à incubação com hematoxilina por 3 minutos, as quais foram lavadas em água corrente por 5 minutos e incubadas com HCl 1% por 5 minutos. Após enxague em água corrente, as amostras foram coradas com eosina (por cerca de 45 segundos), desidratadas em banhos seriados de etanol (95, 100%), e em seguida lavadas duas vezes com xilol por 10 minutos. Após secagem, lâminas e lamínulas foram montadas com meio Permount e seladas com esmalte.

3.5 Ácido periódico de *schiff* (PAS) e coloração para *alcian blue* (AB)

Estes ensaios foram realizados através do uso de reagentes de *Periodic acid-Schiff (PAS) staining system* (Sigma). Cortes histológicos incluídos em parafina

foram desparafinados e hidratados por 2 lavagens de 10 minutos com xilol e banhos seriados de etanol/água (100, 95 e 80%, 3 minutos cada), respectivamente. Para distinção de muco e glicogênio, estes cortes foram pré-incubados com ou sem amilase por 10 minutos, como informa o protocolo oferecido pelo fabricante. Para a etapa de oxidação, as amostras foram incubadas com solução de ácido periódico por 5 minutos e lavadas por várias vezes em água destilada. Para a coloração, aplicamos o reagente de Schiff sobre os cortes histológicos, por 15 minutos, seguidos de lavagens em água corrente. As amostras foram submetidas a coloração de contraste com hematoxilina por 90 segundos, lavadas em água corrente, desidratadas e montadas com meio a base de xilol.

Para os ensaios de *Alcian blue*, as amostras foram incubadas em solução de 3% ácido acético por 3 minutos e em seguida em *alcian blue* (pH 2.5) por 40 minutos à temperatura ambiente. O material foi submetido a coloração de contraste com hematoxilina.

3.6 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA utilizamos o kit *SuperScript III first-strand synthesis system for RT-PCR* (Invitrogen). 5 µg do RNA de interesse foram adicionados a uma reação contendo: 1 µl de 50 µM oligo(dT)₂₀, 1µl de 10mM dNTP mix para 20 µl de água tratada com DEPC. Este mix foi incubado por 5 minutos a 65 °C e em seguida resfriado em gelo. O mix de síntese de cDNA foi preparado pela combinação dos seguintes reagentes: 2 µl de 10X buffer, 4 µl 25 mM MgCl₂, 0.1 M DTT, 1 µl RNaseOUT e 1 µl SuperScript III RT. 10 µl desta mistura foram adicionados à reação de RNA/primers, a qual foi incubada por 50 minutos a 50 °C. O processo de síntese foi encerrado por uma incubação final de 5 minutos a 85 °C seguida por resfriamento em gelo.

3.7 Síntese de ribossonda

Para detectar os transcritos de RNA nos experimentos de hibridização *in situ*, utilizamos sondas de RNA mensageiro anti-sense, transcritas e marcadas simultaneamente *in vitro* a partir de produtos de PCR obtidos através de primers

portadores de sequências do promotor T7 e desenhados especificamente para cada um dos genes de interesse (Tabela 1).

A transcrição e marcação (por digoxigenina - DIG-UTP) foram realizadas através do Maxiscript kit (Ambion), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Para a transcrição e marcação da ribossonda, 300 ng do produto de PCR (cDNA amplificado por primers específicos ao gene de interesse), foram adicionados a uma reação contendo 2 µl de tampão de transcrição 10X (*10x transcription buffer* Ambion), 1 µl dos nucleotídeos (10mM) ATP, CTP e GTP, 0.6 µl de UTP, 0.4 µl de UTP conjugado a digoxigenina (DIG), 2 µl de RNA polimerase e água livre de ribonuclease para um volume final de 20 µl. Esta reação foi incubada a 37 °C por 1 hora, sendo incubada novamente a 37 °C por mais 15 minutos após a adição de 1 µl de DNase 1.

A ribossonda foi purificada por um filtro de 0.45 µm contido em placas Multiscreen (Millipore, a fim de eliminarmos reagentes provenientes dos processos de marcação e transcrição. O transcrito foi ressuspensionado em água tratada com DEPC (Dietilpirocarbonato) e armazenado a -80 °C.

3.8 Hibridização *in situ*

Ensaio de hibridização *in situ* foram realizados em cortes histológicos com espessura de 10 µm, provenientes de tecidos criopreservados incluídos em OCT (*optimum cutting temperature compound*). Pelo menos 3 pulmões de cada grupo (controle e mutante) foram incluídos para análise de cada um dos genes estudados.

Lâminas contendo cortes histológicos foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos, lavadas 3 vezes com PBS por 5 minutos, acetiladas (para redução dos níveis de *background*) por 10 minutos em tampão de acetilação (10% trietanolamina em água tratada com DEPC), e então permeabilizadas com PBT (0.1% Triton X-100 em PBS) por 30 minutos. Em seguida, aplicamos cerca de 200 µl de tampão de pré-hibridização (50% dextran sulfato de sódio – American Bioanalytical, 4 ml 20X SSC – Ambion, 10 ml formamida – American Bioanalytical, 0.4 ml 50X Denhardt's – Sigma, 1 ml DNA de esperma de peixe – Invitrogen) sobre cada lâmina. Após 2 horas, seguimos para a etapa de hibridização, que foi realizada no mesmo tampão contendo 200 ng/ml de sonda, por 12 horas a 72 °C.

O material recém-hibridizado foi lavado com solução pré-aquecida de 0.2X SSC em PBS por 2 horas a 72 °C. As amostras foram levadas, subsequentemente, à temperatura ambiente até o resfriamento da solução, lavadas por uma nova solução de 0.2X SSC em PBS por 5 minutos e depois apenas com PBS por 5 minutos adicionais. O material foi então transferido para a solução de bloqueio (TTBS – Tris 2M, NaCl 5M, 10% Tween 20 em água destilada + 20 % de soro de ovelha) e incubado por 1 hora à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as lâminas foram incubadas em solução de bloqueio contendo anticorpo anti-DIG conjugado à fosfatase alcalina, na titulação de 1:2500 durante 12 horas a 4 °C.

Para a detecção do sinal, lavamos o material submetido a reação com anti-DIG com o tampão TTBS (3 lavagens de 10 minutos), e em seguida com o tampão da reação colorimétrica (1M Tris pH 9.5, 10% Tween 20, 1M MgCl₂, 5M NaCl em água destilada), por 10 minutos. Após este período, as amostras foram incubadas com BmPurple (Roche), substrato para a fosfatase alcalina, até a detecção de níveis de expressão desejados para análise. A reação colorimétrica foi encerrada através de várias lavagens com PBS, e em seguida, cada lâmina foi processada com 80% de glicerol em PBS para preservação da coloração e estrutura dos cortes histológicos. O material foi conservado em temperatura ambiente para posterior análise.

Tabela 1 - Primers para a amplificação de templates de cDNAs utilizados na síntese de ribossondas

Gene	Primers	Produto (pb)
Sccgb3a2	5'AATTAACCCTCACTAAAGGGGAGGTGACAGCGAGCAGAAGT3' 5'TAATACGACTCACTATAGGGGCACGTAGCAAAGGCTTCTCC 3'	431
Upk3a	5'AATTAACCCTCACTAAAGGGGTGGCTGGACTGTGAACCTC 3' 5'TAATACGACTCACTATAGGGTTGCCACCCCTGACTAGGTA 3'	410
Krt15	5' AATTAACCCTCACTAAAGGGTGGAGATGCAGATTGAGCAG 3' 5' TAATACGACTCACTATAGGGGGTAATGACCCCTGGATCT 3'	471
Hp	5' AATTAACCCTCACTAAAGGGTCTACGTGGGGAACCAAGCAG 3' 5' TAATACGACTCACTATAGGGCATGTCATGAATGGCAAAGG 3'	465
Gsta	5'AATTAACCCTCACTAAAGGGTCTGAAACTCGGGATGACC3' 5'TAATACGACTCACTATAGGGGGAGTTCAACCAGGGCAATA3'	429
Btl9	5'AATTAACCCTCACTAAAGGGGTCTGAACTCCTGGACAGC3' 5'TAATACGACTCACTATAGGGTGCACCTTTCTGGGGAAATC3'	535
Dnahc3	5'AATTAACCCTCACTAAAGGGGTGAGGTTCGCAGAAGCCTTA3' 5'TAATACGACTCACTATAGGGGAATAATGGGCAATGGGTCA3'	525
Muc5b	5'AATTAACCCTCACTAAAGGGGACTTGAGGAGGGTTCCAGGT3' 5'TAATACGACTCACTATAGGGACAGTGCCAGGGTTTATTGC3'	347
Mt2	5'AATTAACCCTCACTAAAGGGCCATATCCCTTGAGCCAGAA3' 5'TAATACGACTCACTATAGGGAGCAGCAGCTTTTCTTGACAG3'	342
Porcn	5'AATTAACCCTCACTAAAGGGGCCCTGTTTGATGTGCGATGTG3' 5'TAATACGACTCACTATAGGGCTCCTGTCTGCTTTCCCAAG3'	328
Efcab1	5'AATTAACCCTCACTAAAGGGGTGAGGAGGACCCTGATGAAG3' 5'TAATACGACTCACTATAGGGGCCAGCATATCTGAGGGTGT3'	361
Reg3g	5'AATTAACCCTCACTAAAGGGTCAGGTGCAAGGTGAAGTTG3' 5'TAATACGACTCACTATAGGGGGCCTTGAATTTGCAGACAT3'	497
Phf1	5'AATTAACCCTCACTAAAGGGCTATTGTGAGCGCCAGTGAA3' 5'TAATACGACTCACTATAGGGTACGGCACTTTTCTCCATCC3'	461
Nov	5'AATTAACCCTCACTAAAGGGGACCATCCAGGTGGAGTTTCA3' 5'TAATACGACTCACTATAGGGCAGCACAGGAAAGGAAGTCA3'	417
Myb	5'AATTAACCCTCACTAAAGGGGAGAGGTGGCACAACCATTT3' 5'TAATACGACTCACTATAGGGGGGAACGTGACTGGAGATGT3'	427
Gabrp	5'AATTAACCCTCACTAAAGGGAGATGCTGGGGAACATTTTG3' 5'TAATACGACTCACTATAGGGAGGGAAAGCTGAGGGTTCAT3'	494
Cbr2	5'AATTAACCCTCACTAAAGGGTATCGGCCCTGTGGACTTAC3' 5'TAATACGACTCACTATAGGG CAACCTCTGCGAAGCTTCCTC3'	459
Chad	5'AATTAACCCTCACTAAAGGGGACCACTGAAACACGTCCA3' 5'TAATACGACTCACTATAGGGGGAGCTGGGATGGTGATAGA3'	499
Lrrc34	5'AATTAACCCTCACTAAAGGGCATTGGCCACATGTTGAAAG3' 5'TAATACGACTCACTATAGGGTGAAGTGGGAAAGTGAACAA3'	392
Hes1	5'AATTAACCCTCACTAAAGGGTTCAGCGAGTGCATGAACGA3' 5'TAATACGACTCACTATAGGGGTCCGTCAGAAGAGAGAGGT3'	568
Jag1	5'AATTAACCCTCACTAAAGGCTTTCTGCTTTAGACTTGAA3' 5'TAATACGACTCACTATAGGCAGTAATAGAACAACACCAA3'	468
Notch1	5'AATTAACCCTCACTAAAGGGGAACCTCGTTTCGAGACCTCAA3' 5'TAATACGACTCACTATAGGGGAGCATCCTGAAGCACTGGAA3'	540
Delta1	5'AATTAACCCTCACTAAAGGGGAACCTCGTTTCGAGACCTCAA3' 5'TAATACGACTCACTATAGGGGTGCGTGCTTCTATATGAA3'	538

FONTE: Vasconcelos, 2011.

3.9 Imunohistoquímica

Estes ensaios foram realizados em cortes histológicos incluídos em parafina com espessura de 5 µm, provenientes de pulmões controle e mutantes. Para estes experimentos, utilizamos o kit ABC ou M.O.M. (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

As amostras foram, primeiramente, lavadas com xilol (para remoção da parafina), hidratadas através de banhos seriados de etanol, por 5 minutos cada, e lavadas por 5 minutos com água destilada. Para inativação da fosfatase alcalina endógena, as amostras foram lavadas em solução de 3% de peróxido de hidrogênio em PBS por 5 minutos. A solução de peróxido de hidrogênio foi substituída por PBS através de uma lavagem de 5 minutos, que foi seguida por uma incubação de 20 minutos com a solução de bloqueio (preparada com o soro pelo qual o anticorpo secundário foi produzido).

A incubação com o anticorpo primário foi realizada a 4 °C por 12 horas, seguida de 3 lavagens de 5 minutos com PBS e da incubação com o anticorpo secundário (biotinilado) em temperatura ambiente, por 30 minutos. Para a detecção do sinal, DAB (*diaminobenzidinetetrahydrochloride*) foi utilizado como cromógeno. A reação colorimétrica foi interrompida por lavagens em PBS e as amostras foram fixadas em 4% paraformaldeído por 15 minutos à temperatura ambiente. Cortes histológicos foram submetidos a coloração de contraste com verde de metil por 2 minutos, desidratados por banhos seriados de etanol, e montados com meio apropriado (*mounting media* -Shandon).

Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-Scgb3a2 (concedido pelo Dr. S. Kimura, NIH), anti-Cldn10 (Zymed #415100), anti-CC10 (concedido pelo Dr. Singh e Dr. Katyal, Universidade de Pittsburgh), anti-Sox2 (Chemicon #AB5603), anti-Foxj1 (concedido pelo Dr. Brody, Universidade de Washington), anti- β -tubulina (Biogenex #MU178-UC), anti-p63 (Santa Cruz #4E4), anti-Pgp9.5 (Dako #25116), anti-Cgrp (Sigma #C8198), anti-Titf1 (Dako #M3575) e anti-T1alfa (mab 8.1.1, Developmental Studies Hybridoma Bank - Universidade de Iowa). A análise de proliferação celular foi realizada através do anticorpo anti-Ki67 (B&D #550609). Ensaio para TUNEL foram realizados através do kit de detecção de apoptose (*Apoptosis detection kit*, Chemicon #S7107). Experimentos de imunofluorescência foram realizados através do uso de anticorpos secundários conjugados aos fluoróforos Alexa Fluor 488 ou 598 (Molecular Probes), e analisados por microscopia confocal (Zeiss confocal laser-scanning microscope - LSM510 META). As conclusões obtidas com estes experimentos foram baseadas na análise de pelo menos 3 animais por grupo (controle, mutante).

3.10 Morfometria

A porcentagem de células imuno-coradas para Foxj1, Ki67, Sox2 e Scgb3a2 foi determinada através da contagem de células em cortes de pulmões controle e mutante, na magnificação de 40X. Para cada marcador, 10 campos foram analisados em 3 a 5 animais tanto no grupo controle como para o mutante. Aos 14.5 dpc, apenas segmentos mais proximais (como brônquios primários) foram analisados, uma vez que a diferenciação é restrita a esta área durante este período do desenvolvimento. Aos 18.5 dpc, brônquios primários, secundários e bronquíolos terminais foram analisados. Os dados foram representados pelas médias. Análise estatística foi realizada através do teste-T de Student; onde diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$. Para a análise de células neuroendócrinas, contamos células Pgp9.5-positivas em 40 campos aleatórios de secções pulmonares (18.5 dpc) em magnificação de 40X em controle e Pofut1^{cnul} (3 animais por grupo). O número total de células marcadas em cada grupo foi plotado em um gráfico de barras.

3.11 PCR em tempo real

RNA total de pulmões (controle e mutante) foi isolado através do kit Rneasy Mini Kit (Qiagen), e 1 µg de RNA tratado com DNase foi reversamente-transcrito com reagentes *Superscript III* (Invitrogen).

As reações (20 µl) foram preparadas em triplicata (por gene e por condição experimental) através do uso de *TaqMan PCR universal master mix* (Applied Biosystems). Para cada reação utilizamos 2 µl de cDNA, 1 µl de Taqman primers, 10 µl de tampão (2X Taqman buffer) e 7 µl de água tratada com DEPC. Primers Hes1, Hes5, Hey1, Hey2, Pofut1, Col1a2 e β-actina foram obtidos de Assays-on-demand (Applied Biosystems).

A reação descrita acima foi aplicada em placas de 96 wells (Applied Biosystems), incluindo controle negativo e controle positivo (β-actina, usado para a posterior normalização dos dados). As placas foram lidas no equipamento StepOne machine (Applied Biosystems). A quantificação relativa da expressão gênica foi calculada pelo método C_T comparativo (ΔΔC_T).

3.12 Microarray

3.12.1 Sistema *in vivo*

Pulmões controle e mutantes (controle X *Pofut1^{cnul}* ; controle X *Rbpjk^{cnul}*) foram dissecados aos 18.5 dpc e em seguida congelados em nitrogênio líquido. Após genotipagem, RNA total foi isolado através do *RNeasy mini kit* (Qiagen) e reversamente transcrito através dos reagentes Superscript III (Invitrogen).

3.12.2 Sistema *in vitro*

RNA total de explantes pulmonares isolados aos 12 dpc e cultivados por 4 dias sob condição controle e de tratamento com DAPT (inibidor farmacológico da sinalização Notch), foi extraído através do *RNeasy mini kit* (Qiagen) e reversamente transcrito através dos reagentes Superscript III (Invitrogen).

3.12.3 Microarray- hibridização e análise dos dados

A hibridização dos chips de microarray e análise dos dados foram realizados pelo Affymetrix Core da Boston University Medical Campus. RNAs de pulmões controle X *Pofut1^{cnul}* e controle X *Rbpjk^{cnul}*, foram hibridizados em triplicata ao chip *Affymetrix mouse genome 430 2.0 array chips*. RNAs de pulmões controle e tratados com DAPT foram hibridizados ao chip *Affymetrix mouse genome exon array chips* 1.0 ST (também em triplicata).

Todos os dados obtidos pelo scanner da Affymetrix passaram por testes de controle de qualidade antes da normalização através do software *Affymetrix expression console*. Os dados normalizados passaram por análises estatísticas através da plataforma Limma R package com o objetivo de determinar genes diferencialmente expressos entre controle X *Pofut1^{cnul}* ; controle X *Rbpjk^{cnul}* e controle X DAPT utilizando o método de valor-*p* ajustado *false discovery rate* (FDR) <0.05. Genes com valor *p*-ajustado superior a 0.05 foram eliminados de nossa análise.

Os ensaios de microarray foram realizados em colaboração com o Dr. Yuriy Alekseyev do Affymetrix Core da Universidade de Boston, e a análise estatística dos dados obtidos foi realizada em colaboração com o Dr. Steven Shen do departamento de Biomedicina computacional da Universidade de Boston.

Todos os arquivos (CEL files) provenientes da análise descrita acima estarão disponíveis para download no Gene Expression Omnibus (GE) após publicação de nossos resultados.

Figura 9– Microarrays

Estratégia experimental desenhada para os ensaios de microarrays.
FONTE: Vasconcelos, 2011.

4 RESULTADOS

4.1 Deleção condicional de Pofut1 perturba a sinalização Notch resultando em morte neonatal e defeitos pulmonares

Como mencionado anteriormente, a deleção sistêmica dos componentes da sinalização notch resulta em letalidade embrionária precoce (Shi et al., 2005). Assim, com o intuito de viabilizar a investigação do papel de Notch no desenvolvimento pulmonar, inativamos esta via de sinalização, especificamente, no tecido epitelial do pulmão embrionário.

A fim de verificar a eficiência da deleção seletiva de Pofut1 no epitélio pulmonar, comparamos os níveis de expressão deste gene entre as camadas epiteliais e mesenquimais do pulmão embrionário aos 11.5 dpc (quando ainda é possível separar essas camadas por dissecação manual). Ensaios de PCR em tempo real demonstraram uma redução específica nos níveis de expressão de Pofut1 no epitélio de Pofut1^{cnul} (Figura 10A). Níveis de expressão de Hes1 foram semelhantes entre animais controle e mutantes tanto no tecido epitelial como no mesenquimal (Figura 10A).

Através da mesma abordagem analisamos também os níveis de expressão de Pofut1 e genes-alvo (como Hes1, Hes5, Hey1 e Hey2) em pulmões aos 14.5 dpc. Para esta análise, utilizamos pulmões inteiros devido à impossibilidade de separar as camadas epitelial da mesenquimal neste estágio do desenvolvimento. Observamos que os níveis de expressão gênica nos pulmões de Pofut1^{cnul} foram substancialmente reduzidos quando comparados aos seus respectivos controles (Figura 10B). A expressão residual observada nestes mutantes deve-se, provavelmente, aos transcritos procedentes do mesênquima (dado que a sinalização de Notch é bastante ativa no mesênquima pulmonar).

A inativação da sinalização Notch no epitélio de Pofut1^{cnul} foi também demonstrada através de ensaios de hibridização *in situ* para o gene Hes1. Note que Hes1 encontra-se, praticamente, ausente no epitélio de Pofut1^{cnul} em relação ao controle, tanto na região dos brônquios (Figura 10C-D) como nos bronquíolos terminais (Figura 10E-F).

Com esta série de experimentos, concluímos que a sinalização Notch foi eficientemente inativada no epitélio pulmonar de Pofut1^{cnul}.

Figura 10 - Deleção condicional de Pofut1 e expressão de genes-alvo da via de sinalização Notch no pulmão de camundongos

(A) PCR em tempo real do epitélio (Epi) e mesênquima (Mes) pulmonar isolados aos 11.5 dpc revela uma redução dramática dos níveis de expressão de *Pofut1* seletivamente no epitélio de *Pofut1*^{null} em relação ao controle, entretanto, a expressão dos genes-alvo de Notch, como *Hes1*, apresenta-se inalterada tanto no epitélio como no mesênquima. (B-F) A inativação da sinalização Notch foi sugerida pela redução nos níveis de expressão de *Pofut1* e de genes-alvo da sinalização Notch (*Hes1*, *Hes5*, *Hey1* e *Hey2*) em homogenizados de pulmões inteiros de *Pofut1*^{null} aos 14.5 dpc (B, PCR em tempo real), e pela redução substancial da expressão de *Hes1* no epitélio de *Pofut1*^{null} aos 18.5 dpc (C-F, hibridização *in situ*). (C,D) Brônquios primários, (E,F) Bronquíolos terminais. FONTE: Vasconcelos, 2011.

4.2 Análise do desenvolvimento pulmonar pós-natal de camundongos *Pofut1^{cnul}*

Camundongos *Pofut1^{cnul}* recém-nascidos apresentaram-se fisicamente normais, embora ligeiramente menores quando comparados a seus controles. Dos 17 recém-nascidos analisados, apenas 1 sobreviveu até a idade adulta, sendo que a maioria não foi capaz de completar a primeira semana de vida pós-natal. A diferença no tamanho entre mutante e controle está apresentada na Figura 11A.

Para investigarmos os efeitos da ausência da sinalização Notch na morfologia do epitélio pulmonar adulto, realizamos ensaios colorimétricos para hematoxilina-eosina (H.E.). Observamos que o tecido pulmonar de *Pofut1^{cnul}* durante a vida pós-natal caracterizou-se por uma dramática atenuação do epitélio, o qual era constituído quase que exclusivamente por células planas, completamente distintas das presentes no epitélio do animal controle (células ovais tipicamente células de Clara no pulmão adulto). Adicionalmente, detectamos células do sistema mononuclear macrófágico invadindo o epitélio de *Pofut1^{cnul}* (Figura 11B-C, seta azul).

Ensaio de H.E. realizados em pulmões de embriões e recém-nascidos revelaram que tais alterações são restritas à vida adulta. Observe que aos 18.5 dpc pulmões controle e mutante apresentam um epitélio formado por células cuboidais, tipicamente presentes nesta fase do desenvolvimento (Figura 11D-E).

Estes resultados indicam que as alterações morfológicas observadas no epitélio de *Pofut1^{cnul}* ocorrem dentro das primeiras semanas de vida após o nascimento. Concluimos, portanto, que a inibição da sinalização Notch mediada por Shh Cre, resulta em anormalidades (no pulmão e possivelmente em outros tecidos), incompatíveis com a vida adulta.

Figura 11- Anormalidades pós-natais de *Pofut1^{cnul}*

(A) Mutantes não se desenvolvem e ao 21° dia de vida pós-natal, apresentam tamanho extremamente reduzido quando comparados com camundongos controle da mesma ninhada. (B-E) Histologia pulmonar (coloração para hematoxilina e eosina) ao 21° dia de vida pós-natal, onde o epitélio do pulmão controle é revestido por células cuboidais (B, seta vermelha). Em contraste, pulmões de *Pofut1^{cnul}* apresentam um epitélio metaplásico escamoso (C, seta vermelha), com fragmentos celulares dispersos e macrófagos isolados (seta azul). Aos 18.5 dpc, observa-se um epitélio cuboidal tanto no controle como no mutante (E). Áreas delimitadas pela linha tracejada são apresentadas em alta magnificação nos painéis à direita.

FONTE: Vasconcelos, 2011.

4.3 Deleção condicional de *Pofut* não perturba a formação da região distal do pulmão embrionário

A inibição da via de sinalização Notch *in vitro* resulta em alterações na padronização próximo-distal do pulmão em desenvolvimento (Kong et al., 2004; Tsao et al., 2008). Para investigar se a deleção seletiva de *Pofut1* no epitélio pulmonar resultava em um fenótipo semelhante, cultivamos pulmões controle e *Pofut1^{cnul}* aos 11.5 dpc por 24 e 48 horas e não encontramos defeito algum nas estruturas em desenvolvimento (Figura 12A-F). Este resultado não nos surpreendeu, dado que em nosso sistema a deleção de *Pofut1* ocorre mais tardiamente em relação aos experimentos *in vitro* acima mencionados.

Adicionalmente, observamos que a diferenciação distal (incluindo a formação de sacos alveolares e de pneumócitos tipo I e II) não foi afetada pela deleção de *Pofut1*. A análise do padrão de expressão de marcadores típicos da região distal (*Ttf1*) (Figura 12G-J), específicos para pneumócitos tipo I e II (*T1α* e *Sftpc*,

respectivamente) e de imagens de alta resolução de secções histológicas de tecidos incluídos em resina plástica (Figura 12K-N e O-P), demonstraram que estas estruturas se desenvolveram normalmente não obstante a ausência da sinalização Notch.

Estas observações estão em concordância com dados previamente publicados, onde foi demonstrado que a sinalização Notch não é necessária para a indução do programa de diferenciação de progenitores pulmonares distais (Tsao et al., 2008).

Figura 12 - Formação da região distal do pulmão de *Pofut1^{cnul}*

(A-F) Explantes pulmonares provenientes de embriões controle e mutante, isolados aos 11.5 dpc (0h) e cultivados por 48 horas, apresentam um padrão semelhante de ramificação dos tubos pulmonares. (G-J) Imunohistoquímica para Ttf1 aos 14.5 e 18.5 dpc, indica que a marcação do epitélio distal dos sáculos em desenvolvimento é praticamente idêntica entre controle e mutante. Imunohistoquímica para T1alpha (T1α) (K,L), um marcador de pneumócitos tipo I, e para Sftpc (O,P), um marcador de pneumócitos tipo II, revela um padrão de marcação muito semelhante entre pulmões controle e mutantes. (M,N) Secções histológicas de tecidos incluídos em resina plástica evidenciam pneumócitos tipo I e tipo II (*insets* em O,P).
 FONTE: Vasconcelos, 2011.

4.4 A deleção condicional de *Pofut1* perturba a formação de células de Clara

Para investigar o papel de Notch na diferenciação da árvore brônquica (porção proximal, porção condutora do pulmão), examinamos o padrão de expressão de marcadores dos diferentes tipos celulares que compõem esta região.

Células secretoras, como as células Clara, podem ser identificadas aos 16.5 dpc pela expressão do produto que secretam, denominado CC10 ou Scgb1a1 (Reynolds et al., 2002). Através de ensaios de imunohistoquímica observamos, em pulmões controle no primeiro dia de vida pós-natal e aos 18.5 dpc, um padrão típico de expressão de CC10 em células secretoras ao longo do tecido pulmonar (Figura 13A,C). Em contraste, não detectamos sinal algum para CC10 em pulmões

mutantes, a despeito da integridade do epitélio pulmonar (Figura 13B,D). Este achado foi confirmado pela análise de outros marcadores de células de Clara, como a Claudina 10 (Figura 13E-F) e a Secretoglobina 3A2 (Scgb3a2, também conhecida como UGRP1) (Figura 13G-H) (Kurotani et al., 2008; Reynolds et al., 2002; Zemke et al., 2009). Através de ensaios de imunohistoquímica, observamos a presença de ambos marcadores nos pulmões controle, entretanto, assim como para a expressão de CC10, ambos epítomos encontraram-se ausentes nos pulmões de Pofut1^{cnul}.

A ausência de células de Clara nos pulmões de Pofut1^{cnul} nos levou a investigar a possibilidade de que estas células chegam a ser especificadas porém, necessitam da sinalização Notch para sobreviver. Para tanto, realizamos ensaios para TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) a fim de verificarmos níveis de apoptose no epitélio pulmonar destes mutantes. A comparação do padrão de coloração para TUNEL aos 14.5 dpc (Figura 14A-B) e aos 18.5 dpc (Figura 14C-D), não revelou nenhuma diferença entre controle e mutantes indicando, portanto, que os processos de morte celular não são responsáveis pela ausência de células de Clara em Pofut1^{cnul}. Estes dados sugeriram que a deleção de Pofut1 no epitélio pulmonar prejudicou, dramaticamente, a capacidade de progenitores proximais (progenitores dos tipos epiteliais da árvore brônquica) em se diferenciarem em células de Clara.

Assim, exploramos a possibilidade de que a inativação de Notch no tecido pulmonar teria alterado o programa de diferenciação de progenitores secretores, fazendo com que progenitores de células de Clara se diferenciassem em células caliciformes (células secretoras produtoras de muco). Neste caso, esperaríamos encontrar um aumento no número de células caliciformes no pulmão de nossos mutantes.

Em condições normais, células caliciformes não se encontram no pulmão embrionário de camundongos porém, são observadas em recém-nascidos e durante a vida pós-natal, predominantemente em processos inflamatórios (sendo extremamente raras em condições normais) (Evans et al., 2004; Rogers, 2003).

Ensaio colorimétricos para identificação de células caliciformes (Periodic Acid Schiff – PAS – ou Alcian blue) revelaram que, de fato, tais células encontravam-se ausentes no epitélio pulmonar de animais controle e Pofut1^{cnul} aos 14.5 e 18.5 dpc (dados não apresentados). Entretanto, quando analisamos o tecido traqueal (pelos mesmos ensaios colorimétricos) de camundongos sacrificados ao nascimento, observamos células positivas para PAS e alcian blue, raramente distribuídas, tanto no epitélio do pulmão controle como no mutante (Figura 15). Este

resultado indicou que precursores de células de Clara não foram diferenciados em células caliciformes mediante a inativação epitelial de Notch.

Em resumo, constatamos que a deleção de Pofut1 no epitélio pulmonar, prejudicou a diferenciação de progenitores respiratórios em células de Clara. Concluimos, portanto, que a via de sinalização Notch desempenha papel importante no estabelecimento deste tipo celular no epitélio pulmonar em desenvolvimento.

Figura 13 - A inativação epitelial de Notch perturba a formação de células de Clara

(A-D) Imunohistoquímica para CC10 ao nascimento (P0) (A, B) e aos 18.5 dpc (C, D) revela a expressão típica deste marcador na região citoplasmática (seta vermelha) de pulmões controle (A,C), mas não detecta sinal algum para CC10 no epitélio de *Pofut1*^{null} (B,D). (E-H) Cldn10 (E,F) e Scgb3a2 (G,H) foram utilizados como marcadores adicionais da linhagem secretora, também ausentes em *Pofut1*^{null} aos 18.5 dpc. Setas brancas apontam para células negativas.

FONTE: Vasconcelos, 2011.

Figura 14 - TUNEL - processos de morte celular não são responsáveis pela ausência de células de Clara em mutantes

Marcação para TUNEL em pulmões controle e *Pofut1^{null}* aos 14.5 dpc (A,B) e aos 18.5 dpc (C,D) não revelou diferenças entre os grupos analisados. Aos 14.5 dpc a marcação para TUNEL é, predominantemente, epitelial (setas em A e B) e aos 18.5 dpc, mesenquimal (setas em C e D).
 FONTE: Vasconcelos, 2011.

Figura 15 - Efeito da inativação de Notch em outras linhagens respiratórias

(A-D) Cortes histológicos de traquéia de pulmões controle e *Pofut1^{null}* ao nascimento (P1), com marcação para PAS (A,B) e Alcian blue (AB) (C,D) em ambos os grupos, sugerindo que o destino caliciforme não foi alterado em nossos mutantes.

FONTE: Vasconcelos, 2011.

4.5 A inativação condicional de *Rbpjk* resulta nas mesmas anormalidades de *Pofut1^{null}*

A ausência de células de Clara observada em *Pofut1^{null}* foi um fenótipo extremamente marcante. Para confirmarmos que tal fenótipo refletiu, de fato, a inativação da sinalização Notch, investigamos se células de Clara são formadas em um modelo genético onde a inativação epitelial de Notch ocorre através da supressão de *Rbpjk* (efetor transcricional da via canônica da sinalização Notch) (Han et al., 2002) (1º parágrafo de 1.8.2).

Ensaio de imunohistoquímica para CC10 e Scgb3a2 (marcadores de células de Clara) aos 18.5 dpc revelaram que ambos epítomos encontravam-se ausentes no epitélio de *Rbpjk^{null}* em relação aos seus respectivos controle (Figura 16A-D).

A semelhança entre os fenótipos de *Pofut1^{null}* e *Rbpjk^{null}* nos permitiu concluir que a sinalização Notch é essencial para a formação de células de Clara no epitélio pulmonar em desenvolvimento.

Figura 16 - A inativação epitelial de Notch, via *Rbpjk*, também perturba a formação de células de Clara.

(A-D) Pulmões de *Rbpjk^{null}* também apresentaram os mesmos defeitos observados em *Pofut1^{null}*, dado a ausência de CC10 e Scgb3a2 no epitélio de *Rbpjk^{null}* aos 18.5 dpc (B,D), em relação aos pulmões controle (A,C). Setas brancas indicam células negativas.

FONTE: Vasconcelos, 2011.

4.6 As vias aéreas de *Pofut1^{null}* e *Rbpjk^{null}* são super-populadas por células ciliadas

Células ciliadas são detectadas, pela primeira vez, na traquéia e nos brônquios primários aos 16 dpc, através de critérios morfológicos ou pela expressão do marcador β -tubulina (Rawlins et al., 2007; Toskala et al., 2005). A diferenciação de células ciliadas segue uma orientação próximo-distal durante o desenvolvimento pulmonar, sendo que aos 18.5 dpc apresentam-se intercaladas por tipos celulares não-ciliados, da região traqueal aos bronquíolos terminais (Toskala et al., 2005).

Experimentos de imunohistoquímica para β -tubulina aos 18.5 dpc, confirmaram este padrão em pulmões controle (Figura 17A,C). Em contraste, observamos que as vias aéreas de *Pofut1^{null}* foram formadas, quase que exclusivamente, por células positivas para β -tubulina (Figura 17B,D). A identidade destas células foi confirmada através de imunohistoquímica para Foxj1, um fator de transcrição crucial para a aquisição do fenótipo ciliado (Figura 17E-F) (Brody et al., 2000). O excesso de células ciliadas também foi observado em *Rbpjk^{null}* (Figura 17G-H).

Com base nestes resultados, investigamos se a diferença regional no número de células ciliadas (normalmente encontrada nos diferentes segmentos das vias aéreas), poderia ser observada em nossos mutantes. Através de análise quantitativa (Figura 17I) mostramos que no controle (aos 18.5 dpc), 40%, 18% e 17% das células epiteliais apresentaram-se positivas para Foxj1 nos brônquios primários,

secundários e nos bronquíolos terminais, respectivamente (n=3). Em *Pofut1^{cnul}*, entretanto, cerca de 80% das células epiteliais apresentaram-se positivas para Foxj1, em todos os segmentos analisados (n=3).

Estes resultados indicaram que a via de sinalização Notch desempenha um papel importante no mecanismo que restringe o número de células ciliadas nos diferentes segmentos das vias aéreas em desenvolvimento.

Figura 17- A inativação epitelial de Notch aumenta dramaticamente o número de células ciliadas no epitélio pulmonar

(A-H) Imunohistoquímica para β -tubulina (A-D) e Foxj1 (E-H) revela que células positivas para estes marcadores encontram-se com maior frequência aos 18.5 dpc em pulmões de *Pofut1*^{null} (A-F) e de *Rbpjk*^{null} (G-H) em relação aos seus controles. (I) Quantificação de células Foxj1-positivas nos brônquios primários, secundários e bronquíolos terminais de pulmões controle e de *Pofut1*^{null} aos 18.5 dpc, mostra que 80-85% das células epiteliais são Foxj1-positivas nos mutantes. *, $p < 0.05$. FONTE: Vasconcelos, 2011.

4.7 As anormalidades na diferenciação epitelial de *Pofut1^{cnull}* e *Rbpjk^{cnull}* foram reproduzidas em um modelo farmacológico de inibição da via de sinalização Notch

Para obter evidência adicional de que o padrão de diferenciação epitelial anormal observado em *Pofut1^{cnull}* e *Rbpjk^{cnull}* está relacionado com a perda de função de Notch, utilizamos um inibidor clássico do complexo gama-secretase (DAPT) para inativar Notch em um sistema de cultura de explantes pulmonares.

Para tanto, cultivamos pulmões do tipo selvagem aos 13 dpc sob condições controle e de tratamento com DAPT (50µM), por 4 dias (período necessário para que ocorra diferenciação celular *in vitro*) (Tsao et al., 2008; Weinmaster e Kopan, 2006).

A análise da expressão de marcadores de diferenciação epitelial revelou que o epitélio de explantes pulmonares tratados com DAPT foi formado, predominantemente, por células ciliadas. Observe que neste grupo, a marcação para *Foxj1* está presente em todas as células epiteliais, em contraste ao grupo controle, no qual células positivas e negativas se intercalam (compare Figura 18A e B, com 18E e F). O excesso de células ciliadas em explantes tratados com DAPT foi demonstrado também pela marcação para β -tubulina, um marcador de estrutura ciliar (Figura 18C,G).

Em contraste, explantes tratados com DAPT se mostraram negativos para *Scgb3a2* (um marcador de células de Clara) (Figura 18D,H), sugerindo que a inibição *in vitro* de Notch também perturba a formação de células de Clara.

Assim, evidências provenientes de modelos *in vitro* e *in vivo* suportaram a idéia de que a sinalização Notch é essencial aos processos de diferenciação do epitélio pulmonar.

Figura 18 - Inibição farmacológica de Notch reproduz o padrão anormal de diferenciação observado nos mutantes

Pulmões do tipo selvagem aos 13.5 dpc cultivados por 4 dias em condição (A-D) controle e (E-H) em meio de cultura contendo DAPT. (A,B) Imunohistoquímica para Foxj1 mostra o padrão de distribuição de células positivas na região proximal do epitélio de pulmões controle (seta vermelha), alternado com células negativas (seta branca). (C,D) A expressão de β -tubulina (C) e Scgb3a2 (D) reflete uma distribuição equilibrada de células ciliadas e secretoras no grupo controle. (E-H) Em pulmões tratados com DAPT, praticamente todas as células presentes na região distal do pulmão são marcadas pela expressão de Foxj1 (E,F) e de β -tubulina (G), mas não para Scgb3a2 (H).

FONTE: Vasconcelos, 2011.

4.8 Efeito da inativação da via de sinalização Notch em outras linhagens respiratórias

Existem evidências na literatura de que a diferenciação de células neuroendócrinas do epitélio pulmonar (NE) está sob o controle de Notch. Ito et al. (2000), demonstraram que camundongos deficientes em Hes1 (um dos genes-alvo da sinalização Notch), apresentaram um excesso de células NE no pulmão.

Adicionalmente, a ativação constitutiva do receptor Notch1 sob o controle do promotor da calcitonina (*Cgrp*, *Calca*), resultou em uma redução no número de células NE (Shan et al., 2007).

Estes dados nos levaram a investigar se a diferenciação de células NE foi afetada em nossos mutantes. Células NE podem ser identificadas aos 16 dpc no epitélio pulmonar através da expressão de marcadores como *Cgrp* e *Pgp9.5* (1º parágrafo de 1.6.3). Através de ensaios de imunohistoquímica para *Pgp9.5* aos 18.5 dpc, detectamos células NE tanto no controle como em *Pofut1^{cnul}*. A análise

quantitativa desta marcação revelou a presença de um número maior de células NE no mutante quando comparado ao controle (Figura 19A,B). O aumento relativo de células NE em *Pofut1^{null}* está de acordo com a redução nos níveis de expressão de *Hes1* aos 18.5 dpc (Figura 10C-F), e com o fenótipo de camundongos deficientes para este gene (Ito et al., 2000).

Também avaliamos o impacto da inativação da sinalização Notch sobre as células basais. Experimentos de imunohistoquímica para p63 (um marcador de células basais do epitélio pulmonar) revelaram que o padrão de distribuição e a abundância destas células em *Rbpjk^{null}* são comparáveis ao observado no controle (Figura 20).

Estes resultados e os descritos nas seções anteriores, nos levam a concluir que a sinalização Notch é fundamental para que haja uma distribuição adequada de 3 tipos celulares do pulmão: células de Clara, ciliadas e NE.

Figura 19 - Efeito da inativação de Notch em outras linhagens respiratórias

(A,B) O número elevado de células NE no epitélio de *Pofut1^{null}*, é mostrado pela imunohistoquímica para Pgp9.5 (A, setas). (B) O número total de células Pgp9.5-positivas em 40 campos aleatórios de cortes de pulmões controle e de *Pofut1^{null}* (18.5 dpc), quantificados na magnificação de 40X ($n=3$ para cada grupo).

FONTE: Vasconcelos, 2011.

Figura 20 - Efeito da inativação de Notch em outras linhagens respiratórias

(A,B) Imunohistoquímica para P63 (marcador de células basais) em pulmão controle (A) e *Rbpjk^{cnull}* (B) aos 18.5 dpc. Setas indicam células marcadas para P63.
 FONTE: Vasconcelos, 2011.

4.9 O padrão anormal de diferenciação epitelial observado em *Pofut1^{cnull}* e *Rbpjk^{cnull}* é acompanhado por uma redução substancial nos níveis de proliferação celular

Durante a organogênese Notch pode regular o equilíbrio entre progenitores e progênes (Okamura e Saga, 2008; Radke e Raj, 2003). Para determinar se a inativação condicional de Notch influenciou os níveis de proliferação de determinado tipo celular, realizamos ensaios de imunohistoquímica para o marcador de proliferação celular Ki67.

Células positivas para Ki67 no pulmão controle aos 18.5 dpc representaram cerca de 25-30% de células epiteliais nos diferentes segmentos analisados (Figura 21A-E). Observamos que a marcação para Ki67 apresentou-se, frequentemente, associada às células não-ciliadas (Figura 21A,C), como previamente descrito (McDowell et al., 1985; Otani et al., 1986; Rawlins et al., 2007). Em contraste, a marcação para Ki67 foi significativamente reduzida no epitélio de *Pofut1^{cnull}* aos 18.5 dpc em relação ao controle (Figura 21 A-D), representando cerca de 15%, 10% e 5% das células epiteliais nos brônquios primários, secundários e nos bronquíolos terminais, respectivamente ($p < 0.05$) (Figura 21E).

A mesma análise foi realizada em *Rbpjk^{cnull}*, onde também foi observada uma redução na porcentagem relativa de células marcadas por Ki67 (Figura 21F-H). É provável que esta redução seja consequência do excesso de células ciliadas presentes nos mutantes, dado que este tipo celular é incapaz de se dividir (Rawlins et al., 2007).

Não foi possível determinar precisamente quais tipos celulares foram marcados por Ki67 nos mutantes *Pofut1^{cnull}* e *Rbpjk^{cnull}*. A maioria destas células pareceu ser células não-diferenciadas, embora algumas delas demonstraram semelhança a células NE ou a células ciliadas imaturas.

Figura 21 - Diferenciação aberrante é acompanhada por uma redução nos níveis de proliferação celular em pulmões mutantes

Imunohistoquímica para Ki67 em pulmões controle aos 18.5 dpc, *Pofut1*^{null} (A-E) e *Rbpjk*^{null} (F-H) revela uma redução significativa no número de células Ki67-positivas (seta vermelha) nos brônquios primários, secundários e bronquíolos terminais de mutantes, quando comparados aos seus respectivos controle. Gráficos representam a porcentagem de células ki67-positivas no epitélio pulmonar; *, $p < 0.05$.

FONTE: Vasconcelos, 2011.

4.10 Notch restringe o comprometimento de progenitores respiratórios ao fenótipo ciliado

A inativação da sinalização Notch perturbou a formação de células de Clara (Figuras 13 e 16). Baseados neste fenótipo, questionamos se a inativação epitelial de Notch teria proporcionado um comprometimento precoce ao fenótipo ciliado de modo a exaurir progenitores reservados para a diferenciação de células secretoras.

Para investigarmos esta possibilidade, analisamos a expressão de Foxj1 e Ki67 aos 14.5 dpc, estágio que precede a diferenciação celular, no qual progenitores respiratórios começam a se comprometer ao fenótipo ciliado na região mais proximal do pulmão embrionário (Rawlins et al., 2007).

No pulmão controle, imunohistoquímica para Foxj1 marcou células epiteliais dispersamente distribuídas no segmento mais proximal dos brônquios principais aos 14.5 dpc (Figura 22A). Em *Pofut1^{cnull}*, entretanto, estas células foram observadas com maior frequência (Figura 22B). A análise quantitativa da marcação para Foxj1 comprovou que, de fato, há um aumento significativo no número de células ciliadas na região dos brônquios primários aos 14.5 dpc em relação ao controle (Figura 22G).

Contudo, é importante mencionar que células Foxj1 positivas em *Pofut1^{cnull}* não apresentaram nenhuma evidência de maturidade precoce (uma vez que não detectamos a presença de cílios pela expressão de β -tubulina), ou de que o programa de diferenciação de células ciliadas tivesse avançado em direção às vias aéreas mais distais (já que a marcação para Foxj1 foi apenas observada, como esperado para o estágio analisado, na região mais proximal do pulmão – Figura 22A,B).

Em relação à marcação para Ki67, observamos um padrão de expressão muito semelhante entre controle e mutante aos 14.5 dpc (Figura 22C,D,G). Considerando que precursores de células ciliadas não proliferam (Rawlins et al., 2007), pode-se inferir que a marcação positiva para Ki67, representa progenitores proximais não comprometidos a um tipo celular em particular, estando ainda disponíveis para diferenciação.

Estes experimentos demonstraram que o aumento no número de células ciliadas em virtude da inativação de Notch não foi suficiente para exaurir progenitores respiratórios necessários para a diferenciação de células de Clara aos 14.5 dpc. Este dado sugere que a via de sinalização Notch não exerce papel crucial na expansão de progenitores proximais aos 14.5 dpc.

Para investigarmos se precursores ainda disponíveis para a diferenciação aos 14.5 dpc incluíam progenitores da linhagem secretora, avaliamos o padrão de expressão *Clnd10* e *Scgb3a2*. Embora estes marcadores tenham sido descritos no tecido pulmonar em estágios relativamente precoces, suas relações com

progenitores putativos da linhagem secretora ainda são incertas (Kurotani et al., 2008; Zemke et al., 2008).

Através de ensaios de imunohistoquímica, observamos que a marcação para Cldn10 aos 14.5 dpc, apresentou-se uniforme em todo epitélio pulmonar, em ambos controle e *Pofut1^{cnull}* (dados não apresentados). Em contraste, imunohistoquímica para Scgb3a2 relevou intensa marcação em determinados grupos de células epiteliais proximais (Figura 22E-F). Este padrão foi completamente distinto da distribuição uniforme de Cldn10 e sugeriu que, aos 14.5 dpc, células Scgb3a2-positivas poderiam representar precursores precoces de células secretoras. A análise quantitativa deste dado revelou que o número de células positivas para Scgb3a2 tende a ser menor em *Pofut1^{cnull}*, sendo que embora não seja estatisticamente significativo, se correlaciona inversamente com o aumento de células Foxj1-positivas (Figura 22G). Este achado argumenta a favor da possibilidade de que embora a diferenciação de células secretoras tenha sido prejudicada em nossos mutantes, é possível que os estágios iniciais do programa de diferenciação de células de Clara tenham ocorrido.

De fato, temos evidências de que marcadores de células ciliadas e secretoras podem ser co-expressos nas fases mais iniciais do processo de diferenciação celular. Por exemplo, experimentos de imunofluorescência aos 15.5 dpc revelaram a presença de células duplo-positivas para Foxj1/Scgb3a2 (além das células que expressavam apenas um destes marcadores) nas regiões mais proximais, onde o processo de diferenciação é iniciado. Por outro lado, esta marcação encontrou-se ausente nas regiões mais distais (Figura 22H-J).

Estes resultados sugeriram, portanto, que Notch age durante as fases de comprometimento de precursores proximais aos destinos ciliados e não-ciliados, de modo a restringir o destino ciliado nestes precursores.

Figura 22 - Eventos relacionados às fases iniciais do processo de diferenciação em pulmões de *Pofut1^{cnull}*

(A,B) Aos 14.5 dpc, ensaios de imunohistoquímica revelam a presença de Foxj1 (setas) em progenitores de células ciliadas dispersos na região proximal do pulmão controle (A); esta marcação é observada com maior frequência na mesma região do pulmão mutante (B). (C,D) Imunohistoquímica para Ki67 aos 14.5 dpc resulta em um padrão de marcação semelhante entre os pulmões do grupo controle (C) e mutante (D). (E,F) Imunohistoquímica para Scgb3a2 aos 14.5 dpc resulta em uma intensa marcação em células epiteliais (setas) da região proximal tanto no pulmão controle (E) como no mutante (F), sugerindo a presença de precursores de células secretoras. (G) Análise quantitativa da marcação epitelial para três epítomos em pulmões controle e de *Pofut1^{null}* aos 14.5 dpc. No mutante, há um aumento significativo na porcentagem de células Foxj1-positivas ($P < 0.05$), uma tendência à redução na porcentagem de células Scgb3a2-positivas, e nenhuma alteração na porcentagem de células Ki67-positivas. (H-J) Dupla-imunofluorescência para Foxj1 (seta vermelha) e Scgb3a2 (seta verde) em pulmões controle aos 15.5 dpc revela sítios que se sobrepõem e que não se sobrepõem (H,I) nas vias aéreas que estão se comprometendo a um destino ciliado ou secretor. Não detectamos nenhuma marcação na região mais distal (J).

FONTE: Vasconcelos, 2011.

4.11 Efeito da inativação de Notch na expressão de Sox2

Sabe-se que a interação da sinalização Notch com fatores de transcrição da família Sox regula programas de desenvolvimento em uma série de sistemas (Dabdoub et al., 2008; Kiernam et al., 2006; Okamura e Saga, 2008).

No pulmão embrionário Sox2 é dinamicamente expresso em regiões da árvore brônquica que não se ramificam, marcando células inicialmente comprometidas ao destino celular proximal (Gontan et al., 2008; Ishii et al., 1998; Que et al., 2007).

Nosso laboratório demonstrou que a inibição farmacológica de Notch nos estágios iniciais do desenvolvimento pulmonar interferiu com o estabelecimento dos destinos proximais, reduzindo substancialmente o domínio de expressão de Sox2 (Tsao et al., 2008 – 8º e 9º parágrafos de 1.8.5).

Com base nestes dados, acreditamos que o impacto da inativação de Notch em progenitores proximais poderia ser acompanhado por alterações na expressão de Sox2.

Através de ensaios de imunohistoquímica aos 14.5 dpc observamos, no controle, células positivas para Sox2 amplamente distribuídas ao longo do epitélio pulmonar (Figura 23A). A marcação para Sox2 em *Pofut1^{cnull}* foi extremamente semelhante à marcação observada no controle, tanto em relação ao padrão de expressão como para o número de células marcadas (Figura 23A,B). Este achado sugeriu que Notch não é necessário para induzir ou manter a expressão de Sox2 em progenitores proximais, pelo menos até o estágio de 14.5 dpc.

Em contraste, mutantes *Pofut1^{cnull}* aos 18.5 dpc, tiveram a expressão de Sox2 quase que completamente abolida (Figura 23F-H). No controle, Sox2 foi detectado predominantemente em células não-ciliadas, embora expresso por algumas células ciliadas da região traqueal e dos brônquios primários (Figura 23C-E). Nos pulmões de *Pofut1^{cnull}* a expressão de Sox2 foi raramente detectada e, quando presente, foi observada em células ciliadas ou células imaturas (Figura 23F-G).

As alterações observadas no padrão de expressão de Sox2 foram semelhantes às observadas para a marcação de Ki67 aos 14.5 dpc (Figura 23B; Figura 22G) e aos 18.5 dpc (compare Figura 23H; com Figura 21E e 21H). Assim, especulamos que aos 14.5 dpc progenitores positivos para Sox2 retêm suas habilidades de proliferação e assumem diferentes destinos proximais. Esta especulação está de acordo com estudos sobre o desenvolvimento da medula espinhal onde foi demonstrado que Sox2 mantém a capacidade proliferativa e as propriedades pan-neurais de células progenitoras ao inibir o processo de diferenciação terminal nas mesmas (Graham et al., 2003). Mais tardiamente, quando o programa de diferenciação mediado por Notch é iniciado, a expressão de Sox2 é silenciada em progenitores que estão se diferenciando em células ciliadas e NE, enquanto que permanece naqueles que se diferenciarão em células de Clara.

Este mecanismo poderia estar envolvido com o estabelecimento do balanço adequado de tipos celulares presentes nos diferentes segmentos pulmonares.

Figura 23 - Efeito da deleção de Pofut1 na expressão de Sox2

(A) Imunohistoquímica para Sox2 aos 14.5 dpc em pulmão controle, demonstra uma marcação presente em toda extensão epitelial, com exceção dos botões pulmonares mais distais. (B) Análise quantitativa aos 14.5 dpc revela que aproximadamente 65% das células epiteliais correspondem a células Sox2-positivas em ambos os grupos. (C-E) Em pulmões controle aos 18.5 dpc, Sox2 é expresso (seta) no epitélio pulmonar, predominantemente, em células não-ciliadas (D), embora existam células positivas nas regiões mais proximais (E). (F,G) Pulmões *Pofut1^{null}*, são negativos para a marcação de Sox2. (H) Análise quantitativa de células Sox2-positivas presentes nos brônquios primários, secundários e bronquíolos terminais, demonstra uma redução substancial no número de células marcadas nestas regiões (*, $p < 0.05$) em *Pofut1^{null}* quando comparado ao grupo controle.

FONTE: Vasconcelos, 2011.

4.12 Anormalidades no processo de diferenciação celular estão associadas com a expressão anormal dos componentes da via de sinalização Notch

Estudos em uma série de organismos sugeriram que a expressão seletiva do receptor ou do ligante da via de sinalização Notch pode definir o estado de ativação desta via de sinalização e o destino de determinado tipo celular (Radtke e Ragj, 2003). Há evidências de que células NE no pulmão em desenvolvimento expressam, seletivamente, o ligante Dll1, e que mediante a inativação da sinalização Notch ou de Hes1, células NE se expandem (Beckers et al., 1999; Ito et al., 2000; Post et al., 2000; van Tuyl et al., 2005).

Assim, investigamos se a expansão de células ciliadas observada em nossos mutantes estava associada com alterações no padrão de expressão dos componentes da via de sinalização Notch. Para tanto, realizamos ensaios de hibridização *in situ* seguidos por imunohistoquímica aos 18.5 dpc em controle e Rbpjk^{cnull}, utilizando sondas para detecção de RNA mensageiro dos componentes da sinalização Notch e anticorpo anti-Foxj1.

Tanto no controle quanto em e Rbpjk^{cnull}, a expressão de Dll1 não coincidiu com a expressão de Foxj1, estando restrita às células NE (Figura 24A,B). Em contraste, observamos que a expressão de Jag1 coincide com a de Foxj1 no epitélio pulmonar controle, estando ausente em células secretoras. No pulmão controle células que co-expressam Jag1/Foxj1 encontram-se intercaladas por células negativas para ambos marcadores. Entretanto, este padrão de distribuição é completamente alterado no pulmão de Rbpjk^{cnull}, uma vez que todas as células epiteliais tornam-se Jag1-positivas, o que é consistente com o fato de que neste epitélio, todas as células são ciliadas (exceto por células NE) (Figura 24C,D).

Marcações para Jag1 e Foxj1 não foram detectadas em células NE. Notch1 e Hes1 foram expressos por células Foxj1-negativas, enquanto que em pulmões de mutantes, a expressão destes genes foi substancialmente reduzida ou completamente ausente (Figura 24E-H).

Estes dados sugeriram que a sinalização Notch controla o equilíbrio dos destinos celulares no pulmão em desenvolvimento, provavelmente, ao gerar diferenças entre os níveis de receptor/ligante em precursores epiteliais.

Figura 24 - Expressão dos componentes da via de sinalização Notch no epitélio pulmonar em desenvolvimento

Experimentos de dupla-marcação: imunohistoquímica para Foxj1 (em marrom, marcação nuclear) e hibridização *in situ* (em azul, marcação citoplasmática) para **(A,B)** Dll1, **(C,D)** Jag1, **(E,F)** Notch1 e **(G,H)** Hes1 em pulmões controle (A,C,E,G) e *Rbpjk^{cnull}* (B,D,F,H). A expressão de Dll1 é restrita às células neuroendócrinas (NE) no epitélio pulmonar (A,B), enquanto que a expressão de Jag1 está intimamente associada às células Foxj1-positivas tanto no controle (C, inset) como nos mutantes (D, observe a abundante dupla-marcação para Jag1/Foxj1). Em contrapartida, Notch1 e Hes1 são preferencialmente expressos em células Foxj1-negativas que são, presumivelmente, células secretoras (E,G). Nos mutantes a expressão de Notch1 (F) e Hes1 (H) é dramaticamente reduzida ou até mesmo abolida (*) (compare com os altos níveis de expressão de Notch1 no mesênquima (seta em F)).

FONTE: Vasconcelos, 2011.

4.13 Identificação de genes-alvo da sinalização Notch durante a diferenciação do epitélio pulmonar

4.13.1 Microarray - sistema *in vivo*

Os mutantes Pofut1 e Rbpjk apresentaram um fenótipo extremamente característico. Observamos que a ausência da via de sinalização Notch no epitélio pulmonar culminou em um pulmão superpopulado por células ciliadas, apresentando um número elevado de células neuroendócrinas e ainda desprovido de células de Clara. Com base neste fenótipo, entendemos que Pofut1 e Rbpjk representam uma ferramenta promissora para a investigação de genes associados ao programa de diferenciação destas linhagens celulares viabilizando, potencialmente, a identificação de novos marcadores moleculares do epitélio pulmonar em desenvolvimento.

Para nos beneficiarmos de tal oportunidade, submetemos pulmões de Pofut1^{cnull} e Rbpjk^{cnull} aos 18.5 dpc a uma análise em larga escala de seus padrões de expressão gênica através de microarrays. Por meio da determinação de variações no padrão global de expressão gênica em resposta a ausência de Notch no epitélio pulmonar, buscamos identificar genes negativamente (subexpressos) ou positivamente (superexpressos) regulados por esta via de sinalização durante a fase de diferenciação do pulmão embrionário.

4.13.2 Affymetrix's - mouse genome 430 2.0 array chips

Das 39000 sondas presentes no microarray chip utilizado (Affymetrix's - Mouse genome 430 2.0 array chips), 422 foram diferencialmente expressas entre pulmões controle VS Pofut1^{cnull} e 287 entre pulmões controle VS Rbpjk^{cnull}. Genes diferencialmente expressos foram definidos segundo valor *p*-ajustado FDR (*false discovery rate*) ≤ 0.05 . Em nossa análise, estes genes foram agrupados de modo a determinar: a) genes diferencialmente expressos unicamente em controle VS Pofut1^{cnull} (n=184); b) genes diferencialmente expressos unicamente em controle VS Rbpjk^{cnull} (n=49) e c) genes diferencialmente expressos por ambos modelos (n=238) (Figura 25A).

Estas três categorias estão representadas graficamente através de *heat maps* (Figura 25B-D). Estes gráficos permitem analisar o padrão de variação global nos níveis de expressão gênica e compará-lo entre os grupos estudados.

Os 184 genes diferencialmente expressos somente em controle VS Pofut1^{cnull}

estão representados na Figura 25B (delimitados pela linha tracejada). No total, 125 genes foram superexpressos (em vermelho, no primeiro quadrante) e 59 subexpressos (em azul, terceiro quadrante) em *Pofut1^{cnul}* quando comparados ao controle (segundo e quarto quadrantes, respectivamente). Na mesma figura, é interessante observar que estes mesmos genes tendem a variar de forma semelhante no modelo *Rbpjk*, embora não sejam diferencialmente expressos no mesmo.

Dos 49 genes diferencialmente expressos somente em controle VS *Rbpjk^{cnul}* (Figura 25C delimitados pela linha tracejada), 41 foram superexpressos e 8 subexpressos nos mutantes em relação ao controle. Aqui também observamos que estes genes tendem a seguir o mesmo padrão de variação no modelo *Pofut1*, embora não sejam diferencialmente expressos no mesmo.

Em relação ao padrão de expressão de genes diferencialmente expressos em ambos modelos (total 238, sendo 225 superexpressos e 13 subexpressos), observa-se prontamente uma grande uniformidade no padrão de variação de expressão gênica entre os grupos analisados, de modo que agrupamentos de genes subexpressos e superexpressos nestes modelos, apresentam-se como imagens especulares uns dos outros (Figura 25D).

Os gráficos do tipo *heat map* indicaram que o padrão de variação do perfil de expressão gênica entre *Pofut1^{cnul}* e *Rbpjk^{cnul}* foi extremamente semelhante, embora a inativação de Notch tenha ocorrido em diferentes níveis nestes mutantes. Neste contexto, pode-se inferir que as variações detectadas no perfil de expressão gênica refletiram, potencialmente, a inativação da via de sinalização Notch no epitélio pulmonar.

Genes subexpressos e superexpressos em mutantes *Pofut1^{cnul}* estão listados nas Tabelas¹ 2 e 3, respectivamente. Genes subexpressos e superexpressos em mutantes *Rbpjk^{cnul}* estão listados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. Nestas tabelas apresentamos também valores *p*-ajustado e *fold change* para cada um dos genes detectados.

Figura 25 - Análise do perfil global de expressão gênica nos modelos *Pofut1* e *Rbpjk*

¹ Tabelas encontram-se no final da seção Resultados.

(A) Diagrama de Venn representando a distribuição de genes diferencialmente expressos em nosso sistema *in vivo*. **(B)** *Heat map* de 184 genes diferencialmente expressos entre amostras em triplicata de controle VS Pofut1^{cnul} (linha tracejada, 125 genes superexpressos e 59 subexpressos no mutante em relação ao controle) segundo valor-*p* ajustado FDR <0.05. **(C)** *Heat map* de 49 genes diferencialmente expressos entre amostras em triplicata de controle VS Rbpjk^{cnul} (linha tracejada, 9 genes subexpressos e 41 superexpressos no mutante em relação ao controle) segundo valor-*p* ajustado FDR <0.05. **(D)** *Heat map* de 238 genes diferencialmente expressos entre amostras em triplicata de controle VS Pofut1^{cnul} e controle VS Rbpjk^{cnul} (13 genes subexpressos e 225 superexpressos nos mutantes em relação ao controle), segundo valor-*p* ajustado FDR <0.05. FONTE: Vasconcelos, 2011.

O foco central de nossa análise, baseou-se na caracterização dos padrões de expressão de genes diferencialmente expressos em ambos mutantes (Figura 25D). Adotamos esta estratégia, principalmente, para maximizar as chances de identificarmos genes restritos à via canônica da sinalização Notch, uma vez que variações no padrão de expressão gênica restritas ao mutante Pofut1, podem refletir também a ausência deste gene em outras vias de sinalização das quais participa (3º parágrafo de 1.8.3) (Harris et al., 1993; Okajima et al., 2003; Schiffer et al., 2001).

É importante mencionar também que a interpretação dos experimentos descritos adiante, baseou-se na premissa de que genes envolvidos com os processos de diferenciação de células de Clara (células secretoras), apresentariam-se subexpressos em Pofut1^{cnul} e Rbpjk^{cnul} (em relação ao seus respectivos controles), uma vez que estes mutantes são desprovidos deste tipo celular. Por

outro lado, genes associados aos processos de diferenciação de células ciliadas, apresentariam-se superexpressos em *Pofut1^{cnull}* e *Rbpjk^{cnull}*, dado que o epitélio pulmonar destes mutantes é formado, quase que exclusivamente, por células ciliadas (em relação a seus controles).

De fato, observamos que genes regulados positivamente pela sinalização Notch (superexpressos) representaram cerca de 95% do total de genes diferencialmente expressos em ambos modelos (Figura 25D). Este achado foi condizente com a premissa proposta para interpretação de nossos dados, e indicou que genes superexpressos em nossos mutantes resultaram da super-representação de células ciliadas no epitélio pulmonar de *Pofut1^{cnull}* e *Rbpjk^{cnull}*, enquanto que a pequena parcela de genes subexpressos nestes modelos (5%), foi justificada pela sub-representação (ou melhor, ausência) de células de Clara nestes mutantes (em relação ao pulmão controle).

4.13.3 Genes subexpressos em *Pofut1^{cnull}* e *Rbpjk^{cnull}*

Dos genes diferencialmente expressos em ambos modelos genéticos (238), apenas 13 apresentaram-se subexpressos nos mutantes (em relação aos seus respectivos controles). Dentre eles, 3 foram identificados como marcadores do fenótipo secretor: *Scgb1a1*, *Scgb3a2* e *Cyp2f2*, genes extensivamente caracterizados na literatura como marcadores de células de Clara. Estes genes apresentaram os valores mais elevados de *fold change* detectados (35, 16 e 8 vezes subexpressos em nossos mutantes, respectivamente) e constituíram controles-positivos para nossa análise (Figura 26A). Não encontramos na literatura evidências sobre o envolvimento dos demais genes no desenvolvimento pulmonar.

Assim, para confirmar os dados gerados pelo microarray e para identificarmos o padrão de expressão destes genes no tecido pulmonar em desenvolvimento, realizamos ensaios de hibridização *in situ* comparando o padrão de expressão entre pulmões controle e de *Rbpjk^{cnull}* aos 18.5 dpc.

Além de analisarmos o padrão de expressão de genes diferencialmente expressos em ambos mutantes, incluímos em nossa análise, dois genes diferencialmente expressos apenas em controle VS *Rbpjk*, sendo eles: *Reg3g* (*Regenerating islet-derived protein 3 gamma*) e *Muc5b* (*Mucin 5b*) (destacados pelo asterisco na Figura 26A). *Reg3g* foi selecionado por apresentar um valor de *fold change* elevado (correspondente a 8.6), o qual o posicionou em terceiro lugar na classificação de genes subexpressos apenas em *Rbpjk^{cnull}*, segundo o critério *fold change*. O gene *Muc5b* nos chamou atenção pelo fato de ser um marcador

conhecido de células caliciformes (células secretoras distintas de células de Clara), que em nosso sistema apresentou-se diferencialmente expresso apenas em *Rbpjk^{cnull}*.

A presença de controles-positivos em nossa análise, não apenas validou os dados gerados pelo microarray, mas também ressaltou o potencial que esta base de dados nos oferece para a identificação de novos marcadores moleculares de células de Clara.

4.13.4 Genes subexpressos em *Pofut1^{cnull}* e *Rbpjk^{cnull}* - confirmação dos dados do microarray através de ensaios de hibridização *in situ*

Ensaio de hibridização *in situ* para os genes selecionados revelaram diversos padrões de expressão no pulmões controle. Nos pulmões de *Rbpjk^{cnull}* em contraste, constatamos que a expressão destes genes foi dramaticamente reduzida (*Cbr2* - *carbonyl reductase 2*, *Hp*- *Haptoglobin*), estando completamente ausente na maioria dos casos (*Chad*- *chondroadherin*; *Reg3g*; *Gsta*- *glutathione S-transferase*; *Gabrp*- *gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor*; *Krt15*- *Keratin 15* e *Upk3a*- *Uroplakin 3a*) (Figura 26B-S).

Este resultado confirmou os dados apresentados pelo microarray e sugeriu que estes genes representam, possivelmente, marcadores putativos de células de Clara do tecido pulmonar aos 18.5 dpc.

Figura 26 - Genes subexpressos em *Pofut1^{cnul}* e *Rbpjk^{cnul}* estão associados ao fenótipo secretor

(A) Genes subexpressos em ambos mutantes. Em vermelho, controles-positivos (já caracterizados como marcadores de células de Clara). *, genes diferencialmente expressos apenas entre controle VS *Rbpjk^{cnul}*. **(B-S)** Ensaios de hibridização *in situ* aos 18.5 dpc para alguns dos genes subexpressos em nossos mutantes, em relação ao controle. Note que a expressão destes genes apresentou-se de fato, reduzida (ou completamente ausente) nos pulmões de *Rbpjk^{cnul}* em relação ao controle. FONTE: Vasconcelos, 2011.

4.13.5 Genes subexpressos em *Pofut^{cnull}* e *Rbpjk^{cnull}* – análise do padrão de expressão gênica

Os ensaios de hibridização *in situ* foram realizados com o propósito de, não apenas confirmarmos os dados fornecidos pelo microarray, mas também para identificarmos o padrão de expressão destes genes no tecido pulmonar.

A heterogeneidade no padrão de expressão gênica apresentada por pulmões controle aos 18.5 dpc (Figura 26B,D,F,H,J,L,N,P e R) nos levou a investigar, em maiores detalhes, os diversos padrões detectados. Estes padrões foram caracterizados de acordo com a distribuição de determinado gene no epitélio pulmonar e também de acordo com seus níveis de expressão ao longo do eixo próximo-distal. Com base nestes critérios, cinco padrões de expressão foram detectados.

O primeiro padrão consiste em uma expressão gênica confinada à região extrapulmonar e está representado pela expressão de *Muc5b*, que é restrita à traquéia (Figura 27A). O segundo padrão é caracterizado por uma expressão que, além de incluir a região traqueal, estende-se até os brônquios primários, sendo representado pela expressão de *Reg3g* (Figura 27B). No terceiro padrão, observamos níveis de expressão (como os genes *Hp* e *Cbr2*) que se estendem por todos os segmentos pulmonares de forma uniforme (da região mais proximal à mais distal) (Figura 27C). O quarto padrão consiste em uma variação do padrão anterior, sendo caracterizado por uma expressão na forma de gradiente, cujos níveis mais intensos decrescem em orientação próximo-distal (*Chad*, *Krt15*, *Gabpr* e *Gsta*) (Figura 27D). O quinto padrão observado é bem distinto dos anteriores, sendo caracterizado pela presença de pequenos agrupamentos celulares (clusters celulares) distribuídos ao longo do epitélio pulmonar, desde as regiões dos brônquios primários até as proximidades dos bronquíolos terminais, sendo representado pela expressão do gene *Upk3a*² (Figura 27E).

A sobreposição entre os domínios de expressão que detectamos com esta análise (Figura 27A-D) sugere a existência de um mecanismo, mediado por Notch, que permite ou restringe a expressão de determinado gene em regiões específicas da árvore brônquica. Padrões completamente distintos (Figura 27A e E), no entanto, sugerem a existência de múltiplos subtipos de células de Clara no epitélio pulmonar em desenvolvimento.

² A caracterização detalhada do padrão de expressão de *Upk3a* encontra-se nas Figuras 3,4 e 5 do Anexo C deste trabalho (paper em revisão em PNAS).

Figura 27- Heterogeneidade do padrão de expressão de genes associados ao fenótipo secretor

Ensaio de hibridização *in situ* em pulmões controle aos 18.5 dpc. **(A)** Padrão de expressão uniforme restrito à região extrapulmonar. **(B)** Padrão de expressão uniforme que se estende da região extrapulmonar aos brônquios primários. **(C)** Padrão caracterizado por níveis uniformes de expressão observados desde regiões proximais (traqueal, extrapulmonar), às mais distais (bronquíolos terminais). **(D)** Padrão de expressão em gradiente cujos níveis mais intensos decrescem da região proximal à distal. **(E)** Padrão de expressão caracterizado pela presença de clusters positivos, predominantemente, na região intrapulmonar. Bp= brônquio primário; Bt= bronquíolo terminal; Tr= traquéia; P= proximal; D= distal; Extrapulm.= extrapulmonar.

FONTE: Vasconcelos, 2011.

4.13.6 Genes superexpressos em *Pofut^{cnull}* e *Rbpjk^{cnull}*

Dos 238 genes diferencialmente expressos em controle VS *Pofut1^{cnull}* e controle VS *Rbpjk^{cnull}*, 225 foram superexpressos nos mutantes (Figura 25D) Destes 225, diversos genes foram identificados como marcadores do fenótipo ciliado,

dentre eles: Foxj1 (marcador de células ciliadas do epitélio pulmonar), genes que codificam para os componentes do axonema ciliar (dineínas) ou associados ao processo de projeção e motilidade ciliares (Kif9- *kinesin family member 9*; Kif27, - *kinesin family member 27*; Spag6- *sperm associated antigen 6*; Spag17- *sperm associated antigen 17*; Tekt2- *testicular tektin B1-like protein*; Tubb2c- *tubulin beta-2C chain* e Tsga10- *testis-specific gene antigen 10*).

Para seleção de genes de interesse, utilizamos como critério cutoff *fold change* ≥ 2.0 , tanto em Pofut1^{cnul} como em Rbpjk^{cnul}. Incluímos também em nossa análise genes que codificam para fatores de transcrição, como Myb (*myeloblastosis oncogene*) e Phtf1 (*putative homeodomain transcription factor 1*), embora tenham apresentado valores para *fold change* inferiores a 2. A Figura 28A apresenta os genes que foram selecionados de acordo com o critério descrito acima.

Assim, para confirmarmos os dados gerados pelo microarray e para identificarmos o padrão de expressão destes genes no tecido pulmonar em desenvolvimento, realizamos ensaios de hibridização *in situ* comparando o padrão de expressão entre pulmões controle e de Rbpjk^{cnul} aos 18.5 dpc.

A presença de controles-positivos em nossa análise, não apenas validou nosso array, mas também ressaltou o potencial que esta base de dados nos oferece para a identificação de novos marcadores moleculares do tipo celular ciliado.

4.13.7 Genes superexpressos em Pofut1^{cnul} e Rbpjk^{cnul} - confirmação dos dados do microarray através de ensaios de hibridização *in situ*

Ensaio de hibridização *in situ* para os genes selecionados, revelaram diversos padrões de expressão nos pulmões controle e nos de Rbpjk^{cnul}. De modo geral, observamos que o nível de expressão destes genes apresentou-se mais elevado nos pulmões dos mutantes em relação aos seus controles (discutido em detalhes na próxima seção) (Figura 28B-Q). Este resultado confirmou os dados apresentados pelo microarray e sugeriu que estes genes representam, possivelmente, marcadores putativos de células ciliadas do tecido pulmonar aos 18.5 dpc.

Para entendermos as variações no perfil de expressão gênica apresentadas pelos mutantes analisamos, primeiramente, os diversos padrões de expressão detectados no pulmão controle. Segundo as variações observadas nos domínios e nos níveis de expressão dos genes analisados, identificamos três padrões de expressão (Figura 29).

O primeiro padrão consiste na expressão de genes restritos à região traqueal e dos brônquios principais, como *Lrrc34* (*leucine rich repeat containing 34*), *Porcn* (*porcupine homolog*) e *Phtf1* (Figura 29A). O segundo padrão é caracterizado por níveis uniformes de expressão em todos os segmentos pulmonares, desde regiões mais proximais às mais distais, sendo representado pelos genes *Tm4sf1* (*transmembrane 4 superfamily member 1*) e *Myb* (Figura 29B). O terceiro padrão consiste em uma expressão na forma de gradiente, cujos níveis mais intensos decrescem em orientação próximo-distal (*Mt2- metallothionein 2*, *Dnhac3- dynein, axonemal, heavy chain 3* e *Efcab1- EF hand calcium binding domain 1*) (Figura 29C).

Em resumo, observamos que genes associados ao fenótipo ciliado apresentaram um padrão de expressão bastante heterogêneo nos pulmões controle. Acreditamos que tal heterogeneidade esteja associada, possivelmente, à existência de subpopulações de células ciliadas no epitélio pulmonar em desenvolvimento.

Figura 28- Genes superexpressos em *Pofut1^{cnul}* e *Rbpjk^{cnul}* estão associados ao fenótipo ciliado

(A) Lista de genes superexpressos em *Pofut1^{cnul}* e *Rbpjk^{cnul}* selecionados para nossa análise. (B-Q) Ensaios de hibridização *in situ* aos 18.5 dpc para genes apresentados em (A) comparando pulmões controle e de *Rbpjk^{cnul}*.
 FONTE: Vasconcelos, 2011.

Figura 29 - Heterogeneidade do padrão de expressão de genes associados ao fenótipo ciliado

Ensaio de hibridização *in situ* em pulmões controle aos 18.5 dpc. **(A)** Padrão de expressão uniforme restrito à região extrapulmonar. **(B)** Padrão caracterizado por níveis uniformes de expressão desde regiões proximais (traqueal, extrapulmonar), às mais distais (bronquíolos terminais). **(C)** Padrão de expressão caracterizado por um em gradiente, cujos níveis mais intensos decrescem da região proximal à distal. Bp= brônquio primário; Tr= traquéia; P= proximal; D= distal.

FONTE: Vasconcelos, 2011.

4.13.8 Genes superexpressos em *Pofut1^{cnull}* e *Rbpjk^{cnull}* – análise do padrão de expressão gênica

Uma análise mais detalhada dos dados apresentados na Figura 28 revelou que a inativação de Notch no epitélio pulmonar resultou em dois tipos de variações no padrão de expressão gênica. Em primeiro lugar, observamos em *Pofut1^{cnull}* e *Rbpjk^{cnull}* que genes como *Tm4sf1*, *Mt2*, *Myb*, *Dnahc3* e *Efcab1*, apresentaram uma expansão em seus domínios de expressão, de modo que praticamente todas as células epiteliais tornaram-se positivas. Adicionalmente, observamos que nossos mutantes expressaram *Phtf1*, *Porcn* e *Lrrc34* ectopicamente em relação aos pulmões controle.

Com as Figuras 30,31 e 32 demonstramos como a inativação de Notch interferiu sobre a expressão de genes como *Mt2*, *Dnahc3* e *Myb*, respectivamente. Observe que células positivas para *Mt2* e *Dnahc3* em pulmões controle estão distribuídas, predominantemente, na região dos brônquios primários (Figura 30A,E), apresentando-se intercaladas por células que não expressam estes genes (Figura 30C,G). Em contraste, nos pulmões de *Rbpjk^{cnull}*, células positivas para *Mt2* e *Dnahc3* encontram-se distribuídas em abundância não apenas na região dos brônquios primários, mas também nos demais segmentos pulmonares (Figura 30B,D e 30F,H). Além disso ficou claro que, praticamente, todas as células epiteliais tornaram-se positivas para estes genes, com exceção de clusters de células neuroendócrinas (Figura 30D e 30H, círculo tracejado). O padrão de expressão de *Myb* também exemplificou este efeito. Observe que *Myb* foi expresso amplamente tanto no pulmão controle como no mutante (Figura 31A-B). Entretanto, observamos que no pulmão controle, células positivas para *Myb* encontravam-se intercaladas por células que não expressavam estes gene (Figura 31C), enquanto que no mutante, este padrão foi convertido em uma expressão uniforme de *Myb* ao longo do epitélio pulmonar (Figura 31D). Para verificarmos como a expressão de *Myb* associava-se a um marcador de células ciliadas, realizamos experimentos de dupla-marcação onde identificamos células *Myb*-positivas através de hibridizações *in situ* para este gene (marcação citoplasmática em azul), e células ciliadas através de imunohistoquímica para *Foxj1* (marcação nuclear em marrom). No pulmão controle, observamos que todas as células *Myb*-positivas co-expressavam *Foxj1*, porém nem todas as células *Foxj1*-positivas expressaram *Myb* (Figura 31E,G). Por outro lado, todas as células epiteliais do pulmão mutante apresentaram-se duplo-positivas, com exceção de clusters neuroendócrinos (Figura 31F,H). Este achado indicou que a expressão de *Myb* está associada a uma subpopulação de células ciliadas do epitélio pulmonar,

uma vez que encontramos células ciliadas (Foxj-positivas) negativas para Myb (Figura 31G, setas).

A inativação de Notch também alterou o padrão de expressão de genes como Phtf1 de modo a induzi-lo ectopicamente. No pulmão controle aos 18.5 dpc, observamos que a expressão de Phtf1 é restrita à região traqueal (região proximal). No mutante, em contraste, observamos que Phtf1 passa a ser expresso da região traqueal (proximal) aos bronquíolos terminais (distal), não de modo uniforme, mas em diferentes níveis de expressão ao longo do epitélio pulmonar (Figura 32A-F). Este resultado indicou que a expressão de Phtf1 está associada a subtipos ciliados mais proximais.

Figura 30- Impacto da inativação epitelial de Notch sobre a expressão de genes associados ao fenótipo ciliado

Hibridização *in situ* para Mt2 aos 18.5 dpc em pulmões controle (**A,C**) revelou um padrão de expressão predominante em segmentos mais proximais, como nos brônquios primários (bp em A). Observe em (C) que células positivas para Mt2 (seta vermelha) são circundadas por células negativas para este gene (seta branca). Em *Rbpjk^{null}* por outro lado (**B,D**), observamos que os domínios de expressão de Mt2 foram expandidos em direção às regiões mais distais, como os bronquíolos terminais (B), sendo que altos níveis de Mt2 foram detectados em praticamente todas as células epiteliais, com exceção de células neuroendócrinas (NE) (D, delimitadas por círculo tracejado). Um efeito semelhante é observado pela expressão de Dnahc3 (E-H). No pulmão controle (**E,G**), a expressão deste gene parece ser restrita às regiões mais proximais (brônquio primário, bp, em E), onde observamos células positivas intercaladas com células negativas para Dnahc3 (G, seta vermelha, seta branca, respectivamente). No mutante *Rbpjk^{null}* (**F,H**), Dnahc3 é expresso não apenas em segmentos mais proximais, mas também nos distais (bt, bronquíolo terminal, em F), marcando praticamente todas as células epiteliais de um dado segmento (H) (com exceção de células NE, circundadas por círculo tracejado em H). Bp= brônquio primário; Bt= bronquíolo terminal; Tr= traquéia.

FONTE: Vasconcelos, 2011.

Figura 31 - Impacto da inativação epitelial de Notch sobre a expressão de genes associados ao fenótipo ciliado

Hibridização *in situ* em pulmão controle aos 18.5 dpc (**A,C**), revela que células Myb-positivas (seta vermelha em C) são amplamente distribuídas nas regiões traqueais e intra-pulmonares, sendo observadas de forma alternada às células negativas ao longo do epitélio (C, seta branca). No pulmão mutante *Rbpjk^{null}* (**B,D**), Myb é amplamente expresso (B) sendo observado praticamente em todas as células epiteliais (D) (com exceção de células NE, circulasdas pelo tracejado). (**E-H**) Ensaios de hibridização *in situ* para Myb (marcação citoplasmática em azul) seguidos de imunohistoquímica para Foxj1 (marcador de células ciliadas, marcação nuclear em marrom). No controle (**E,G**), células Myb-positivas (marcação em azul) co-expressam Foxj1 (marcação em marrom) (setas vermelhas), e estão intercaladas por células negativas para ambos marcadores (setas brancas). Observamos que algumas células marcadas por Foxj1 não expressam Myb (G, setas). O pulmão mutante (**F,H**) em contraste, apresenta uma expressão uniforme de Myb/Foxj1 em toda extensão epitelial (com exceção de células NE, circulasdas pelo tracejado em H).

FONTE: Vasconcelos, 2011.

Figura 32- Impacto da inativação epitelial de Notch sobre a expressão de genes associados ao fenótipo ciliado

Ensaio de hibridização *in situ* para *Phtf1* revelaram que este gene é expresso exclusivamente em regiões extrapulmonares (traquéia) em pulmões controle aos 18.5 dpc (A). Em *Rbpjk^{null}*, *Phtf1* é amplamente expresso ao longo do epitélio pulmonar (B), sendo ectopicamente expresso em brônquios secundários (compare D com C) e bronquíolos terminais (compara com E com F).
 FONTE: Vasconcelos, 2011.

4.14 Identificação de genes-alvo da sinalização Notch durante a diferenciação do epitélio pulmonar

4.14.1 Microarray - sistema *in vitro*

Com o objetivo de identificarmos genes associados aos eventos iniciais do processo de diferenciação celular de tipos secretores e ciliados, utilizamos um sistema *in vitro* que nos permite inativar a sinalização Notch em estágios iniciais do desenvolvimento pulmonar. Este sistema consiste no uso de um inibidor farmacológico da via de sinalização Notch (DAPT) em culturas de explantes pulmonares. DAPT impede a ação do complexo gama-secretase, bloqueando assim todos os possíveis modos de ativação da via Notch (6º parágrafo de 1.8.5).

4.14.2 Affymetrix's – mouse genome exon array chips 1.0 ST

De 1.2 milhões de sondas presentes em microarray chips utilizado para esta análise (Affymetrix's –mouse genome exon array chips 1.0 ST), 451 foram diferencialmente expressas segundo valor *p*-ajustado FDR (*false discovery rate*) ≤ 0.05 , e estão representados na Figura 33 por gráfico do tipo *heat map*. Genes subexpressos e superexpressos em explantes tratados com DAPT estão listados nas Tabelas³ 6 e 7, respectivamente (assim como os valores *p*-ajustado e *fold change*).

Dos 451 genes diferencialmente expressos em controle VS DAPT, 213 foram superexpressos e 238 subexpressos nos explantes tratados com DAPT (em relação ao controle) (Figura 33A). Neste sistema, também identificamos controles-positivos como o gene *Foxj1* (marcador de células ciliadas) e *Scgb3a2* (marcador de células de Clara). Estes marcadores estavam entre os genes que apresentaram maiores valores de *fold change*, no grupo de genes superexpressos e subexpressos, respectivamente (Figura 33B e C).

Para a seleção de genes-candidatos utilizamos como critério valores para *fold change* ≥ 2 . Dez dos genes com maiores valores para *fold change* em nossa análise estão representados na Figura 33B e C (superexpressos e subexpressos, respectivamente). Para identificação do padrão de expressão destes genes (e de outros também com altos valores para *fold change* – dados não apresentados), realizamos ensaios de hibridização *in situ* em explantes cultivados aos 12 dpc sob condição controle e tratados com DAPT.

³ Tabelas encontram-se no final da seção Resultados.

Figura 33- Genes diferencialmente expressos entre amostras em triplicata de explantes pulmonares controle VS DAPT

(A) Heat map dos 451 genes diferencialmente expressos entre controle VS DAPT, segundo valor p -ajustado FDR <0.05. **(B)** Dez dos genes com maiores valores para *fold change* entre genes superexpressos em explantes tratados com DAPT. Em vermelho destacamos Foxj1, um marcador de células ciliadas, detectado entre genes superexpressos em explantes tratados com DAPT em relação ao controle. **(C)** Dez dos genes com maiores valores para *fold change* entre genes subexpressos em explantes tratados com DAPT. Em vermelho destacamos Scgb3a2, um marcador de células secretoras, detectado entre genes subexpressos em explantes tratados com DAPT em relação ao controle.

FONTE: Vasconcelos, 2011.

4.14.3 Confirmação dos dados gerados pelo microarray através de ensaios de hibridização *in situ*

Ensaios de hibridização *in situ* revelaram que grande parte dos genes analisados foi expressa, predominantemente, no mesênquima de explantes pulmonares. Alguns destes genes apresentaram expressão tanto no mesênquima como no epitélio. Considerando que o foco deste trabalho está voltado aos processos de diferenciação de células epiteliais, priorizamos a investigação de genes expressos nessa camada.

Além de analisarmos o padrão de expressão destes genes em explantes cultivados, investigamos também como estes se comportam frente à inativação epitélio-específica de Notch. Para tanto, examinamos o padrão de expressão destes genes em pulmões de nossos modelos genéticos (Pofut1 e Rbpjk).

O gene Btnl9 (*butyrophilin-like 9*) apresentou um padrão de expressão extremamente difuso no epitélio e no mesênquima do explante pulmonar controle (Figura 34A). Consistente com a indicação do microarray (Figura 33C) observamos, através de ensaios de hibridização *in situ*, que Btnl9 foi dramaticamente reduzido no explante tratado com DAPT (Figura 34B).

Surpreendentemente, constatamos que aos 18.5 dpc, Btnl9 apresenta-se restrito às células epiteliais de pulmões controle (Figura 34C,E,G). Em concordância com os dados descritos acima (Figura 34A-B) e com os dados provenientes do microarray, observamos que a expressão de Btnl9 foi praticamente abolida no pulmão de Rbpjk^{cnull} (Figura 34D,F).

A expressão do gene Nov (*nephroblastoma overexpressed gene*) foi observada em agrupamentos celulares (clusters) restritos à região mais proximal, tanto no epitélio como no mesênquima de explantes pulmonares cultivados sob condição controle (Figura 35A). Em explantes tratados com DAPT, entretanto, detectamos clusters celulares positivos para Nov não apenas em regiões proximais, mas também nas porções mais distais (Figura 35B, seta branca), sendo que estes foram bem mais evidentes (Figura 35B, setas vermelhas) quando comparados com clusters Nov-positivos presentes no pulmão controle (Figura 35A).

Clusters celulares positivos para Nov em explantes pulmonares cultivados (Figura 35A-B), nos fez questionar se estas células correspondiam a células neuroendócrinas (NE), as quais também se organizam em forma de clusters celulares ao longo do epitélio pulmonar (Figura 19A).

Ensaios de dupla marcação para Nov (hibridização *in situ*) e para Mash1 (fator de transcrição essencial à diferenciação de células NE – imunohistoquímica),

revelaram uma grande sobreposição entre células Nov-positivas (azul) e Mash1-positivas (marrom), tanto aos 18.5 (Figura 35C-D) como aos 14.5 dpc (Figura 35E-F), em pulmões controle e mutantes *Rbpjk^{cnull}*.

Estes dados sugeriram que *Btnl9* e *Nov* correspondem, possivelmente, a marcadores putativos de linhagens pulmonares secretoras e neuroendócrinas, respectivamente.

Figura 34 - Btnl9

(A-B) Hibridização *in situ* para Btnl9 em explantes pulmonares cultivados em condição controle (A) e submetidos ao tratamento com DAPT (B). Btnl9 é expresso de forma extremamente difusa no epitélio e mesênquima do explante controle (A, seta e asterisco, respectivamente). O tratamento com DAPT (B) reduziu significativamente os níveis de Btnl9, tanto no epitélio (seta) como no mesênquima (asterisco). **(C,G)** Hibridização *in situ* para Btnl9 em pulmões controle (C,E,G) e Rbpjk^{null} (D,F) aos 18.5 dpc. Fortes níveis de expressão para Btnl9 foram detectados exclusivamente no epitélio de pulmões controle (C,E,G, observe o padrão pontual de expressão, em relação ao padrão observado em A). A expressão de Btnl9 foi abolida em pulmões de Rbpjk^{null} (D,F).

FONTE: Vasconcelos, 2011.

Figura 35- Nov

Hibridização *in situ* para Nov em explantes pulmonares cultivados em condição controle (A) e submetidos ao tratamento com DAPT (B). No controle (A), Nov foi detectado em clusters celulares epiteliais (seta vermelha) e mesenquimais (seta branca) restritos à região mais proximal do explante (área tracejada). No explante tratado com DAPT, estes agrupamentos celulares foram detectados não apenas na região proximal, mas também em áreas mais distais, sendo do observados na camada mesenquimal (setas brancas) e epitelial (setas vermelhas). (C-F) Experimentos de dupla-marcação (em azul hibridização *in situ* para Nov, seguida de imunohistoquímica para Mash1, em marrom - marcador de células neuroendócrinas) em pulmões controle e *Rbpjk^{cnull}* aos 18.5 dpc (C,D), e aos 14.5 dpc (E,F). Exemplos de sobreposição entre a expressão de Nov e Mash1 estão indicados por setas.

FONTE: Vasconcelos, 2011.

Tabela 2 – Genes subexpressos em Pofut1^{cnul}

Gene	adj.P.Val.	FC	Gene	adj.P.Val.	FC
Scgb1a1	2.9E-05	-37.52	Cst6	0.041	-1.31
Scgb3a2	8.1E-05	-16.40	Grhl1	0.031	-1.30
Cyp2f2	7.8E-06	-4.38	Cntnap3	0.046	-1.30
Chad	2.8E-03	-3.21	Crispld2	0.031	-1.30
Gabrp	1.7E-04	-2.87	Slc6a2	0.023	-1.30
Hp	1.7E-04	-2.83	Avpr2	0.042	-1.30
Lrrc26	5.6E-04	-2.50	EG225457	0.046	-1.30
Krt15	1.7E-04	-2.29	Ucn3	0.049	-1.30
Cbr2	1.7E-04	-2.21	Taar4	0.046	-1.30
Upk3a	5.6E-04	-2.05	Gm1587	0.045	-1.29
Pnliprp1	1.0E-03	-1.99	EG667375	0.045	-1.28
5330417C22Rik	5.9E-04	-1.98	Mbd3l1	0.047	-1.28
Gsta3	2.0E-02	-1.58	Acs1l	0.047	-1.28
Cyp1b1	5.9E-03	-1.54	EG330513	0.049	-1.27
Igsf1	2.0E-03	-1.54	EG668539	0.042	-1.27
Lypd2	1.7E-02	-1.52	Defa-ps1 // Defa-ps1	0.046	-1.27
Olfr654	8.7E-03	-1.51	OTTMUSG0000002281	0.047	-1.26
Olfr1489	3.2E-02	-1.49	BC050777	0.039	-1.26
Cldn10	4.8E-02	-1.49	Tacr2	0.043	-1.26
Atp6v1b1	7.7E-03	-1.46	Chrna4	0.045	-1.26
1700055N04Rik	4.9E-03	-1.45	Cckar	0.045	-1.25
Ehf	1.5E-02	-1.44	Aqp4	0.037	-1.25
Dapk2	6.7E-03	-1.44	Asb18	0.042	-1.24
Wfdc2	4.9E-03	-1.44	1700125F08Rik	0.046	-1.23
4932441B19Rik	5.3E-03	-1.43			
Lgals12	1.6E-02	-1.43			
EG544710	0.02	-1.43			
Trf	0.006	-1.43			
Ifnab	0.005	-1.42			
Itga7	0.014	-1.41			
EG668063	0.011	-1.40			
Cyp4a10	0.037	-1.39			
Trim52	0.039	-1.39			
Prom2	0.049	-1.39			
Htra1	0.009	-1.38			
Mgat3	0.006	-1.38			
Trpc4	0.006	-1.37			
Hmcn1	0.049	-1.37			
Myh11	0.016	-1.37			
Olfr670	0.027	-1.37			
Selenbp1	0.011	-1.35			
Actg2	0.049	-1.35			
Sostdc1	0.024	-1.35			
ENSMUSG00000055440	0.019	-1.34			
Kcnk2	0.013	-1.33			
Zfp36l3	0.011	-1.33			
Rgs6	0.028	-1.32			
Selenbp2	0.027	-1.32			

FONTE: Vasconcelos, 2011.

Tabela 3 – Genes superexpressos em Pofut1^{cnul}

Gene	adj.P.Val.	FC	Gene	adj.P.Val.	FC
Spef2	0.001	2.43	lqcg	0.003	1.86
Lrrc34	0.001	2.36	EG636104	0.001	1.85
D19Erttd652e	0.001	2.30	1700026D08Rik	0.001	1.84
Efcab1	0.001	2.23	Zfp474	0.001	1.84
ENSMUSG00000071392	0.000	2.22	1700094D03Rik	0.001	1.84
Mt2	0.001	2.19	Dnahc12	0.001	1.84
Dnahc3	0.002	2.17	4930529M08Rik	0.001	1.84
A430083B19Rik	0.006	2.12	lqub	0.002	1.83
Dnahc7l	0.001	2.11	Bhlhe41	0.011	1.83
Rsph10b2	0.001	2.11	Tppp3	0.001	1.83
Wdr16	0.001	2.10	Cmb1	0.012	1.82
Agr3	0.004	2.10	Ak7	0.002	1.82
4930485B16Rik	0.000	2.10	4932425I24Rik	0.001	1.81
Dnahc6	0.000	2.09	LOC636082	0.002	1.81
Meig1	0.002	2.09	Ttc29	0.001	1.81
4833427G06Rik	0.017	2.03	Mlf1	0.002	1.81
Nme5	0.001	2.03	Armc4	0.002	1.81
1700007K13Rik	0.001	2.02	9130014G24Rik	0.003	1.80
1700007G11Rik	0.001	2.00	4933404M02Rik	0.001	1.79
Ppil6	0.001	2.00	Ptprz1	0.011	1.79
4933434I06Rik	0.003	1.99	Mak	0.004	1.79
1700028P14Rik	0.003	1.98	Ccdc39	0.001	1.78
Rsph1	0.001	1.97	Spag6	0.001	1.78
Hdc	0.007	1.97	Lrrc23	0.001	1.78
Ccdc113	0.001	1.97	5033413D22Rik	0.001	1.78
Spata18	0.001	1.96	OTTMUSG00000005148	0.015	1.77
Rshl3	0.001	1.95	Efhh	0.011	1.77
Lrriq1	0.001	1.95	Ccdc153	0.001	1.77
Cetn4	0.001	1.95	Pon1	0.005	1.77
Akap14	0.001	1.94	AU021034	0.001	1.77
E230019M04Rik	0.001	1.93	1110049B09Rik	0.001	1.76
Gm281	0.001	1.93	Txndc6	0.001	1.75
E230008N13Rik	0.001	1.93	Il33	0.009	1.75
Dnahc12 // Asb14	0.001	1.93	A330021E22Rik	0.001	1.75
Kcnrg	0.001	1.92	Ysk4	0.001	1.75
Cdkl4	0.002	1.92	Olfr171	0.041	1.75
1700003M02Rik	0.001	1.91	Dnahc5	0.001	1.72
E030011K20Rik	0.001	1.91	4930451C15Rik	0.001	1.71
Lrrc6	0.001	1.91	Spa17	0.009	1.71
Mx2	0.032	1.90	Gm221	0.002	1.71
Capsl	0.001	1.89	Ccdc146	0.002	1.70
3100002J23Rik	0.001	1.87	1700016K19Rik	0.011	1.70
Dnali1	0.001	1.87	Stk33	0.002	1.69
633979	0.001	1.87	Gm70	0.001	1.68
Mdh1b	0.001	1.87	Asb14	0.005	1.68
AK129341	0.007	1.86	Wdr63	0.001	1.68

Continua

Tabela 3 – Genes superexpressos em Pofut1^{cnul}

Continuação					
Gene	adj.P.Val.	FC	Gene	adj.P.Val.	FC
Caps2	0.028	1.67	Lrguk	0.001	1.58
RP23-233B9.8	0.002	1.67	Agbl2	0.001	1.58
Gm216	0.005	1.67	Vwa3a	0.003	1.58
Ankrd42	0.002	1.67	Lrrc46	0.001	1.58
Tctex1d2	0.042	1.67	6030429G01Rik	0.002	1.58
Wdr78	0.001	1.67	Mt1	0.007	1.58
Spag17	0.013	1.67	Ccdc81	0.005	1.58
Nek5	0.001	1.66	Efhc1	0.001	1.58
Ttc18	0.001	1.66	Dmkn	0.002	1.57
Fam154b	0.001	1.66	Dusp18	0.003	1.57
Dynlrb2	0.005	1.65	1190002A17Rik	0.021	1.57
Dnahc9	0.001	1.65	Efhc2	0.003	1.57
Lrrc48	0.002	1.65	Fank1	0.002	1.57
Tekt2	0.003	1.64	Kif9	0.002	1.56
4933430H15Rik	0.003	1.64	ENSMUSG00000068790	0.010	1.56
Syt10	0.001	1.64	Ccdc135	0.003	1.56
Ddo	0.001	1.63	Kcnmb2	0.001	1.56
Hspa4l	0.002	1.63	Tmem107	0.005	1.56
Sptlc3	0.003	1.63	LOC100046859	0.011	1.55
Hydin	0.001	1.63	1700027N10Rik	0.006	1.55
4930562C15Rik	0.007	1.63	Cyp2b10	0.022	1.55
2610028H24Rik	0.006	1.63	4930588N13Rik	0.017	1.55
Kif27	0.001	1.63	Dnajb13	0.011	1.55
Tsnaxip1	0.001	1.63	Dnahc7a	0.002	1.55
Spata17	0.001	1.63	Rtdr1	0.002	1.55
Rgs22	0.002	1.62	Calml4	0.009	1.55
Nek11	0.002	1.62	Ccdc67	0.004	1.55
Wdr69	0.016	1.62	Rp1h	0.031	1.55
Gm626	0.003	1.62	BC051019	0.011	1.54
Lrrc67	0.012	1.62	Fam81b	0.004	1.53
Zmynd10	0.002	1.61	1700013F07Rik	0.003	1.53
Ankrd45	0.011	1.61	1700041C02Rik	0.003	1.53
Elmod1	0.006	1.61	Ccdc96	0.008	1.53
Zbbx	0.013	1.61	Ccna1	0.002	1.52
Armc3	0.001	1.60	Ncrna00166	0.028	1.52
1700040L02Rik	0.001	1.60	Ttc21a	0.003	1.52
Ccdc108	0.002	1.60	1700024G13Rik	0.008	1.52
Cyp2s1	0.002	1.59	1700086L19Rik	0.007	1.52
9230110C19Rik	0.012	1.59	Wdr66	0.003	1.52
Ccdc19	0.005	1.59	Ankfn1	0.004	1.51
2010015L04Rik	0.002	1.59	Traf3ip1	0.003	1.51
4930455F23Rik	0.002	1.59	Gm166	0.002	1.51
Iqca	0.003	1.59	Fam161a	0.001	1.50
Lrrc9	0.001	1.59	Ttll6	0.003	1.50
1700027A23Rik	0.005	1.59	1700019L03Rik	0.011	1.50
Odf3b	0.002	1.59	1110032A04Rik	0.023	1.49

Continua

Tabela 3 – Genes superexpressos em Pofut1^{cnul}

Continuação					
Gene	adj.P.Val.	FC	Gene	adj.P.Val.	FC
Zfp354b	0.041	1.49	OTTMUSG00000010694	0.041	1.41
Tekt4	0.002	1.49	Dcdc5	0.025	1.41
Fsip1	0.003	1.49	Fbxo36	0.008	1.41
Ift74	0.039	1.49	Cep290	0.007	1.41
Ccdc151	0.002	1.49	Fam166b	0.041	1.41
Dydc1	0.010	1.48	Hsp90aa1	0.033	1.41
Ubxn11	0.007	1.48	Ttc12	0.012	1.41
4930504H06Rik	0.024	1.48	Spag8	0.005	1.41
Tsga10	0.011	1.48	1700012B09Rik	0.008	1.40
Wdr93	0.014	1.48	Ccdc65	0.025	1.40
Morn3	0.006	1.48	Ccdc150	0.006	1.40
Bbox1	0.036	1.48	Dnahc1	0.012	1.40
1700009P17Rik	0.008	1.47	Kif6	0.010	1.40
Dnahc2	0.005	1.47	BC060267	0.017	1.40
Bbs5	0.021	1.47	Hspa2	0.013	1.40
Ms4a4c	0.005	1.46	Ccdc114	0.024	1.40
Mns1	0.011	1.46	Fam46a	0.032	1.40
Tcte1	0.003	1.46	Syt5	0.024	1.39
Fhad1	0.010	1.46	2900006K08Rik	0.020	1.39
Tm4sf1	0.032	1.46	Dnaic1	0.038	1.39
Dnahc11	0.004	1.45	Pih1d2	0.006	1.39
1700003E16Rik	0.005	1.45	Ckmt1	0.009	1.39
Dync2h1	0.005	1.45	Ear1	0.042	1.38
Dnahc7b	0.028	1.45	Armc2	0.011	1.38
Prrg4	0.004	1.44	Ulk4	0.006	1.38
Rpgr	0.026	1.44	Tmem67	0.041	1.38
Myb	0.011	1.44	Clec4n	0.031	1.37
6430537H07Rik	0.032	1.44	Tubb2c	0.027	1.37
Ccdc11	0.046	1.43	Gpr98	0.020	1.37
Casc1	0.004	1.43	Cdkl2	0.033	1.37
Spag16	0.008	1.43	4430402I18Rik	0.017	1.37
Cetn2	0.009	1.43	Rage	0.007	1.37
P2rx6	0.004	1.43	OTTMUSG00000008594	0.041	1.37
Ccdc60	0.007	1.43	4932418E24Rik	0.034	1.37
6330439K17Rik	0.013	1.43	Ccdc40	0.045	1.37
1110017D15Rik	0.003	1.43	Ttll3	0.047	1.37
Dnahc10	0.047	1.43	Wtap	0.047	1.36
Ttc26	0.017	1.42	1600029D21Rik	0.017	1.36
Plch1	0.036	1.42	Fam81a	0.009	1.36
Gm1574	0.009	1.42	4932411E22Rik	0.049	1.36
1700029J07Rik	0.003	1.42	9330101J02Rik	0.020	1.36
1500011H22Rik	0.011	1.42	6820408C15Rik	0.026	1.36
E130009J12Rik	0.011	1.42	Ttc16	0.038	1.35
Lrtomt	0.003	1.42	Lrrc36	0.028	1.35
Anxa8	0.007	1.41	Fam179a	0.009	1.35
Foxj1	0.016	1.41	1810007P19Rik	0.018	1.35

Continua

Tabela 3 – Genes superexpressos em Pofut1^{cnull}

Continuação		
Gene	adj.P.Val.	FC
Elof1	0.011	1.34
9130221D24Rik	0.040	1.34
Sqle	0.038	1.34
FONTE: Vasconcelos, 2011. Conclusão		

Tabela 4 – Genes subexpressos em Rbpjk^{cnul}

Gene	adj.P.Val	FC
Scgb1a1	0.002	-35.46
Scgb3a2	0.001	-14.89
Reg3g	0.003	-8.67
Cyp2f2	0.002	-4.07
Krt15	0.002	-2.88
Chad	0.002	-2.66
Hp	0.002	-2.53
Cbr2	0.008	-2.42
Gabrp	0.008	-2.25
Lrrc26	0.002	-2.13
Upk3a	0.002	-1.97
Fras1	0.005	-1.74
Scgb3a1	0.004	-1.63
Lypd2	0.026	-1.51
Gsta3	0.014	-1.46
Muc5b	0.020	-1.41
Igsf1	0.018	-1.40
Tas2r130	0.032	-1.35
U46068	0.045	-1.34
Acsm1	0.037	-1.34
Ccdc129	0.038	-1.33

FONTE: Vasconcelos, 2011.

Tabela 5– Genes superexpressos em Rbpjk^{cnull}

Gene	adj.P.Val.	FC	Gene	adj.P.Val.	FC
Kcnrg	0.005	2.66	Cdkl4	0.002	2.06
Dnahc7l	0.002	2.61	Tekt4	0.003	2.05
Npffr2	0.002	2.61	2010001K21Rik	0.002	2.04
D19Ert652e	0.003	2.57	Dnali1	0.002	2.04
Dnahc12 // Asb14	0.002	2.46	Txndc6	0.002	2.03
Lrrc6	0.002	2.44	Fam154b	0.014	2.03
Dnahc3	0.004	2.40	1700026D08Rik	0.004	2.03
Wdr16	0.002	2.38	Ttc29	0.002	2.03
Spata18	0.002	2.37	A330021E22Rik	0.026	2.03
1700007K13Rik	0.002	2.36	Ccdc39	0.004	2.03
Rshl3	0.002	2.36	Mdh1b	0.005	2.03
1700028P14Rik	0.002	2.35	Dnahc7a	0.003	2.02
Cetn4	0.005	2.34	2610028H24Rik	0.002	2.01
Spef2	0.003	2.33	Dnahc9	0.004	2.01
Ccdc153	0.002	2.33	Ttc18	0.003	2.01
633979	0.002	2.30	1700007G11Rik	0.002	2.00
AU021034	0.003	2.30	AK129341	0.045	2.00
4933434I06Rik	0.002	2.27	Cyp2s1	0.002	1.99
Zfp474	0.002	2.26	Vwa3a	0.003	1.99
Dnahc12	0.002	2.26	Agr3	0.008	1.99
4930485B16Rik	0.002	2.24	Mt2	0.003	1.97
lqub	0.002	2.23	Akap14	0.002	1.97
Gm281	0.046	2.22	Stk33	0.016	1.97
1700003M02Rik	0.003	2.22	3100002J23Rik	0.002	1.97
Dnahc6	0.003	2.21	Lrriq1	0.002	1.96
Lrrc34	0.006	2.20	Spag6	0.002	1.96
4933404M02Rik	0.003	2.20	Tekt2	0.003	1.95
Ak7	0.002	2.19	ENSMUSG00000071392	0.002	1.95
Capsl	0.003	2.19	5033413D22Rik	0.016	1.94
1110049B09Rik	0.003	2.18	Fam81b	0.003	1.94
Rsph1	0.002	2.17	Wdr63	0.002	1.94
Nme5	0.003	2.17	Nek11	0.002	1.93
Efcab1	0.002	2.17	Mak	0.002	1.92
RP23-233B9.8	0.003	2.14	Asb14	0.013	1.92
A430083B19Rik	0.038	2.13	Lrrc48	0.004	1.91
9130014G24Rik	0.003	2.13	Ccdc113	0.007	1.91
Rgs22	0.008	2.10	Lgals3bp	0.038	1.90
Dnahc5	0.002	2.10	1700094D03Rik	0.008	1.90
Ccdc146	0.003	2.09	BC051019	0.002	1.90
4833427G06Rik	0.007	2.08	Mlf1	0.003	1.89
Ppil6	0.035	2.08	4932425I24Rik	0.003	1.89
Tppp3	0.002	2.08	Fam161a	0.005	1.88
lqcg	0.004	2.08	Acox2	0.011	1.87
E030011K20Rik	0.010	2.07	P2rx6	0.002	1.87
Spag17	0.002	2.07	Ccdc150	0.016	1.86
4930451C15Rik	0.003	2.07	Ysk4	0.013	1.86

Continua

Tabela 5 – Genes superexpressos em Rbpjk^{cnull}

			Continuação		
Gene	adj.P.Val.	FC	Gene	adj.P.Val.	FC
Elmod1	0.002	1.86	4930529M08Rik	0.006	1.69
Lrrc23	0.010	1.86	Nek10	0.019	1.69
Gm221	0.005	1.85	Hspa4l	0.016	1.69
Armc4	0.011	1.85	LOC236604	0.029	1.68
Gm216	0.014	1.85	9330101J02Rik	0.003	1.68
Dynlrb2	0.004	1.84	1700029J07Rik	0.018	1.67
Odf3b	0.005	1.82	2900006K08Rik	0.016	1.67
Efhc1	0.003	1.81	Ccdc151	0.010	1.67
Cmb1	0.004	1.81	1700013F07Rik	0.018	1.67
OTTMUSG00000005148	0.041	1.81	1700003E16Rik	0.014	1.66
Ddo	0.011	1.80	Rtdr1	0.036	1.66
Rsph10b2	0.020	1.80	Spata17	0.003	1.66
Ccdc108	0.004	1.80	Ncrna00166	0.018	1.65
Agbl2	0.011	1.79	Lrrc46	0.005	1.65
Ttc21a	0.006	1.79	Dnaic1	0.011	1.65
Hydin	0.008	1.79	Gm626	0.018	1.65
Zbbx	0.004	1.77	Traf3ip1	0.015	1.65
OTTMUSG00000008594	0.043	1.77	1700027A23Rik	0.042	1.65
Wdr78	0.003	1.77	Wdr66	0.012	1.65
Armc3	0.003	1.77	1190002A17Rik	0.003	1.65
Kif9	0.003	1.76	1700012B09Rik	0.033	1.64
Spa17	0.018	1.76	Syt10	0.024	1.63
Ttc12	0.006	1.76	Dcdc5	0.042	1.63
Nek5	0.002	1.75	Ccdc60	0.043	1.63
Gm1574	0.004	1.74	Dnaic2	0.004	1.63
Ccdc81	0.031	1.74	Pacrg	0.009	1.63
4930504H06Rik	0.038	1.73	Dmkn	0.011	1.63
Anxa8	0.004	1.73	Ccdc11	0.010	1.63
Calml4	0.007	1.73	Pla2g4a	0.004	1.62
4933430H15Rik	0.009	1.73	Pih1d2	0.007	1.62
lqca	0.002	1.72	Efhc2	0.034	1.62
6030429G01Rik	0.004	1.72	Dnahc7b	0.007	1.62
Syt5	0.003	1.72	1700009P17Rik	0.007	1.62
Lrrc9	0.005	1.72	OTTMUSG00000008003	0.046	1.61
Gm70	0.009	1.72	Wdr93	0.037	1.61
Fank1	0.014	1.71	4430402I18Rik	0.003	1.61
1700041C02Rik	0.009	1.71	4932411E22Rik	0.024	1.61
Spag16	0.004	1.71	Fsip1	0.008	1.60
Gm1381	0.011	1.71	2010015L04Rik	0.045	1.60
Gm166	0.003	1.71	Bcas1	0.045	1.60
4930588N13Rik	0.047	1.70	1700027N10Rik	0.024	1.60
Dnajb13	0.004	1.70	Ttc25	0.006	1.60
Ankrd42	0.002	1.70	4930455F23Rik	0.004	1.59
Kif27	0.006	1.70	Sptlc3	0.005	1.59
1700001L19Rik	0.032	1.70	1700040L02Rik	0.019	1.59
E230008N13Rik	0.011	1.69	Ankrd45	0.010	1.59

Continua

Tabela 5 – Genes superexpressos em *Rbpjk^{cnull}*

			Continuação		
Gene	adj.P.Val.	FC	Gene	adj.P.Val.	FC
Fam92b	0.020	1.59	lft81	0.040	1.43
2210408I21Rik	0.014	1.58	4932418E24Rik	0.027	1.42
Dusp18	0.013	1.58	1810020O05Rik	0.043	1.42
1700016K19Rik	0.007	1.58	Arhgdig	0.027	1.42
1110032A04Rik	0.007	1.58	Fam179a	0.023	1.42
1700086L19Rik	0.011	1.58	Adck4	0.038	1.41
Dyx1c1	0.004	1.58	Rab36	0.016	1.40
Lrtomt	0.039	1.58	1810007P19Rik	0.040	1.40
Ccdc96	0.037	1.58	Pnma1	0.033	1.40
Tm4sf1	0.006	1.57	Tcte1	0.029	1.40
Ccdc135	0.013	1.56	Dnahc1	0.014	1.39
Casc1	0.005	1.56	Ccdc87	0.019	1.39
E230019M04Rik	0.020	1.54	Gm973	0.042	1.39
6430537H07Rik	0.024	1.54	Rage	0.045	1.39
Dnahc2	0.011	1.54	Tctex1d4	0.037	1.39
Tsga10	0.031	1.54	2410004P03Rik	0.046	1.38
Ulk4	0.008	1.53	Sorbs2	0.042	1.37
1700019L03Rik	0.015	1.52	Adam22	0.029	1.37
Dnahc10	0.014	1.52	Elof1	0.021	1.36
Ncrna00082	0.017	1.52	Tmprss2	0.033	1.36
4930505A04Rik	0.048	1.51	Slc1a4	0.031	1.36
Mapk15	0.012	1.51	Ccdc13	0.037	1.36
Ttc16	0.008	1.51	Tekt1	0.043	1.35
Anxa1	0.016	1.51	Pcyt1b	0.034	1.35
Kif6	0.013	1.51	Myb	0.049	1.35
Ccdc78	0.018	1.50	Ttc30a2	0.043	1.35
C030017K20Rik	0.046	1.50	Wdr54	0.043	1.34
Clic6	0.008	1.50	Tubb2c	0.032	1.34
Sec14l3	0.046	1.50	1700088E04Rik	0.028	1.33
Dlec1	0.049	1.50	Adam28	0.039	1.32
Ccdc65	0.008	1.49	Rab15	0.047	1.29
Morn3	0.020	1.49			
Lrrc36	0.006	1.49			
Ccdc40	0.014	1.49			
Foxj1	0.013	1.48			
Glo1	0.013	1.48			
1110017D15Rik	0.016	1.47			
Fhad1	0.039	1.47			
1700024G13Rik	0.045	1.46			
Ttll3	0.018	1.46			
Dnahc11	0.029	1.45			
4930579J09Rik	0.020	1.45			
Sord	0.008	1.45			
Gm941	0.043	1.44			
Dync2h1	0.029	1.44			
6330439K17Rik	0.038	1.43			

FONTE: Vasconcelos, 2011.

Conclusão

Tabela 6 – Genes subexpressos em explantes pulmonares tratados com DAPT

Gene	adj.P.Val	FC	Gene	adj.P.Val	FC
Abcc9	0.000	-4.52	Nrarp	0.030	-1.71
Igfbp3	0.000	-3.94	Cpa2	0.005	-1.70
Heyl	0.000	-3.88	Gucy1b3	0.001	-1.70
Scgb3a2	0.003	-3.57	Fosb	0.002	-1.69
Gm131	0.008	-3.21	5730424H11Rik	0.045	-1.69
Kcnj8	0.000	-3.17	Klrb1b	0.014	-1.69
Aqp1	0.002	-3.16	BC030870	0.043	-1.69
LOC667127	0.011	-2.95	1110032A04Rik	0.006	-1.68
Pdgfrb	0.000	-2.84	Aspn	0.042	-1.68
Tek	0.000	-2.84	Dusp5	0.010	-1.68
Btnl9	0.000	-2.68	OTTMUSG00000021867	0.021	-1.67
Sat1	0.000	-2.47	Ptprb	0.000	-1.66
Kcnq5	0.013	-2.39	Hp	0.034	-1.66
3632413A11Rik	0.014	-2.38	Egr1	0.011	-1.66
Tnc	0.000	-2.35	Flt1	0.000	-1.66
Ssxb8	0.027	-2.35	Tmtc1	0.040	-1.65
Actg2	0.011	-2.31	Tslp	0.028	-1.64
Casq1	0.007	-2.22	Slc16a4	0.031	-1.64
Gja5	0.003	-2.21	Sema3g	0.003	-1.64
Abcb1a	0.000	-2.11	Nr4a3	0.009	-1.62
Sprr2b	0.017	-2.11	6330522J23Rik	0.050	-1.61
Mmrn1	0.003	-2.08	Asah3l	0.001	-1.60
BC051077	0.031	-2.07	Cldn8	0.010	-1.60
8430408G22Rik	0.019	-2.03	A830043J08Rik	0.002	-1.56
Cdh4	0.040	-2.00	Jun	0.001	-1.56
Ebf1	0.000	-1.99	OTTMUSG00000013918	0.007	-1.56
Hey1	0.000	-1.99	Tm4sf1	0.007	-1.56
5330417C22Rik	0.000	-1.98	LOC100048211	0.045	-1.55
Gem	0.001	-1.95	Aldh1a7	0.002	-1.54
Gabrb2	0.002	-1.94	Sox2	0.023	-1.54
LOC100039668	0.044	-1.93	4930522P08Rik	0.038	-1.53
Cd109	0.001	-1.91	Fap	0.008	-1.53
Postn	0.003	-1.91	Btg2	0.003	-1.52
Fos	0.003	-1.90	Acsn1	0.001	-1.52
Cnn1	0.005	-1.88	C130079G13Rik	0.034	-1.51
Kcnj2	0.001	-1.86	A930009N24	0.008	-1.51
Dmp1	0.028	-1.84	Pdzd2	0.002	-1.51
Cpa1	0.004	-1.83	Afap1l2	0.003	-1.50
Rgs5	0.007	-1.82	Ces3	0.033	-1.50
Cckar	0.001	-1.80	Kcnj13	0.032	-1.49
Aldh1a1	0.000	-1.78	AI504432	0.021	-1.49
Myh11	0.028	-1.78	Dnm3os	0.003	-1.49
Trpc6	0.000	-1.76	Tgfb1	0.010	-1.48
Nr4a1	0.002	-1.76	Itih5	0.048	-1.47
1700023H06Rik	0.032	-1.76	Bmpr1b	0.004	-1.47
Rassf9	0.002	-1.75	Gm606	0.012	-1.47
4930401B06Rik	0.033	-1.73	Tagln	0.041	-1.46
Nusap1	0.010	-1.73	Foxs1	0.004	-1.46

Continua

Tabela 6 – Genes subexpressos em explantes pulmonares tratados com DAPT

			Continuação		
Gene	adj.P.Val	FC	Gene	adj.P.Val	FC
Ptp4a3	0.039	-1.46	Slc24a3	0.004	-1.36
Nt5e	0.004	-1.46	ENSMUSG00000075230	0.030	-1.36
Grp	0.045	-1.45	Serpine2	0.009	-1.36
1700010H22Rik	0.030	-1.45	Scnn1b	0.020	-1.36
Dusp8	0.013	-1.44	Slc45a4	0.009	-1.36
Plat	0.011	-1.44	Smtn	0.007	-1.35
Gna14	0.031	-1.44	Pstpip2	0.045	-1.35
Nr4a2	0.010	-1.44	Vill	0.007	-1.35
Nap115	0.029	-1.44	Grhl1	0.011	-1.35
Mmp13	0.030	-1.43	Cdh2	0.007	-1.34
Igsf9b	0.016	-1.43	Nfkbia	0.039	-1.34
9030622O22Rik	0.016	-1.43	Hey2	0.030	-1.33
Lmcd1	0.038	-1.43	E430016L07Rik	0.035	-1.33
Adcy4	0.023	-1.43	Egr2	0.029	-1.33
Ecm2	0.042	-1.42	Myom1	0.046	-1.32
Egfr	0.009	-1.42	Mme	0.028	-1.32
Nfkbiz	0.009	-1.41	Adamts1	0.008	-1.32
Des	0.040	-1.41	Tnfrsf21	0.025	-1.32
2810454H06Rik	0.039	-1.40	1700001L05Rik	0.026	-1.32
Kcna2	0.008	-1.40	Stk32a	0.028	-1.32
Cd55	0.025	-1.40	Hbb-y	0.038	-1.32
Adam28	0.028	-1.40	D1Ert471e	0.011	-1.32
Tspan33	0.028	-1.40	Gfra1	0.033	-1.32
Atp2b4	0.004	-1.40	Lgr5	0.008	-1.31
Iqgap2	0.018	-1.40	Bhlhb2	0.021	-1.31
Naalad2	0.018	-1.40	Kank4	0.015	-1.31
Txnip	0.035	-1.40	Zfp36l1	0.016	-1.31
Nostrin	0.004	-1.40	Sema7a	0.030	-1.30
Efna1	0.028	-1.40	Evi1	0.021	-1.30
Vwf	0.002	-1.39	Pde9a	0.014	-1.30
Cldn23	0.043	-1.39	Mical2	0.009	-1.30
Ldb2	0.005	-1.39	Cap2	0.015	-1.30
Stac	0.007	-1.39	Gstt3	0.048	-1.29
Gucy1a3	0.005	-1.39	1700054M17Rik	0.018	-1.29
Pdlim3	0.032	-1.39	Ntn1	0.033	-1.29
Ppp2r2b	0.014	-1.39	Hivep2	0.038	-1.28
Atf3	0.021	-1.39	Wif1	0.017	-1.28
Rgs4	0.026	-1.39	Sema3e	0.044	-1.28
Nos3	0.025	-1.38	Timp3	0.018	-1.28
Dkk2	0.004	-1.38	Pde5a	0.028	-1.27
D430015B01Rik	0.007	-1.38	Klf10	0.031	-1.27
Plekhg3	0.039	-1.38	Nr3c2	0.011	-1.27
Epas1	0.011	-1.37	4930431L04Rik	0.032	-1.27
Lama1	0.004	-1.37	Tbc1d30	0.048	-1.27
Itga1	0.011	-1.37	9030420J04Rik	0.030	-1.27
Mmrn2	0.015	-1.37	Col6a3	0.024	-1.27
C1qtnf1	0.039	-1.37	Plscr4	0.043	-1.27

Continua

Tabela 6 – Genes subexpressos em explantes pulmonares tratados com DAPT

Gene	Continuação	
	adj.P.Val	FC
Ehf	0.039	-1.27
Dock10	0.033	-1.26
A730069N07Rik	0.040	-1.26
Acs11	0.024	-1.26
Fbln5	0.029	-1.26
Micalcl	0.023	-1.26
BC034069	0.035	-1.26
Dpysl3	0.019	-1.26
Snf1lk	0.031	-1.25
Lrig1	0.047	-1.24
Six4	0.035	-1.24
Jag1	0.026	-1.24
Scnn1g	0.043	-1.23
Atp1b1	0.028	-1.23
Cdh6	0.032	-1.23
Dmd	0.023	-1.23
Stard13	0.031	-1.22
Gpr116	0.032	-1.22
Cgnl1	0.031	-1.22
Kcnc2	0.034	-1.21
Wscd1	0.036	-1.21
Pik3cg	0.043	-1.21
Elf5	0.029	-1.21
6330500D04Rik	0.034	-1.20
Kcnma1	0.045	-1.19
Akap6	0.040	-1.19
Tbc1d8	0.045	-1.19
Homer2	0.041	-1.18

FONTE: Vasconcelos, 2011. Conclusão

Tabela 7- Genes superexpressos em explantes pulmonares tratados com DAPT

Gene	adj.P.Val	FC	Gene	adj.P.Val	FC
Rspo2	0.006	3.61	Gimap4	0.030	1.59
EG628870	0.024	2.50	Olfr1100	0.017	1.59
Cubn	0.000	2.43	Itga4	0.007	1.59
Gpnmb	0.000	2.38	Mrc1	0.000	1.58
Lamp3	0.006	2.36	Chac1	0.009	1.58
Cxcl15	0.005	2.35	Serpinb9	0.012	1.57
A730075L09Rik	0.002	2.29	Lama3	0.003	1.57
Pf4	0.007	2.27	Adamts19	0.003	1.57
1110013H19Rik	0.026	2.25	Pde7b	0.007	1.57
Npffr2	0.000	2.21	Slco4c1	0.011	1.56
Clec4d	0.002	2.20	Rnf152	0.046	1.56
Gmfg	0.039	2.16	Pgc	0.032	1.55
4930556A17Rik	0.049	2.10	Gramd2	0.001	1.54
Pde2a	0.000	2.10	Mia2	0.033	1.54
Slc34a2	0.009	2.07	Arhgap18	0.008	1.53
Tmem154	0.000	1.98	F13a1	0.011	1.53
9430032N09Rik	0.028	1.96	Ptafr	0.039	1.51
Guca2a	0.033	1.93	E030002O03Rik	0.004	1.51
Slc38a3	0.002	1.92	Adarb1	0.001	1.51
EG545367	0.009	1.84	Col8a1	0.038	1.51
Pcsk1	0.001	1.83	Slco2a1	0.003	1.50
Scn7a	0.002	1.82	Abca6	0.001	1.50
Lalba	0.003	1.82	4930588A03Rik	0.046	1.50
A930023M06Rik	0.024	1.81	Clec1a	0.012	1.49
3110043A19Rik	0.048	1.80	1200002N14Rik	0.011	1.48
Npy1r	0.006	1.78	Saa3	0.025	1.48
Apln	0.026	1.74	Kdr	0.001	1.48
Emcn	0.008	1.73	Bmp5	0.002	1.48
Cd300lb	0.037	1.73	Kctd12b	0.010	1.47
Anpep	0.002	1.72	Daam2	0.002	1.47
Sftpb	0.023	1.72	Ccl9	0.016	1.47
Jarid1b	0.007	1.72	Mmp8	0.041	1.47
Olfr1303	0.032	1.70	9430028L06Rik	0.005	1.47
Slc7a3	0.020	1.70	Il1a	0.029	1.47
Dgkk	0.032	1.68	Slc26a9	0.005	1.46
Slc7a11	0.012	1.68	Cd84	0.008	1.46
Lrat	0.028	1.67	Scel	0.002	1.46
Igf2bp1	0.041	1.65	Sema3a	0.007	1.46
Slc27a6	0.002	1.65	Abi3bp	0.006	1.45
LOC100040649	0.048	1.64	Ccl6	0.026	1.45
Cpm	0.001	1.63	Slit2	0.010	1.45
Egfl6	0.023	1.63	Aldh1l2	0.021	1.45
Kcnk18	0.026	1.62	Sec14l2	0.002	1.44
Rbpjl	0.002	1.61	Acsl4	0.008	1.44
B230114P17Rik	0.027	1.61	Akap5	0.004	1.44
C3ar1	0.004	1.59	Rgs16	0.042	1.44

Continua

Tabela 7- Genes superexpressos em explantes pulmonares tratados com DAPT

			Continuação		
Gene	adj.P.Val	FC	Gene	adj.P.Val	FC
Cdh8	0.018	1.44	Lin7a	0.039	1.36
Adam4	0.025	1.44	Ttc9	0.019	1.36
Slc39a8	0.019	1.44	Hlf	0.012	1.36
Pcsk6	0.009	1.44	Mdga2	0.029	1.36
1810054D07Rik	0.020	1.43	Mfap3l	0.004	1.36
Chrm3	0.014	1.43	Angpt2	0.004	1.36
4930516E23Rik	0.034	1.43	Abca9	0.039	1.36
Cfi	0.035	1.42	Pthlh	0.038	1.36
Trim16	0.002	1.42	Tera	0.032	1.35
Abcd2	0.028	1.42	Lrp11	0.014	1.34
Fmo2	0.011	1.42	A530088I07Rik	0.018	1.34
Ccl3	0.031	1.42	Lxn	0.033	1.34
Gria2	0.014	1.42	Cdh10	0.026	1.34
Fabp4	0.018	1.42	Tmem106a	0.032	1.33
Lgals3	0.025	1.41	Ndph	0.019	1.33
Ampd3	0.006	1.41	Gprc5a	0.029	1.33
Cd36	0.001	1.41	Angpt1	0.011	1.32
Dach2	0.026	1.41	Lass3	0.009	1.32
Emr1	0.019	1.41	Nos2	0.005	1.32
Acss3	0.034	1.40	Nkx3-1	0.032	1.32
Ccdc85b	0.018	1.40	Kcna5	0.021	1.32
Pm20d1	0.027	1.40	Pcdh12	0.030	1.32
4933440J02Rik	0.027	1.39	B230380D07Rik	0.020	1.32
Rdh10	0.003	1.39	Mlstd1	0.032	1.32
Dmc1	0.040	1.39	Psat1	0.039	1.32
A930038C07Rik	0.033	1.39	Rasgrp3	0.021	1.31
Mmp19	0.034	1.39	Eil2	0.045	1.31
Agtrl1	0.020	1.39	Tmprss11d	0.048	1.31
Enpp2	0.028	1.38	Plek	0.031	1.31
Clca5	0.009	1.38	Ctsc	0.030	1.31
Bmper	0.012	1.38	Fgf2	0.007	1.31
Plxna4	0.002	1.38	Tgfb2	0.041	1.30
Man1a	0.007	1.38	Ptprz1	0.009	1.30
9030411M15Rik	0.011	1.38	Adamts12	0.033	1.30
Tlr13	0.046	1.38	Cyb5d1	0.028	1.30
ENSMUSG000000	0.028	1.38	Scd1	0.043	1.29
Lmo7	0.007	1.38	Abhd2	0.025	1.29
Lrrc8c	0.006	1.37	Tlcd1	0.028	1.29
Robo4	0.020	1.37	6430573F11Rik	0.033	1.29
Vldlr	0.028	1.37	Ikbke	0.049	1.28
Cbln3	0.032	1.37	Enpp3	0.032	1.28
Cd68	0.014	1.37	Ctnnd2	0.012	1.28
Vnn1	0.030	1.37	Arhgap20	0.046	1.28
EG224763	0.046	1.37	Prdm1	0.038	1.27
Enpep	0.028	1.36	Asns	0.019	1.27
Sh3bp5	0.012	1.36	Lrguk	0.046	1.26

Continua

Tabela 7- Genes superexpressos em explantes pulmonares tratados com DAPT

Gene	Continuação	
	adj.P.Val	FC
Fyb	0.027	1.26
Frem1	0.039	1.26
Galc	0.036	1.26
Ehd3	0.031	1.25
Abca3	0.014	1.25
Nid2	0.028	1.25
Col24a1	0.021	1.24
Dach1	0.043	1.24
Abca8b	0.031	1.24
Aldh9a1	0.048	1.24
Myo5b	0.038	1.23
Trpm3	0.014	1.23
Adam12	0.024	1.22
Nckap1l	0.029	1.22
Slc7a1	0.047	1.22
Tmem144	0.046	1.22
Soat1	0.016	1.22
Adam9	0.028	1.21
Gm149	0.039	1.20
Slc4a4	0.049	1.20
Rpa1	0.049	1.18

FONTE: Vasconcelos, 2011. Conclusão

5 DISCUSSÃO

5.1 O papel da sinalização Notch na diferenciação do epitélio pulmonar

Com este estudo geramos evidências, a partir de três modelos distintos, de que a sinalização Notch exerce um papel essencial no controle do número de células ciliadas e secretoras durante a diferenciação do epitélio pulmonar.

A perturbação da interação entre receptor-ligante em camundongos *Pofut1^{cnul}*, ou a inativação da via canônica da sinalização Notch em *Rbpjk^{cnul}*, resultou em um fenótipo extremamente semelhante, caracterizado pela ausência de células de Clara e excesso de células ciliadas ao longo da árvore brônquica. A presença das mesmas anormalidades em segmentos proximais de explantes pulmonares, nos quais a clivagem de Notch foi impedida pela ação de um inibidor de gama-secretase, corroborou a idéia de que os defeitos observados resultaram da inativação de Notch no epitélio pulmonar em desenvolvimento.

Adicionalmente, nossos dados suportam as conclusões de outros estudos que implicaram a sinalização Notch (mediada por Hes1), na restrição da diferenciação de células NE (Collins et al., 2004; Ito et al., 2000; Shan et al., 2007). O fenótipo descrito em nosso trabalho, entretanto, é mais severo e envolve múltiplas linhagens, dado que inativamos amplamente a via de sinalização Notch, incluindo alvos de Hes1.

O quão crucial é a sinalização Notch para induzir a diferenciação da linhagem secretora no pulmão em desenvolvimento? A presença de células positivas para *Scgb3a2* em pulmões de *Pofut1^{cnul}* nos estágios iniciais do desenvolvimento e a ausência das mesmas nos estágios mais tardios, sugeriu que precursores de células de Clara foram inicialmente especificados, mas não foram capazes de se diferenciar na ausência de Notch. Para confirmar se células positivas para *Scgb3a2* aos 14.5 dpc representam, de fato, precursores de células secretoras, seria necessário um estudo de mapeamento genético desta linhagem celular, o qual está além o escopo deste trabalho. Contudo, o aumento substancial na população de células ciliadas sem qualquer evidência de um aumento nos níveis de proliferação ou morte celular em nossos mutantes, suporta a idéia de que durante o desenvolvimento normal, Notch suprime, seletivamente, os programas de diferenciação de células ciliadas e NE em progenitores proximais, para permitir a diferenciação de células secretoras. Este modelo é consistente com estudos realizados em outros organismos, nos quais Notch desempenha um papel crucial no

balaço de diferentes destinos celulares (Deblandre et al., 1999; Hayes et al., 2007; Stubbs et al., 2006). Como por exemplo, estudos funcionais realizados em embriões de *Xenopus*, sugeriram que, inicialmente, todas as células ectodérmicas da camada que origina células ciliadas na epiderme, expressa um fator que instrui progenitores a se diferenciarem em células ciliadas. O papel de Notch neste caso, reside em silenciar este fator em tipos celulares que não devem se diferenciar em células ciliadas. Este processo parece envolver um mecanismo clássico de inibição lateral mediada por Notch, no qual a expressão transiente do ligante Delta seletivamente em precursores de células ciliadas, impede com que estas ativem Notch. Ao mesmo tempo, a ativação de Notch na células vizinha, promove a diferenciação de células não-ciliadas. A inativação da via canônica de Notch neste sistema aumenta, dramaticamente, o número de células ciliadas, assim como observamos em nossos mutantes. Em contrapartida, a ativação constitutiva de Notch na epiderme de *Xenopus* através da expressão de NICD (*Notch intracellular domain*), inibe a diferenciação de células ciliadas (Deblandre et al., 1999).

Evidências sobre um mecanismo muito semelhante ao descrito acima foram obtidas em estudos relacionados com o desenvolvimento renal de *zebrafish* e também com a diferenciação neuronal de *Xenopus*, sugerindo que o papel que Notch exerce no controle da diferenciação de células ciliadas, é altamente conservado (Wettstein et al., 1997; Liu et al., 2007).

Como estes achados associam-se ao pulmão de mamíferos? É interessante notar que o mecanismo geral de controle da diferenciação de células ciliadas na epiderme embrionária de *Xenopus* parece ser análogo ao mecanismo que descrevemos no epitélio pulmonar de camundongos. Em ambos os casos, a expressão do ligante em progenitores é associada ao fenótipo ciliado. Entretanto, nossos dados sugerem que Jag1 corresponde ao ligante implicado neste processo, ao invés de Delta.

A função de células de Clara ainda não é totalmente compreendida devido, em parte, à escassez de modelos experimentais adequados. Muito do que se sabe atualmente sobre o papel de células de Clara na homeostase pulmonar, provém da análise de camundongos deficientes para CC10. Estes animais parecem reproduzir os aspectos patológicos descritos em condições como a doença pulmonar crônica obstrutiva (DPCO), asma e fibrose cística (Stripp et al., 2002). Entretanto, este estudo teve CC10 como foco principal, não células de Clara.

Embora o foco de nosso estudo não esteja voltado aos aspectos do desenvolvimento pós-natal, acreditamos que os modelos genéticos Pofut oferece uma oportunidade ímpar para a investigação do impacto da ausência de células de Clara na homeostase pulmonar durante as primeiras semanas de vida. Em nossa análise, pulmões de Pofut1^{cnul} apresentaram evidências histológicas de danos epiteliais e de uma resposta adaptativa anormal do epitélio pulmonar à vida pós-natal. Uma característica marcante do epitélio deste mutante foi o achatamento de células epiteliais, o qual é observado também em alterações metaplásticas reportadas em pulmões danificados pelo tratamento com naftalina após a ablação de células de Clara (Rawlins e Hogan, 2006; Stripp et al., 1995). No modelo experimental de regeneração pulmonar pós-injúria pelo tratamento com naftalina, células metaplásticas derivadas de células ciliadas se proliferam ao redor das células de Clara que foram danificadas pela naftalina (células-alvo do tratamento com naftalina), para manter a integridade epitelial e eventualmente, reparar o tecido danificado (Park et al., 2006).

A análise de camundongos deficientes para CC10 demonstrou que a perda de CC10 por si mesma, resulta em danos epiteliais quando estes animais são submetidos ao tratamento com ozônio (Johnston et al., 1999).

Nós especulamos se a ausência de células de Clara em nossos mutantes resultam em alterações no epitélio e no fluido que o reveste, aumentando sua suscetibilidade a danos por agentes do meio-ambiente como o oxigênio.

Em conclusão, nosso estudo gerou consistentes evidências de que a sinalização Notch é essencial para balancear os diferentes tipos celulares presentes no epitélio pulmonar durante o desenvolvimento.

É importante mencionar ainda que o perfil de diferenciação epitelial pode ser profundamente alterado em casos de inflamação pulmonar crônica. Assim, é possível que alterações em Notch também exerçam um papel fundamental em respostas patológicas do epitélio respiratório em doenças como asma e DPCO. De acordo com esta hipótese, uma análise recente do transcriptoma em humanos demonstrou diferenças substanciais na expressão dos componentes de Notch associados com fumantes e com a DPCO (Tilley et al., 2009).

5.2 Microarray - sistema *in vivo*: Identificação de genes associados ao fenótipo ciliado e secretor

A caracterização do padrão de expressão de genes diferencialmente expressos em nossos modelos genéticos sugeriu que, genes subexpressos e superexpressos em nossos mutantes (em relação aos seus respectivos controles), representam marcadores putativos da linhagem secretora e ciliada do pulmão aos 18.5 dpc, respectivamente.

Os diversos padrões de expressão detectados entre genes associados ao fenótipo secretor indicaram que, durante o desenvolvimento normal, a regulação Notch-dependente da expressão gênica ocorre de forma diferencial ao longo do eixo próximo-distal do pulmão embrionário. Em outras palavras, é possível que a via de sinalização Notch atue de acordo com seus níveis de ativação ao longo do epitélio pulmonar, de modo a estabelecer diferenças genéticas que resultariam no estabelecimento de subpopulações de células secretoras pulmonares.

Um artigo publicado logo após a publicação de nossos achados (Guseh et al., 2009), demonstrou que a superexpressão de Notch no epitélio pulmonar resultou em um aumento no número de células secretoras caliciformes (produtoras de muco) no pulmão em desenvolvimento, sem alterar a proporção de células de Clara. Em nossos estudos, demonstramos que a inativação da sinalização Notch elimina células de Clara sem eliminar células caliciformes. Estes dados sugerem que diferentes níveis de ativação de Notch geram diferenças genéticas que culminam no estabelecimento de subtipos celulares da linhagem secretora (células secretoras de Clara x células secretoras caliciformes) durante o desenvolvimento pulmonar.

A grande heterogeneidade do padrão de expressão de genes associados ao fenótipo secretor não apenas suporta esta idéia mas também sugere que Notch participa dos processos de estabelecimento de subtipos secretores, ao regular o perfil de expressão gênica de genes-alvo envolvidos com o programa de diferenciação do fenótipo secretor.

A diversidade no padrão de expressão de genes associados ao fenótipo ciliado também sugeriu a existência, Notch-dependente, de subtipos celulares dentro da linhagem ciliada.

Os diferentes tipos de variações no perfil de expressão de genes superexpressos frente à inativação de Notch ressaltou a idéia de que esta via de sinalização atua de modo diferencial ao longo do eixo próximo-distal pulmonar.

Genes como *Mt2* e *Dnahc3*, por exemplo, marcaram, predominantemente, grupos de células proximais no pulmão controle. Em contraste, estas células se expandiram indiscriminadamente pelos domínios mais distais no pulmão mutante. Este achado nos fez questionar se pulmões de *Pofut1* e *Rbpjk* são formados apenas por células ciliadas proximais. A expressão do gene *Phtf1* reforçou esta idéia, pois se mostrou proximal-específica no pulmão controle, e completamente ectópica em pulmões mutantes. Se este fosse o caso, poderíamos inferir que a via de sinalização Notch é necessária para o estabelecimento de células ciliadas de caráter distal do pulmão em desenvolvimento.

Alternativamente, é ainda possível que a expansão dos domínios de expressão destes genes tenha refletido apenas o excesso de células ciliadas presente em nossos mutantes. Esta possibilidade foi bem exemplificada pelo padrão de expressão de *Myb*, gene que foi expresso amplamente no pulmão controle (regiões proximais e distais), e uniformemente em *Pofut1* e *Rbpjk*. Foi interessante observar, no entanto, que *Myb* não marcou todas as células *Foxj1*-positivas. Isso sugere, mais uma vez, que genes superexpressos (nos mutantes) em nosso microarray estão, possivelmente, marcando subpopulações de células ciliadas do pulmão embrionário.

5.2.1. Microarray - sistema *in vitro*

Em contraste com o que observamos nos experimentos de microarray com pulmões de mutantes *Pofut1* e *Rbpjk* (sistema *in vivo*), a maioria dos genes diferencialmente expressos em explantes pulmonares tratados com DAPT (em relação ao controle), apresentou-se como genes de expressão mesenquimal-específica.

O fato de que a inativação de Notch tenha ocorrido não apenas no epitélio mas também no mesênquima destes explantes, combinado com o papel que Notch desempenha no desenvolvimento vascular embrionário (Shi et al., 2005), justifica a perturbação do padrão de expressão de genes mesenquimais-específicos frente à inativação de Notch pelo tratamento com DAPT. Além disso, sabemos que este

tratamento resulta na expansão de estruturas distais de explantes pulmonares (Tsao et al., 2008, 8º parágrafo de 1.8.5), as quais apresentam abundante tecido mesenquimal (favorecendo, portanto, a super-representação de genes mesenquimais-específicos neste microarray).

Contudo, foi interessante encontrar neste microarray genes como Btl9 e Nov, expressos tanto no mesênquima como no epitélio em explantes pulmonares cultivados, porém restritos ao epitélio de pulmões aos 18.5 dpc.

A depleção de Btl9 em pulmões tratados com DAPT e em pulmões de mutantes aos 18.5 dpc, fez com que este gene fosse incluído em nossa lista de genes associados ao fenótipo secretor. De fato, seu padrão de expressão se assemelha ao padrão de expressão de genes como Hp e Cbr2, identificados como genes subexpressos em nossos mutantes pelo microarray do sistema *in vivo*.

A associação da expressão do gene Nov às células neuroendócrinas, revelou que nossa base de dados também tem potencial para a identificação de novos marcadores deste tipo celular.

Em resumo, concluímos que através da determinação de variações no padrão global de expressão gênica em resposta à ausência de Notch no epitélio pulmonar, adquirimos uma base de dados promissora à investigação dos programas genéticos que culminam no estabelecimento de linhagens celulares (ciliadas, secretoras e neuroendócrinas). A oportunidade de explorarmos o potencial desta plataforma neste contexto é de extrema relevância às linhas de pesquisa associadas ao desenvolvimento pulmonar, uma vez que, a quantidade limitada de marcadores atualmente disponíveis, tem dificultado a compreensão dos mecanismos de especificação e determinação de destinos celulares.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho nos permite concluir que:

- A inibição da sinalização Notch (mediada por ShhCre) resulta em anormalidades incompatíveis com a vida adulta;
- A sinalização Notch não é necessária para a indução do programa de diferenciação de progenitores pulmonares distais;
- A sinalização Notch é responsável em estabelecer uma distribuição balanceada entre os tipos celulares ciliados, secretores e neuroendócrinos do pulmão em desenvolvimento;
- Células ciliadas pulmonares expressam o ligante Jag1;
- Células secretoras pulmonares expressam o receptor Notch1;
- Células neuroendócrinas pulmonares expressam o ligante Delta1;
- Durante o processo normal de diferenciação de progenitores respiratórios, a sinalização Notch age de modo a promover a diferenciação de células de Clara, e a restringir a diferenciação de células ciliadas e neuroendócrinas;
- Notch atua nos processos de diferenciação celular através de um mecanismo de inibição lateral;
- Genes como Chad, Cbr2, Reg3g, Gsta, Hp, Gabrp Krt15, Upk3a e Btl9 correspondem a marcadores putativos da linhagem secretora do pulmão aos 18.5 dpc;
- Genes como Tm4sf1, Mt2, Myb, Dnhac3, Phtf1, Lrrc34, Porcn e Efcab1 correspondem a marcadores putativos da linhagem ciliada do pulmão aos 18.5 dpc;

- Nov1 corresponde a um marcador de células neuroendócrinas do pulmão aos 14.5 e 18.5 dpc;
- A via de sinalização Notch está associada com o estabelecimento de subpopulações de células secretoras e ciliadas no epitélio pulmonar.

REFERÊNCIAS*

Aikawa T, Shimura S, Sasaki H, Ebina M, Takishima T. Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack. *Chest*, 1992;101(4):916-921.

Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development. *Science*, 1999;284(5415):770-776.

Attar MA, Bailie MB, Christensen PJ, Brock TG, Wilcoxon SE, Paine R, 3rd. Induction of icam-1 expression on alveolar epithelial cells during lung development in rats and humans. *Exp Lung Res*. 1999;25(3):245-259.

Basbaum CB, Finkbeiner WE. Airway secretion: A cell-specific analysis. *Horm Metab Res*. 1988;20(11):661-667.

Bateman JR, Pavia D, Sheahan NF, Agnew JE, Clarke SW. Impaired tracheobronchial clearance in patients with mild stable asthma. *Thorax*, 1983;38(6):463-467.

Beckers J, Clark A, Wunsch K, Hrabe De Angelis M, Gossler A. Expression of the mouse delta1 gene during organogenesis and fetal development. *Mech Dev*. 1999;84(1-2):165-168.

Bellusci S, Grindley J, Emoto H, Itoh N, Hogan BL. Fibroblast growth factor 10 (fgf10) and branching morphogenesis in the embryonic mouse lung. *Development*, 1997;124(23):4867-4878.

Blatt EN, Yan XH, Wuerffel MK, Hamilos DL, Brody SL. Forkhead transcription factor hfh-4 expression is temporally related to ciliogenesis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999;21(2):168-176.

Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FB. Number and proliferation of clara cells in normal human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(5 Pt 1):1585-1591.

Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FB. Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(6 Pt 1):2000-2006.

Borggreffe T, Oswald F. The notch signaling pathway: Transcriptional regulation at notch target genes. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(10):1631-1646.

Borok Z, Danto SI, Lubman RL, Cao Y, Williams MC, Crandall ED. Modulation of t1alpha expression with alveolar epithelial cell phenotype in vitro. *Am J Physiol*. 1998;275(1 Pt 1):L155-164.

* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Borthwick DW, Shahbazian M, Krantz QT, Dorin JR, Randell SH. Evidence for stem-cell niches in the tracheal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001;24(6):662-670.

Brody SL, Hackett BP, White RA. Structural characterization of the mouse *hfh4* gene, a developmentally regulated forkhead family member. *Genomics*. 1997;45(3):509-518.

Brody SL, Yan XH, Wuerffel MK, Song SK, Shapiro SD. Ciliogenesis and left-right axis defects in forkhead factor *hfh-4*-null mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000;23(1):45-51.

Cardoso WV, Itoh A, Nogawa H, Mason I, Brody JS. Fgf-1 and fgf-7 induce distinct patterns of growth and differentiation in embryonic lung epithelium. *Dev Dyn*. 1997;208(3):398-405.

Cardoso WV, Lu J. Regulation of early lung morphogenesis: Questions, facts and controversies. *Development*. 2006;133(9):1611-1624.

Cardoso WV, Williams MC. Basic mechanisms of lung development: Eighth woods hole conference on lung cell biology 2000. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001;25(2):137-140.

Cardoso WV. Molecular regulation of lung development. *Annu Rev Physiol*. 2001;63:471-494.

Chen G, Korfhagen TR, Xu Y, Kitzmiller J, Wert SE, Maeda Y, Gregorieff A, Clevers H, Whitsett JA. Spdef is required for mouse pulmonary goblet cell differentiation and regulates a network of genes associated with mucus production. *J Clin Invest*. 2009;119(10):2914-2924.

Chen J, Knowles HJ, Hebert JL, Hackett BP. 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*. 1998;102(6):1077-1082.

Collins BJ, Kleeberger W, Ball DW. Notch in lung development and lung cancer. *Semin Cancer Biol*. 2004;14(5):357-364.

Costa RH, Kalinichenko VV, Lim L. Transcription factors in mouse lung development and function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;280(5):L823-838.

Crapo JD, Barry BE, Gehr P, Bachofen M, Weibel ER. Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am Rev Respir Dis*. 1982;125(6):740-745.

Creuwels LA, van Golde LM, Haagsman HP. The pulmonary surfactant system: Biochemical and clinical aspects. *Lung*. 1997;175(1):1-39.

Dabdoub A, Puligilla C, Jones JM, Fritzsche B, Cheah KS, Pevny LH, Kelley MW. Sox2 signaling in prosensory domain specification and subsequent hair cell differentiation in the developing cochlea. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(47):18396-18401.

Dang TP, Eichenberger S, Gonzalez A, Olson S, Carbone DP. Constitutive activation of notch3 inhibits terminal epithelial differentiation in lungs of transgenic mice. *Oncogene*, 2003;22(13):1988-1997.

Daniely Y, Liao G, Dixon D, Linnoila RI, Lori A, Randell SH, Oren M, Jetten AM. Critical role of p63 in the development of a normal esophageal and tracheobronchial epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287(1):C171-181.

Deblandre GA, Wettstein DA, Koyano-Nakagawa N, Kintner C. A two-step mechanism generates the spacing pattern of the ciliated cells in the skin of xenopus embryos. *Development*, 1999;126(21):4715-4728.

deMello DE, Sawyer D, Galvin N, Reid LM. Early fetal development of lung vasculature. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997;16(5):568-581.

Deterding RR, Jacoby CR, Shannon JM. Acidic fibroblast growth factor and keratinocyte growth factor stimulate fetal rat pulmonary epithelial growth. *Am J Physiol*. 1996;271(4 Pt 1):L495-505.

Devor DC, Singh AK, Lambert LC, DeLuca A, Frizzell RA, Bridges RJ. Bicarbonate and chloride secretion in calu-3 human airway epithelial cells. *J Gen Physiol*. 1999;113(5):743-760.

Dodge DE, Rucker RB, Singh G, Plopper CG. Quantitative comparison of intracellular concentration and volume of clara cell 10 kd protein in rat bronchi and bronchioles based on laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem*. 1993;41(8):1171-1183.

Drake CJ, Little CD. Exogenous vascular endothelial growth factor induces malformed and hyperfused vessels during embryonic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(17):7657-7661.

Engelhardt JF, Zepeda M, Cohn JA, Yankaskas JR, Wilson JM. Expression of the cystic fibrosis gene in adult human lung. *J Clin Invest*. 1994;93(2):737-749.

Evans CM, Williams OW, Tuvim MJ, Nigam R, Mixides GP, Blackburn MR, DeMayo FJ, Burns AR, Smith C, Reynolds SD, et al. Mucin is produced by clara cells in the proximal airways of antigen-challenged mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;31(4):382-394.

Evans MJ, Van Winkle LS, Fanucchi MV, Plopper CG. Cellular and molecular characteristics of basal cells in airway epithelium. *Exp Lung Res*. 2001;27(5):401-415.

Finkbeiner WE, Widdicombe JH, Hu L, Basbaum CB. Bovine tracheal serous cell secretion: Role of camp and camp-dependent protein kinase. *Am J Physiol*. 1992;262(5 Pt 1):L574-581.

Flamme I, Breier G, Risau W. Vascular endothelial growth factor (vegf) and vegf receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo. *Dev Biol.* 1995;169(2):699-712.

Flamme I, von Reutern M, Drexler HC, Syed-Ali S, Risau W. Overexpression of vascular endothelial growth factor in the avian embryo induces hypervascularization and increased vascular permeability without alterations of embryonic pattern formation. *Dev Biol.* 1995;171(2):399-414.

Fortini ME. Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(9):673-684.

Gale NW, Dominguez MG, Noguera I, Pan L, Hughes V, Valenzuela DM, Murphy AJ, Adams NC, Lin HC, Holash J, et al. Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(45):15949-15954.

Gebb SA, Shannon JM. Tissue interactions mediate early events in pulmonary vasculogenesis. *Dev Dyn.* 2000;217(2):159-169.

Giangreco A, Reynolds SD, Stripp BR. Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchoalveolar duct junction. *Am J Pathol.* 2002;161(1):173-182.

Gomperts BN, Gong-Cooper X, Hackett BP. Foxj1 regulates basal body anchoring to the cytoskeleton of ciliated pulmonary epithelial cells. *J Cell Sci* 2004;117(Pt 8):1329-1337.

Gontan C, de Munck A, Vermeij M, Grosveld F, Tibboel D, Rottier R. Sox2 is important for two crucial processes in lung development: Branching morphogenesis and epithelial cell differentiation. *Dev Biol.* 2008;317(1):296-309.

Graham V, Khudyakov J, Ellis P, Pevny L. Sox2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron.* 2003;39(5):749-765.

Grunig G, Warnock M, Wakil AE, Venkayya R, Brombacher F, Rennick DM, Sheppard D, Mohrs M, Donaldson DD, Locksley RM, et al. Requirement for il-13 independently of il-4 in experimental asthma. *Science*, 1998;282(5397):2261-2263.

Guillemot F, Lo LC, Johnson JE, Auerbach A, Anderson DJ, Joyner AL. Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell*, 1993;75(3):463-476.

Haines N, Irvine KD. Glycosylation regulates notch signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(10):786-797.

Han H, Tanigaki K, Yamamoto N, Kuroda K, Yoshimoto M, Nakahata T, Ikuta K, Honjo T. Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-j reveals its essential role in t versus b lineage decision. *Int Immunol.* 2002;14(6):637-645.

Harfe BD, Scherz PJ, Nissim S, Tian H, McMahon AP, Tabin CJ. Evidence for an expansion-based temporal shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell*. 2004;118(4):517-528.

Harris KS, Zhang Z, McManus MT, Harfe BD, Sun X. Dicer function is essential for lung epithelium morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(7):2208-2213.

Harris RJ, van Halbeek H, Glushka J, Basa LJ, Ling VT, Smith KJ, Spellman MW. Identification and structural analysis of the tetrasaccharide neuac alpha(2-->6)gal beta(1-->4)glcnac beta(1-->3)fuc alpha 1-->o-linked to serine 61 of human factor ix. *Biochemistry*. 1993;32(26):6539-6547.

Hartman BH, Reh TA, Bermingham-McDonogh O. Notch signaling specifies prosensory domains via lateral induction in the developing mammalian inner ear. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(36):15792-15797.

Hay JG, Danel C, Chu CS, Crystal RG. Human cc10 gene expression in airway epithelium and subchromosomal locus suggest linkage to airway disease. *Am J Physiol*. 1995;268(4 Pt 1):L565-575.

Hayes JM, Kim SK, Abitua PB, Park TJ, Herrington ER, Kitayama A, Grow MW, Ueno N, Wallingford JB. Identification of novel ciliogenesis factors using a new in vivo model for mucociliary epithelial development. *Dev Biol*. 2007;312(1):115-130.

High F, Epstein JA. Signalling pathways regulating cardiac neural crest migration and differentiation. *Novartis Found Symp*. 2007;283:152-161; discussion 161-154, 238-141.

Honda T, Ishida K, Hayama M, Kubo K, Katsuyama T. Type ii pneumocytes are preferentially located along thick elastic fibers forming the framework of human alveoli. *Anat Rec*. 2000;258(1):34-38.

Hong KU, Reynolds SD, Giangreco A, Hurley CM, Stripp BR. Clara cell secretory protein-expressing cells of the airway neuroepithelial body microenvironment include a label-retaining subset and are critical for epithelial renewal after progenitor cell depletion. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001;24(6):671-681.

Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, Fuchs E, Stripp BR. Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. *Am J Pathol*. 2004;164(2):577-588.

Hoyt RF, Jr., McNelly NA, McDowell EM, Sorokin SP. Neuroepithelial bodies stimulate proliferation of airway epithelium in fetal hamster lung. *Am J Physiol*. 1991;260(4 Pt 1):L234-240.

Huang T, You Y, Spoor MS, Richer EJ, Kudva VV, Paige RC, Seiler MP, Liebler JM, Zabner J, Plopper CG, et al. Foxj1 is required for apical localization of ezrin in airway epithelial cells. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 24):4935-4945.

Ishii Y, Rex M, Scotting PJ, Yasugi S. Region-specific expression of chicken sox2 in the developing gut and lung epithelium: Regulation by epithelial-mesenchymal interactions. *Dev Dyn*. 1998;213(4):464-475.

Ito T, Udaka N, Yazawa T, Okudela K, Hayashi H, Sudo T, Guillemot F, Kageyama R, Kitamura H. Basic helix-loop-helix transcription factors regulate the neuroendocrine differentiation of fetal mouse pulmonary epithelium. *Development*, 2000;127(18):3913-3921.

Jain-Vora S, Wert SE, Temann UA, Rankin JA, Whitsett JA. Interleukin-4 alters epithelial cell differentiation and surfactant homeostasis in the postnatal mouse lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997;17(5):541-551.

Johnston CJ, Finkelstein JN, Oberdorster G, Reynolds SD, Stripp BR. Clara cell secretory protein-deficient mice differ from wild-type mice in inflammatory chemokine expression to oxygen and ozone, but not to endotoxin. *Exp Lung Res*. 1999;25(1):7-21.

Junqueira LC, Carneiro. *Histología Básica*. 6^a ed. Barcelona: Masson; 2005. 488p.

Kiernan AE, Xu J, Gridley T. The notch ligand jag1 is required for sensory progenitor development in the mammalian inner ear. *PLoS Genet*. 2006;2(1):e4.

Kong Y, Glickman J, Subramaniam M, Shahsafaei A, Allamneni KP, Aster JC, Sklar J, Sunday ME. Functional diversity of notch family genes in fetal lung development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;286(5):L1075-1083.

Kreda SM, Gynn MC, Fenstermacher DA, Boucher RC, Gabriel SE. Expression and localization of epithelial aquaporins in the adult human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001;24(3):224-234.

Kurotani R, Tomita T, Yang Q, Carlson BA, Chen C, Kimura S. Role of secretoglobin 3a2 in lung development. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178(4):389-398.

Lawson GW, Van Winkle LS, Toskala E, Senior RM, Parks WC, Plopper CG. Mouse strain modulates the role of the ciliated cell in acute tracheobronchial airway injury-distal airways. *Am J Pathol*. 2002;160(1):315-327.

Lebeche D, Malpel S, Cardoso WV. Fibroblast growth factor interactions in the developing lung. *Mech Dev*. 1999;86(1-2):125-136.

Lewis J. Notch signalling and the control of cell fate choices in vertebrates. *Semin Cell Dev Biol*. 1998;9(6):583-589.

Linnoila RI. Functional facets of the pulmonary neuroendocrine system. *Lab Invest*. 2006;86(5):425-444.

Liu Y, Pathak N, Kramer-Zucker A, Drummond IA. Notch signaling controls the differentiation of transporting epithelia and multiciliated cells in the zebrafish pronephros. *Development*, 2007;134(6):1111-1122.

Maeda Y, Dave V, Whitsett JA. Transcriptional control of lung morphogenesis. *Physiol Rev.* 2007;87(1):219-244.

Mallampalli RK, Salome RG, Bowen SL, Chappell DA. Very low density lipoproteins stimulate surfactant lipid synthesis in vitro. *J Clin Invest.* 1997;99(8):2020-2029.

Malpel S, Mendelsohn C, Cardoso WV. Regulation of retinoic acid signaling during lung morphogenesis. *Development*, 2000;127(14):3057-3067.

McDowell EM, Newkirk C, Coleman B. Development of hamster tracheal epithelium: I. A quantitative morphologic study in the fetus. *Anat Rec.* 1985;213(3):429-447.

Melnick M, Chen H, Rich KA, Jaskoll T. Developmental expression of insulin-like growth factor ii receptor (igf-iir) in congenic mouse embryonic lungs: Correlation between igf-iir mrna and protein levels and heterochronic lung development. *Mol Reprod Dev.* 1996;44(2):159-170.

Miller WF. Mucociliary transport in cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 1973;288(23):1243.

Minoo P, Su G, Drum H, Bringas P, Kimura S. Defects in tracheoesophageal and lung morphogenesis in *nkx2.1(-/-)* mouse embryos. *Dev Biol.* 1999;209(1):60-71.

Nakajima M, Kawanami O, Jin E, Ghazizadeh M, Honda M, Asano G, Horiba K, Ferrans VJ. Immunohistochemical and ultrastructural studies of basal cells, clara cells and bronchiolar cuboidal cells in normal human airways. *Pathol Int.* 1998;48(12):944-953.

Newman GR, Campbell L, von Ruhland C, Jasani B, Gumbleton M. Caveolin and its cellular and subcellular immunolocalisation in lung alveolar epithelium: Implications for alveolar epithelial type i cell function. *Cell Tissue Res.* 1999;295(1):111-120.

Okajima T, Irvine KD. Regulation of notch signaling by o-linked fucose. *Cell*, 2002;111(6):893-904.

Okajima T, Xu A, Irvine KD. Modulation of notch-ligand binding by protein o-fucosyltransferase 1 and fringe. *J Biol Chem.* 2003;278(43):42340-42345.

Okamura Y, Saga Y. Notch signaling is required for the maintenance of enteric neural crest progenitors. *Development*, 2008;135(21):3555-3565.

Otani EM, Newkirk C, McDowell EM. Development of hamster tracheal epithelium: Iv. Cell proliferation and cytodifferentiation in the neonate. *Anat Rec.* 1986;214(2):183-192.

Pack AI, DeLaney RG, Fishman AP. Augmentation of phrenic neural activity by increased rates of lung inflation. *J Appl Physiol.* 1981;50(1):149-161.

Pack RJ, Al-Ugaily LH, Morris G, Widdicombe JG. The distribution and structure of cells in the tracheal epithelium of the mouse. *Cell Tissue Res.* 1980;208(1):65-84.

Parera MC, van Dooren M, van Kempen M, de Krijger R, Grosveld F, Tibboel D, Rottier R. Distal angiogenesis: A new concept for lung vascular morphogenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;288(1):L141-149.

Park KS, Korfhagen TR, Bruno MD, Kitzmiller JA, Wan H, Wert SE, Khurana Hershey GK, Chen G, Whitsett JA. Spdef regulates goblet cell hyperplasia in the airway epithelium. *J Clin Invest*. 2007;117(4):978-988.

Park KS, Wells JM, Zorn AM, Wert SE, Laubach VE, Fernandez LG, Whitsett JA. Transdifferentiation of ciliated cells during repair of the respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006;34(2):151-157.

Pepicelli CV, Lewis PM, McMahon AP. Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung. *Curr Biol*. 1998;8(19):1083-1086.

Plopper CG, Chu FP, Haselton CJ, Peake J, Wu J, Pinkerton KE. Dose-dependent tolerance to ozone. I. Tracheobronchial epithelial reorganization in rats after 20 months' exposure. *Am J Pathol*. 1994;144(2):404-420.

Post LC, Ternet M, Hogan BL. Notch/delta expression in the developing mouse lung. *Mech Dev*. 2000;98(1-2):95-98.

Que J, Okubo T, Goldenring JR, Nam KT, Kurotani R, Morrissey EE, Taranova O, Pevny LH, Hogan BL. Multiple dose-dependent roles for sox2 in the patterning and differentiation of anterior foregut endoderm. *Development*. 2007;134(13):2521-2531.

Radtke F, Raj K. The role of notch in tumorigenesis: Oncogene or tumour suppressor? *Nat Rev Cancer*. 2003;3(10):756-767.

Radtke F, Schweisguth F, Pear W. The notch 'gospel'. *EMBO Rep*. 2005;6(12):1120-1125.

Randell SH, Comment CE, Ramaekers FC, Nettesheim P. Properties of rat tracheal epithelial cells separated based on expression of cell surface alpha-galactosyl end groups. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1991;4(6):544-554.

Randell SH. Airway epithelial stem cells and the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3(8):718-725.

Rawlins EL, Hogan BL. Epithelial stem cells of the lung: Privileged few or opportunities for many? *Development*. 2006;133(13):2455-2465.

Rawlins EL, Ostrowski LE, Randell SH, Hogan BL. Lung development and repair: Contribution of the ciliated lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(2):410-417.

Reynolds SD, Reynolds PR, Pryhuber GS, Finder JD, Stripp BR. Secretoglobins scgb3a1 and scgb3a2 define secretory cell subsets in mouse and human airways. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(11):1498-1509.

Rock JR, Randell SH, Hogan BL. Airway basal stem cells: A perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Dis Model Mech*. 2010;3(9-10):545-556.

Rogers DF. The airway goblet cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;35(1):1-6.

Sasamura T, Sasaki N, Miyashita F, Nakao S, Ishikawa HO, Ito M, Kitagawa M, Harigaya K, Spana E, Bilder D, et al. Neurotic, a novel maternal neurogenic gene, encodes an o-fucosyltransferase that is essential for notch-delta interactions. *Development*, 2003;130(20):4785-4795.

Schoch KG, Lori A, Burns KA, Eldred T, Olsen JC, Randell SH. A subset of mouse tracheal epithelial basal cells generates large colonies in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;286(4):L631-642.

Schuger L. Laminins in lung development. *Exp Lung Res*. 1997;23(2):119-129.

Shan L, Aster JC, Sklar J, Sunday ME. Notch-1 regulates pulmonary neuroendocrine cell differentiation in cell lines and in transgenic mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;292(2):L500-509.

Shi S, Stahl M, Lu L, Stanley P. Canonical notch signaling is dispensable for early cell fate specifications in mammals. *Mol Cell Biol*. 2005;25(21):9503-9508.

Shi S, Stanley P. Protein o-fucosyltransferase 1 is an essential component of notch signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(9):5234-5239.

Singh G, Katyal SL. Clara cells and clara cell 10 kd protein (cc10). *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997;17(2):141-143.

Stripp BR, Maxson K, Mera R, Singh G. Plasticity of airway cell proliferation and gene expression after acute naphthalene injury. *Am J Physiol*. 1995;269(6 Pt 1):L791-799.

Stripp BR, Reynolds SD, Boe IM, Lund J, Power JH, Coppens JT, Wong V, Reynolds PR, Plopper CG. Clara cell secretory protein deficiency alters clara cell secretory apparatus and the protein composition of airway lining fluid. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;27(2):170-178.

Stubbs JL, Davidson L, Keller R, Kintner C. Radial intercalation of ciliated cells during xenopus skin development. *Development*, 2006;133(13):2507-2515.

Sunday ME, Hua J, Reyes B, Masui H, Torday JS. Anti-bombesin monoclonal antibodies modulate fetal mouse lung growth and maturation in utero and in organ cultures. *Anat Rec*. 1993;236(1):25-32; discussion 33-24.

Taichman DB, Loomes KM, Schachtner SK, Guttentag S, Vu C, Williams P, Oakey RJ, Baldwin HS. Notch1 and jagged1 expression by the developing pulmonary vasculature. *Dev Dyn*. 2002;225(2):166-175.

Tichelaar JW, Lu W, Whitsett JA. Conditional expression of fibroblast growth factor-7 in the developing and mature lung. *J Biol Chem*. 2000;275(16):11858-11864.

Tilley AE, Harvey BG, Heguy A, Hackett NR, Wang R, O'Connor TP, Crystal RG. Down-regulation of the notch pathway in human airway epithelium in association with smoking and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179(6):457-466.

Toskala E, Smiley-Jewell SM, Wong VJ, King D, Plopper CG. Temporal and spatial distribution of ciliogenesis in the tracheobronchial airways of mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;289(3):L454-459.

Tsao PN, Chen F, Izvolsky KI, Walker J, Kukuruzinska MA, Lu J, Cardoso WV. Gamma-secretase activation of notch signaling regulates the balance of proximal and distal fates in progenitor cells of the developing lung. *J Biol Chem*. 2008;283(43):29532-29544.

Tsao PN, Wei SC, Wu MF, Huang MT, Lin HY, Lee MC, Lin KM, Wang IJ, Kaartinen V, Yang LT, et al. Notch signaling prevents mucous metaplasia in mouse conducting airways during postnatal development. *Development*, 2011;138(16):3533-3543.

van Tuyl M, Groenman F, Kuliszewski M, Ridsdale R, Wang J, Tibboel D, Post M. Overexpression of lunatic fringe does not affect epithelial cell differentiation in the developing mouse lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;288(4):L672-682.

Van Winkle LS, Evans MJ, Brown CD, Willits NH, Pinkerton KE, Plopper CG. Prior exposure to aged and diluted sidestream cigarette smoke impairs bronchiolar injury and repair. *Toxicol Sci*. 2001;60(1):152-164.

Veerman AJ, van der Baan S, Den Hollander W. [disorders in mucociliary transport. Primary ciliary dyskinesia]. *Tijdschr Kindergeneesk*, 1983;51(6):185-192.

Vestbo J, Lange P, Hansen EF. [chronic obstructive pulmonary disease. World copd day 2002]. *Ugeskr Laeger*, 2002;164(47):5510.

Wan H, Kaestner KH, Ang SL, Ikegami M, Finkelman FD, Stahlman MT, Fulkerson PC, Rothenberg ME, Whitsett JA. Foxa2 regulates alveolarization and goblet cell hyperplasia. *Development*, 2004;131(4):953-964.

Weaver M, Dunn NR, Hogan BL. Bmp4 and fgf10 play opposing roles during lung bud morphogenesis. *Development*, 2000;127(12):2695-2704.

Weinmaster G, Kopan R. A garden of notch-ly delights. *Development*, 2006;133(17):3277-3282.

Wettstein DA, Turner DL, Kintner C. The xenopus homolog of drosophila suppressor of hairless mediates notch signaling during primary neurogenesis. *Development* 1997;124(3):693-702.

Williams MC, Cao Y, Hinds A, Rishi AK, Wetterwald A. T1 alpha protein is developmentally regulated and expressed by alveolar type i cells, choroid plexus, and ciliary epithelia of adult rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996;14(6):577-585.

Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, Donaldson DD. Interleukin-13: Central mediator of allergic asthma. *Science*, 1998;282(5397):2258-2261.

Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA, Breitman ML, Rossant J. Flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development*, 1993;118(2):489-498.

You Y, Huang T, Richer EJ, Schmidt JE, Zabner J, Borok Z, Brody SL. Role of f-box factor foxj1 in differentiation of ciliated airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;286(4):L650-657.

Youngson C, Nurse C, Yeger H, Cutz E. Oxygen sensing in airway chemoreceptors. *Nature*, 1993;365(6442):153-155.

Zemke AC, Snyder JC, Brockway BL, Drake JA, Reynolds SD, Kaminski N, Stripp BR. Molecular staging of epithelial maturation using secretory cell-specific genes as markers. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009;40(3):340-348.

ANEXOS

ARTIGOS PUBLICADOS

ANEXO A - Notch signaling controls the balance of ciliated and secretory cell fates in developing airways. Po-Nien Tsao*, **Michelle Vasconcelos***, Konstantin I. Izvolsky, Jun Qian, Jining Lu¹ and Wellington V. Cardoso. Development 136, 2297-2307 (2009). **These authors contributed equally to this work.*

Notch signaling controls the balance of ciliated and secretory cell fates in developing airways

Po-Nien Tsao^{1,3,*}, Michelle Vasconcelos^{1,4,*}, Konstantin I. Izvolsky¹, Jun Qian¹, Jining Lu¹ and Wellington V. Cardoso^{1,2,†}

Although there is accumulated evidence of a role for Notch in the developing lung, it is still unclear how disruption of Notch signaling affects lung progenitor cell fate and differentiation events in the airway epithelium. To address this issue, we inactivated Notch signaling conditionally in the endoderm using a *Shh-Cre* deleter mouse line and mice carrying floxed alleles of the *Pofut1* gene, which encodes an O-fucosyltransferase essential for Notch-ligand binding. We also took the same conditional approach to inactivate expression of *Rbpjk*, which encodes the transcriptional effector of canonical Notch signaling. Strikingly, these mutants showed an almost identical lung phenotype characterized by an absence of secretory Clara cells without evidence of cell death, and showed airways populated essentially by ciliated cells, with an increase in neuroendocrine cells. This phenotype could be further replicated in cultured wild-type lungs by disrupting Notch signaling with a gamma-secretase inhibitor. Our data suggest that Notch acts when commitment to a ciliated or non-ciliated cell fate occurs in proximal progenitors, silencing the ciliated program in the cells that will continue to expand and differentiate into secretory cells. This mechanism may be crucial to define the balance of differentiated cell profiles in different generations of the developing airways. It might also be relevant to mediate the metaplastic changes in the respiratory epithelium that occur in pathological conditions, such as asthma and chronic obstructive pulmonary disease.

KEY WORDS: Notch, Pofut1, Rbpjk (Rbpj), Cell fate, Lung development, Airway differentiation, Ciliated cell, Clara cell, Neuroendocrine cell

INTRODUCTION

The respiratory system represents a major interface between the body and the external environment, serving functions as diverse as mucociliary clearance, fluid and electrolyte homeostasis, surfactant production and gas exchange. To exert these functions the respiratory epithelium harbors a wide variety of cell phenotypes differentially distributed from the tracheobronchial region (proximal) to the alveoli (distal), including basal, ciliated secretory and neuroendocrine cells in airways and type I and type II pneumocytes in alveoli (Weibel, 1984; Rawlins and Hogan, 2006; Franks et al., 2008). In the embryo, these cells arise from developmental programs that initially specify proximal and distal lung progenitors, and later on drive prespecified cells to differentiate towards specific cellular phenotypes. Although factors such as *Titf1* (*Nkx2-1*), *Foxa2*, β -catenin, *Gata* and *Sox* family members, have been implicated in these programs, little is known about how cell fates are regulated and diversity is achieved in the respiratory epithelium (Cardoso and Lu, 2006; Maeda et al., 2007; Warburton et al., 2008).

Studies in species from *Drosophila* to humans implicate Notch signaling in the control of cell fate decisions, in the establishment of asymmetries and in the timing of differentiation during development. These effects have been widely reported in various organs, including the lung (van Es et al., 2005; Guilmeau et al., 2008; Murtaugh et al., 2003; Liu et al., 2007; Okamura and Saga,

2008; Gridley, 2007; Collins et al., 2004). Four Notch receptors (Notch1–4) and five ligands [jagged 1 and 2 (*Jag1* and 2) and delta-like 1, 3 and 4 (*Dll1*, 3 and 4)] have been identified in mammals. Ligand-receptor interactions via cell-cell contact trigger a series of enzymatic events, which ultimately results in gamma-secretase cleavage of the Notch intracellular domain (NICD) and NICD binding to the transcriptional effector *Rbpjk* (*Rbpj*). This leads to activation of the Notch downstream target genes *Hes* and *Hey*, which then exert their biological effects (Radtke and Raj, 2003).

There is evidence that Notch components are already present during the initial stages of lung development, and that Notch is dynamically activated at the tips of lung epithelial buds (Tsao et al., 2008; Post et al., 2000; Kong et al., 2004). The effects of pharmacological inhibition of Notch signaling in foregut or lung explant cultures suggest that Notch is crucial to control the balance of proximal and distal cell fates and for proper development of the proximal progenitors of the developing airways (Tsao et al., 2008). In transgenic mice expressing a constitutively active *Notch3* targeted to the distal lung epithelium, distal progenitors fail to differentiate and remain immature (Dang et al., 2003). Insights into how Notch signaling influences progenitor cell fate during the acquisition of specific cell phenotypes come from the analysis of mice deficient in *Hes1*, one of the Notch targets. *Hes1* deficiency in the lungs results in an increased number of neuroendocrine cells, with a relatively small decrease in the number of secretory cells (Ito et al., 2000). Although informative, these observations do not reflect the full role of Notch in the developing lung, as inactivation of *Hes1* does not lead to global disruption of Notch signaling. Thus, the question still remained as to whether preventing signaling by all Notch receptors could affect developmental events not yet revealed by these previous approaches.

Here we investigate this issue using three distinct Notch loss-of-function approaches in the murine lung. The protein O-fucosyltransferase 1 (*Pofut1*) catalyzes the reaction that attaches O-fucose to the EGF repeats of Notch (Okajima and Matsuda, 2006).

¹Pulmonary Center, Department of Medicine, and ²Department of Pathology, Boston University School of Medicine, Boston, MA 02118, USA. ³Department of Pediatrics, National Taiwan University Hospital, National Taiwan University College of Medicine, Taipei, Taiwan. ⁴Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP 05508-900, Brazil.

*These authors contributed equally to this work

†Author for correspondence (e-mail: wcardoso@bu.edu)

Pofut1 is ubiquitously expressed during organogenesis, including in the developing lung (Shi and Stanley, 2003; Tsao et al., 2008). Studies in which *Pofut1* has been deleted systemically or selectively in different organs reveal that this modification is crucial for efficient Notch-ligand binding and Notch-mediated signaling. Although O-fucosylation has also been implicated in other pathways, there is substantial biochemical and genetic evidence to suggest that during development, the *Pofut1* requirement is essentially circumscribed to the Notch pathway (Sasamura et al., 2007; Shi and Stanley, 2003; Okamura and Saga, 2008; Guilmeau et al., 2008).

To perturb ligand-receptor interactions and block Notch-dependent events upstream of all transcriptional targets in the lung epithelium, we inactivated *Pofut1* using a conditional knockout approach in mice. Analysis of these mutants revealed a substantial differentiation defect, in which airways are completely devoid of the Clara cell secretory lineage and are overpopulated with ciliated cells and neuroendocrine cells. We show that this defect can be replicated by deleting the Notch transcriptional effector *Rbpjk* in the lung epithelium in vivo and by pharmacological disruption of Notch signaling in lung explant cultures. Our results support a major role for Notch in establishing the balance between ciliated and secretory cell fates during airway differentiation.

MATERIALS AND METHODS

Animals and genotyping

For the *Pofut1* model, *Pofut1*^{+/-} mice (Shi and Stanley, 2003) were mated to *Shh*^{Cre/+} mice (Harfe et al., 2004) to generate *Pofut1*^{+/-};*Shh*^{Cre/+} offspring. *Pofut1*^{+/-};*Shh*^{Cre/+} were then crossed to *Pofut1*^{F/F} (Shi et al., 2005) to generate mice with conditional *Pofut1* deletion of both (*Pofut1*^{F/F};*Shh*^{Cre/+}) or one (*Pofut1*^{F/+};*Shh*^{Cre/+} and *Pofut1*^{F/-}) allele, or with intact *Pofut1* alleles (*Pofut1*^{F/+}). For the *Rbpjk* model, a similar approach was taken using *Shh*^{Cre/+}, *Rbpjk*^{+/-} and *Rbpjk*^{F/F} mice (Han et al., 2002) (BioResource Center, Tsukuba, Japan) to generate conditional deletion of *Rbpjk*, as above. Mice were genotyped by PCR as described (Han et al., 2002; Harris et al., 2006; Shi et al., 2005). All protocols were approved by IACUC, Boston University School of Medicine.

Lung organ cultures

Litters containing the various genotypes were isolated at E11.5 from *Pofut1*^{F/F} females (crossed to *Pofut1*^{+/-};*Shh*^{Cre/+} males) and dissected lungs were cultured for 48 hours in DMEM containing 1% fetal bovine serum (FBS) at 37°C, as previously described (Tsao et al., 2008). Embryonic tissue was collected for genotyping to allow comparisons between control and mutant lungs. In another experiment, lungs from CD1 wild-type embryos were isolated at E13.5 and cultured for 4 days in media containing DAPT {N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester} (50 μM, Sigma) or DMSO (control). Cultured lung explants were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS overnight at 4°C and processed for immunohistochemistry. At least three explants per group (control, mutant) were analyzed.

Microdissection of lung mesenchyme and epithelium

E11.5 lungs (control, mutant) were isolated from litters of *Pofut1*^{F/F} females (crossed to *Pofut1*^{+/-};*Shh*^{Cre/+} males), incubated in Dispase (B&D; diluted 1:3 in PBS) for 12 minutes at 37°C, then washed with PBS three times and microdissected with fine forceps to separate the epithelium from the mesenchyme. Tissues were transferred to Eppendorf tubes containing RNAlater Stabilization Reagent (Qiagen #1017980) and processed for real-time PCR analysis of *Pofut1* and *Hes* and *Hey* genes (see below). Embryonic tissue was collected for genotyping. Mesenchymal contamination of epithelial tissues was assessed by expression of a collagen gene (*Colla2*).

Riboprobe synthesis and in situ hybridization

In situ hybridization was performed on 10 μm paraffin or frozen sections of lungs from control and mutants (*n*>3 each) using digoxigenin-UTP-labeled *Notch1*, *Jag1*, *Dll1* and *Hes1* riboprobes, as previously described (Lü et al.,

2004; Tsao et al., 2008). The DNA template for the mouse *Hes1* antisense riboprobe was generated by PCR using primers carrying T7 promoter sequences (forward, 5'-TAATACGACTCACTATAGGGGTCGTCAGAGAGAGGT-3' and reverse, 5'-AATTAACCCTCACTAAAGGGTT-CAGCGAGTGCATGAACGA-3'), which produces a PCR product of 568 bp. In some experiments, sections were briefly postfixed and immunohistochemistry was performed on the same sections as for colocalization studies.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on 5 μm paraffin sections of lungs from control and mutants using the ABC or M.O.M. Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. When necessary, antigen retrieval was performed using Unmasking Solution (Vector Laboratories #H-3300). Sections were incubated with primary antibody at 4°C overnight, biotinylated anti-mouse IgG reagent for 10 minutes at room temperature, then with DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) as the chromogen. Sections were counterstained with Methyl Green for 2 minutes (Tacs #4828-30-18), dehydrated and mounted (media from Shandon, #9999120). The following primary antibodies were used: anti-Scgb3a2 (gift from Dr S. Kimura, NIH), anti-Cldn10 (Zymed #415100), anti-CC10 (gift from Dr Singh and Dr Katyal, University of Pittsburgh), anti-Sox2 (Chemicon #AB5603), anti-Foxj1 (gift from Dr S. Brody, Washington University), anti-β-tubulin (Biogenex #MU178-UC), anti-p63 (Santa Cruz #4E4), anti-Pgp9.5 (Dako #25116), anti-Cgrp (Sigma #C8198), anti-Titf1 (Dako #M3575) and anti-T1alpha (mab 8.1.1, Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa). Cell proliferation was assessed using anti-Ki67 (B&D #550609) and the PCNA Staining Kit (Zymed #93-1143). Cell death was investigated by caspase 3 (R&D #AF835) and TUNEL (Apoptosis Detection Kit, Chemicon #S7107) analyses. Immunofluorescence was performed using secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488 or 598 (Molecular Probes) and analyzed using a Zeiss confocal laser-scanning microscope (LSM510 META), as previously described (Chen et al., 2007; Tsao et al., 2008). Conclusions were based on the analysis of more than three animals per group.

Periodic Acid Schiff (PAS) and Alcian Blue staining

We used the PAS Staining Kit (Sigma) on lung sections from E14.5, E18.5 and neonatal (P0) mice. Control and mutant lungs were preincubated with or without amylase (10 minutes) to distinguish mucin from glycogen, as described in the manufacturer's protocol. We also performed Alcian Blue pH 2.5 staining by incubating sections in 3% acetic acid (3 minutes) and then Alcian Blue (40 minutes at room temperature), counterstaining with Hematoxylin.

Quantitative real-time PCR

Total RNA was isolated from lung tissue from control and mutant mice using the RNeasy Mini Kit (Qiagen #74104) and reverse-transcribed (RT) using Superscript III (Invitrogen #18080-051). We used an ABI 7000 instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) to perform quantitative RT-PCR as previously described (Tsao et al., 2008; Chen et al., 2007). Primers (*Hes1*, *Hes5*, *Hey1*, *Hey2*, *Pofut1*, *Colla2* and beta-actin) were obtained from Assays-on-Demand (Applied Biosystems, Austin, TX, USA). Reactions (25 μl) were performed using the TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Austin, TX, USA). The relative concentration of the RNA for each gene to beta-actin mRNA was determined using the equation 2^{-DCT}, where DCT=(CT mRNA – CT beta-actin RNA).

Lung histology

High-resolution JB-4 plastic sections (2 μm) were generated from tissue fixed in 2% glutaraldehyde, 1% paraformaldehyde, 0.15 M sodium cacodylate buffer and stained with Toluidine Blue (Ramirez et al., 2003).

Morphometric analyses

The percentage of labeled epithelial cells immunostained for Foxj1, Ki67, Sox2 and Scgb3a2 was determined by counting cells in lung sections from control and mutants animals at 40× magnification. For each marker, ten fields were analyzed in three to five animals per group. At E14.5, only large

proximal airways were analyzed, as epithelial differentiation was restricted to this area. At E18.5, large (main/lobar bronchi), medium (second to third generation) and small (bronchioles down to terminal bronchiole) airways were analyzed. Data were represented as mean $\pm$ s.e. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test; differences were significant at $P < 0.05$. For the analysis of neuroendocrine cells, we counted Pgp9.5-positive cells in 40 random fields of E18.5 lung sections at 40 $\times$ magnification in control and *Pofut1* mutants (three animals per group) and the total number of labeled cells per group plotted as a bar chart.

RESULTS

Conditional deletion of *Pofut1* disrupts Notch signaling and leads to neonatal death and lung defects

To investigate the role of Notch in the developing lung and circumvent the vascular defects and early embryonic lethality of the systemic deletion of *Pofut1*, we inactivated *Pofut1* conditionally in the lung epithelium using a *Shh-Cre* deleter mouse line. Previous studies using *Shh-Cre*; *R26R* reporter mice have shown efficient Cre-mediated recombination in *Shh*-expressing tissues, including the respiratory field of the foregut endoderm and the lung epithelium (Harris et al., 2006; Harfe et al., 2004).

Genotyping of litters derived from *Pofut1*^{+/-}; *Shh*^{Cre/+} crossed to *Pofut1*^{F/F} mice ($n > 30$ altogether) at E11.5, E14.5, E18.5 and at birth (P0) revealed *Pofut1*^{F/-}; *Shh*^{Cre/+} (conditional deletion of both *Pofut1* alleles, termed *Pofut1*^{cnul}), *Pofut1*^{F/+}; *Shh*^{Cre/+} and *Pofut1*^{F/-} (conditional deletion of a single *Pofut1* allele) and *Pofut1*^{F/+} (no deletion of *Pofut1*, termed control) offspring at an expected Mendelian distribution. Real-time PCR analysis of lung epithelial and mesenchymal tissues isolated by microdissection at E11.5 confirmed selective disruption of *Pofut1* in the epithelium of *Pofut1*^{cnul} animals (Fig. 1A), consistent with previous studies using the *Shh-Cre* mice. Nevertheless, downregulation of Notch signaling, as suggested by a decrease in expression of Notch downstream targets, was observed consistently only from E14.5 onwards. At E14.5, when we could no longer separate individual lung layers, PCR analysis of whole-lung homogenates showed a substantial reduction in expression of *Hes* and *Hey* genes in the mutants (Fig. 1B). The residual expression seen for *Pofut1* (~20%) and for *Hes* and *Hey* genes (~50%) in E14.5 *Pofut1*^{cnul} whole lungs was likely to represent transcripts from the mesenchyme. Epithelial disruption of Notch signaling was further suggested by in situ hybridization, which showed that *Hes1* signals were almost abolished in the airways of E18.5 *Pofut1*^{cnul} mice (Fig. 1C-F).

Analysis of the *Pofut1*^{cnul} mutants at birth showed pups that were grossly normal, although already smaller than their littermates. Within the initial 2-3 weeks of postnatal life the mutants failed to thrive (Fig. 2A) and died; in examining more than ten litters, only 1 out of 17 *Pofut1*^{cnul} pups survived until P28. Mice carrying a single *Pofut1* allele behaved identically to controls with respect to all features analyzed in our study ($n > 3$ for all parameters). A detailed characterization of the postnatal phenotype of the *Pofut1*^{cnul} mutants will be reported elsewhere. Preliminary analysis of these lungs at P7, P14 and P21 revealed a dramatic attenuation of the airway epithelium that was particularly obvious in medium-sized airways and in terminal bronchioles. By P21, instead of the typical bronchiolar epithelium of controls, *Pofut1*^{cnul} lungs showed airways lined by a thin metaplastic squamous epithelium, with scattered cell debris and isolated foci of inflammatory cells, including macrophages (Fig. 2B,C). The overall changes were reminiscent of those reported in lungs injured by naphthalene exposure (Stripp et al., 1995; Park et al., 2006). Interestingly, these changes were not

Fig. 1. Conditional deletion of *Pofut1* and expression of Notch target genes in the mouse lung. (A) Real-time PCR of isolated E11.5 lung epithelium (Epi) and mesenchyme (Mes) shows a marked decrease in *Pofut1* mRNA selectively in the epithelium of *Pofut1*^{cnul} mutants relative to the control; however, expression of Notch targets, such as *Hes1*, is unchanged in both epithelium and mesenchyme. (B-F) Disruption of Notch signaling as suggested by downregulation of *Pofut1* and Notch target genes (*Hes1*, *Hes5*, *Hey1* and *Hey2*) in E14.5 whole-lung homogenates of *Pofut1*^{cnul} mutants (B, real-time PCR), and by loss of *Hes1* signals [arrowhead in controls (Ctr)] in the airway epithelium of E18.5 *Pofut1*^{cnul} lungs (C-F, in situ hybridization). (C,D) Bronchus, (E,F) Bronchiole. Scale bar: 40 μ m.

present in the lungs at birth or at prenatal stages. At E18.5, a cuboidal epithelium was clearly present in the airways of both groups (Fig. 2D,E). Thus, these changes occurred within the initial week of postnatal life. We concluded that *Shh-Cre*-mediated deletion of *Pofut1* led to alterations in the lung and possibly other organs that are incompatible with early postnatal life.

Conditional deletion of *Pofut1* does not perturb distal lung formation

Inhibition of Notch signaling in lung organ cultures has been shown to alter proximal-distal patterning and cell fate in airways undergoing branching morphogenesis (Tsao et al., 2008; Kong et al., 2004). We asked whether disrupting *Pofut1* selectively in the lung epithelium resulted in similar defects. When we analyzed the lungs of *Pofut1*^{cnul} mice at E11.5, E14.5 and E18.5, we found no obvious differences in gross morphology, including size, compared with control lungs. Also, no difference in the branching pattern of airways was detected when E11.5 lungs from control and mutant embryos were cultured for 24 and 48 hours (see Fig. S1A-F in the supplementary material; data not shown). This was not surprising,

Fig. 2. Postnatal abnormalities of *Pofut1*^{cnul} mice. (A) Mutants fail to thrive and by P21 are much smaller than their control littermates. (B–E) Lung histology (Hematoxylin and Eosin staining) at P21 showing control airways lined by typical cuboidal epithelium (B, arrowhead). Instead, *Pofut1*^{cnul} lungs show airways with a metaplastic squamous epithelium (C, red arrowhead), scattered cell debris and isolated macrophages (blue arrow). At E18.5, a cuboidal epithelium is present in airways of both control (D) and mutant (E) lungs. The boxed areas are shown at higher magnification in the panels to the right.

given the relatively late disruption of Notch signaling in our system as compared with the *in vitro* models mentioned above, and also because we have not disrupted Notch signaling in the mesenchyme, which harbors Notch-responsive patterning genes (Tsao et al., 2008). Moreover, distal differentiation, including formation of alveolar sacs and type I and type II cells, was not affected by *Pofut1* deletion, as assessed by morphological analysis of Hematoxylin and Eosin-stained sections, high-resolution plastic sections and by immunohistochemical assessment of markers such as *Titf1* (thyroid transcription factor 1), *T1alpha* (*Pdpn*) and surfactant-associated protein C (*Sftpc*) (see Fig. S1G–P in the supplementary material). These observations are in agreement with previous *in vitro* data suggesting that Notch is not required for induction of a distal program of differentiation in lung progenitors (Tsao et al., 2008). Interestingly, constitutive activation of Notch *in vivo* in distal progenitors is actually deleterious, as it prevents further differentiation of the distal epithelium (Dang et al., 2003).

***Pofut1* conditional deletion prevents the formation of Clara cells**

Next, we investigated airway epithelial differentiation. In the developing murine airways, Clara cells can be recognized at ~E16.5 by expression of the Clara cell secretory product CC10 [also termed *Scgb1a1* (Reynolds et al., 2002)]. We assessed CC10 expression by immunohistochemistry in control lungs at birth and at E18.5 and found the typical pattern of staining in secretory cells throughout the airways. Strikingly, no signals were detected in *Pofut1*^{cnul} mutants despite the preserved integrity of the lung epithelium (Fig. 3A–D). *In situ* hybridization confirmed that *CC10* transcripts were also absent in these mutants (data not shown). We asked whether disruption of Notch interfered with the specification or survival of the Clara cell lineage in the airways of these mutants. First, we assessed the expression of claudin 10 (*Cldn10*) and secretoglobin 3A2 (*Scgb3a2*, also known as *Ugrp1*), two further markers of this lineage (Reynolds et al., 2002; Zemke et al., 2009; Kurotani et al., 2008). Immunostaining confirmed strong signals in secretory cells of E18.5 control lungs; however, as observed for CC10, both epitopes were absent from E18.5 mutants (Fig. 3E–H).

We explored the possibility that Clara cells could have been initially specified, but needed Notch signaling to survive. Comparison of the pattern of caspase 3 and TUNEL staining in E14.5, E18.5 and P0 lungs revealed no difference between control

and mutants (data not shown), arguing against apoptosis as a mechanism contributing to the *Pofut1*^{cnul} phenotype. Thus, our data suggested that *Pofut1* deletion in the epithelium severely impairs the capacity of proximal progenitors to differentiate into Clara cells.

We then investigated the possibility that disruption of Notch could have altered the secretory cell program and led Clara cell precursors to differentiate into mucin-producing goblet cells. Conditional inactivation of *Pofut1* or *Rbpjk* in the intestinal epithelium is known to result in a marked increase in the goblet cell population (van Es et al., 2005; Guilmeau et al., 2008). Goblet cells are not normally present in the embryonic murine lung, but can be found postnatally in conditions that lead to inflammation (Evans et al., 2004; Rogers, 2003). We stained lung sections of E14.5 and E18.5 control and mutants with Periodic Acid Schiff (PAS) or Alcian Blue and found no evidence of mucin-producing cells (data not shown). However, similar analysis in tracheal sections from control and mutants sacrificed at birth revealed scattered PAS/Alcian Blue-positive cells in both groups, suggesting that goblet cell fate is not lost in the mutants (see Fig. 6C–F).

Conditional disruption of *Rbpjk* results in the same defects as in *Pofut1*^{cnul} mutants

We examined whether the inability to form Clara cells in the *Pofut1*^{cnul} mutant could be reproduced by disrupting Notch function *in vivo* in an independent fashion. We used *Shh-Cre* mice to delete expression of the crucial Notch canonical transcriptional effector *Rbpjk* (*Rbpsuh*) in the developing lung epithelium (Han et al., 2002) (see also Materials and methods). Analysis of mice in which both *Rbpjk* alleles were conditionally deleted (*Rbpjk*^{F/F}; *Shh*^{Cre/+}, termed *Rbpjk*^{cnul}) revealed at birth (*n*=6) and prenatally (E14.5, *n*=6; E18.5, *n*=8) a phenotype that was remarkably similar to that seen in the *Pofut1*^{cnul} lungs. No CC10- or *Scgb3a2*-expressing cells were detected in *Rbpjk*^{cnul} mice at E18.5 (Fig. 3I–L). Subsequent characterization of the *Rbpjk*^{cnul} phenotype revealed further similarities consistent with the *Pofut1*^{cnul} model for all parameters analyzed here.

Airways from *Pofut1*^{cnul} or *Rbpjk*^{cnul} mutants are overpopulated by ciliated cells

Next, we investigated the impact of Notch inactivation in the development of the ciliated cell lineage. During normal murine development, ciliated cells are first recognized in the trachea and lobar bronchi by morphological criteria and by β -tubulin expression

Fig. 3. Epithelial disruption of Notch signaling ablates Clara cells in the airways. (A-D) Immunohistochemistry for CC10 at birth (P0) (A,B) and at E18.5 (C,D) shows typical cytoplasmic expression associated with Clara cells (red arrow) in control airways (A,C), but reveals no CC10 signals in the epithelium of *Pofut1^{null}* lungs (B,D). (E-H) Cldn10 (E,F) and Scgb3a2 (G,H), used as additional markers for the secretory lineage, were also absent from *Pofut1^{null}* lungs at E18.5 by immunostaining. (I-L) Lungs of *Rbpjk^{null}* mice revealed the same defect, as shown by the absence of CC10 and Scgb3a2 signals in airways of E18.5 mutants (J,L), as compared with controls (I,K). White arrowheads indicate negative cells. Scale bar: 40 μ m.

at ~E16 (Toskala et al., 2005; Rawlins et al., 2007). Ciliated cell differentiation proceeds in a proximal-to-distal pattern, as the lung matures. By E18.5, ciliated cells are present interspersed with secretory cells throughout the respiratory epithelium of airways from the trachea to the terminal bronchiole. We stained E18.5 lungs

Fig. 4. Epithelial disruption of Notch signaling dramatically increases the number of ciliated cells in airways.

(A-H) Immunohistochemistry for β -tubulin (A-D) and Foxj1 (E-H) shows a significant increase in labeling (arrowheads) in E18.5 airways from *Pofut1^{null}* (A-F) and *Rbpjk^{null}* (G,H) mice, compared with controls. (I) Quantification of Foxj1-positive cells in large, medium and small airways of E18.5 control and *Pofut1^{null}* lungs reveals labeling in 80-85% of the epithelial cells at all levels in mutants. *, $P < 0.05$. Scale bar: 15 μ m.

with a β -tubulin antibody and confirmed this pattern in controls (Fig. 4A,C). By contrast, airways of *Pofut1^{null}* mutants seemed to almost exclusively comprise β -tubulin-expressing ciliated cells (Fig. 4B,D). The identity of these cells was further confirmed by immunostaining for Foxj1, a transcription factor crucial for acquisition of ciliated cell phenotype (Fig. 4E,F) (Brody et al., 2000). Analysis of Foxj1 in E18.5 *Rbpjk^{null}* lungs revealed the same defect (Fig. 4G,H). We asked whether regional differences in the number of ciliated cells normally found throughout the different airway generations could still be observed in *Pofut1^{null}* mutants. Quantitative analysis (Fig. 4I) showed that in E18.5 controls, the percentage of Foxj1-expressing cells averaged 40%, 18% and 17% of the epithelial cells present in the large, medium and small airways, respectively ($n=3-4$). This contrasted sharply with *Pofut1^{null}* lungs, in which Foxj1-positive cells comprised nearly 80% of the population of the airway epithelium, regardless of the airway generation ($n=3$). Thus, Notch signaling might play an important role in the mechanism that controls the number of ciliated cells present in different generations of the developing airways.

The aberrant epithelial differentiation of *Pofut1^{cnul}* or *Rbpjk^{cnul}* mutants is also reproduced by pharmacological inhibition of Notch in vitro

To provide additional evidence that abnormal epithelial differentiation is linked to Notch loss-of-function, we used a classic gamma-secretase inhibitor to disrupt Notch in a lung organ culture assay. We cultured wild-type lungs at ~E13.0 (instead of E11.5) in control and DAPT-containing (50 μ M) media, and extended the culture period for 4 days (Weinmaster and Kopan, 2006; Tsao et al., 2008); this enabled the examination of differentiation events that normally occur at a relatively late stage in vitro. Analysis of these lungs confirmed the patterning abnormalities and decreased expression of Notch targets reported previously (data not shown) (Tsao et al., 2008). We then assessed the expression of markers of epithelial differentiation and found that in the proximal airways of DAPT-treated explants, the majority of the epithelium consisted of ciliated cells. In this group, Foxj1 immunostaining was present in almost all cells, in contrast to controls, in which positive and negative cells were interspersed in the airway epithelium (Fig. 5A,B,E,F). Foxj1-expressing cells showed phenotypic features of ciliated cells and expressed β -tubulin (Fig. 5C,G). By contrast, immunostaining for the secretory cell marker Scgb3a2 was almost negative in DAPT-treated lungs (Fig. 5D,H), consistent with the inhibition of the secretory cell program observed in our in vivo models. Thus, both in vitro and in vivo models strongly support a role for Notch in lung epithelial differentiation.

Effect of Notch disruption on the differentiation of other respiratory lineages

There is evidence that neuroendocrine (NE) differentiation is under Notch control in the lung epithelium. An excessive number of NE cells is found in mice deficient in the Notch effector *Hes1* (Ito et al., 2000). Conversely, reduced NE cell number has been reported in transgenic mice expressing an activated Notch1 driven by the calcitonin (*Cgrp*; *Calca*) promoter (Shan et al., 2007). This prompted us to investigate whether NE differentiation was affected in lungs of

Fig. 5. Pharmacological inhibition of Notch reproduces the aberrant differentiation pattern of the mutants. Wild-type E13.5 mouse lungs cultured for 4 days in (A–D) control and (E–H) DAPT-containing (50 μ M) media. (A,B) Foxj1 immunohistochemistry shows labeling in the proximal epithelium of control lungs (red arrowhead), alternating with negative cells (white arrowhead). (C,D) Expression of β -tubulin (C) and Scgb3a2 (D) further suggests a balanced distribution of ciliated and secretory cells in controls. (E–H) In DAPT-treated lungs, almost all cells in the proximal airways are labeled for Foxj1 (E,F) and β -tubulin (G), but not for Scgb3a2 (H).

Pofut1^{cnul} mice. In the developing murine lung, NE cells are recognized at E16.5 by expression of the neural markers *Cgrp* and *Pgp9.5* (Uchl1) (reviewed by Linnolia, 2006). Immunostaining of control and mutant lungs at E14.5 did not reveal *Cgrp* or *Pgp9.5* signals in the lung epithelium. However, at E18.5, NE cells were strongly labeled by these markers in both groups, and quantitative analysis of *Pgp9.5* showed that more NE cells were present in the mutants (Fig. 6A,B) (control=3 and *Pofut1^{cnul}*=14 *Pgp9.5*-labeled cells in 40 random fields, $n=3$ animals per group). The relative increase in NE cells correlated well with the *Hes1* downregulation that we observed in these mutants at E18.5 (Fig. 1C–F), and is in agreement with the phenotype reported in *Hes1*-null lungs (Ito et al., 2000).

We also examined whether the distribution or number of basal cells was influenced by *Pofut1* deficiency. Immunohistochemical analysis of p63, a marker of basal cells in the respiratory epithelium, did not reveal any difference between the control and *Pofut1^{cnul}* mutants (Danieli et al., 2004) (data not shown). As described above and shown in Fig. 6C–F, disruption of Notch did not prevent goblet cells from forming in the trachea of mutants at birth. Together, our data implicate Notch in the balance between at least three distinct epithelial lineages in the embryonic lung.

The aberrant epithelial differentiation of *Pofut1* and *Rbpjk* mutants is accompanied by a substantial decrease in cell proliferation

During organogenesis, Notch can regulate the balance between progenitor cell pools and their differentiating progenies (Radke and Raj, 2003; Okamura and Saga, 2008). To determine whether

Fig. 6. Effects of Notch disruption on the differentiation of other respiratory lineages. (A,B) Increased number of neuroendocrine (NE) cells in the airways of *Pofut1^{cnul}* mice as shown by *Pgp9.5* immunostaining (A, arrowheads). (B) The total number of *Pgp9.5*-positive cells in 40 random fields of E18.5 lung sections at 40 $\times$ magnification of control and *Pofut1^{cnul}* mutants ($n=3$ animals per group). (C–F) Tracheal sections from control and *Rbpjk^{cnul}* mutants at birth (P0) showing scattered PAS (C,D) and Alcian Blue (AB) (E,F) stained cells in both groups, suggesting that goblet cell fate is not lost in the mutants.

Fig. 7. Aberrant differentiation is accompanied by decreased epithelial proliferation in mutant lungs. Ki67 immunostaining of mouse lungs from E18.5 controls, *Pofut1^{null}* (A-E) and *Rbpjk^{null}* (F-H) shows a significant decrease in the number of labeled epithelial cells (red arrowhead) in large, medium and small airways of mutants, as compared with the respective controls, suggesting a substantial decrease in cell proliferation in both mutants. Bar charts show Ki67-labeled cells in the airway epithelium only; *, $P < 0.05$. Scale bar: 40 μ m.

conditional disruption of Notch signaling influences the proliferation status of a particular pool of epithelial cells, we performed Ki67 immunostaining in lung sections of the *Pofut1* mutants. In E18.5 controls, Ki67-labeled cells comprised ~25–30% of the epithelium at all airway levels (Fig. 7A-E). Ki67 signals were essentially associated with non-ciliated cells, consistent with previous reports (Fig. 7A,C) (McDowell et al., 1985; Otani et al., 1986; Rawlins et al., 2007). By contrast, Ki67 labeling was significantly reduced in the lung epithelium of E18.5 *Pofut1^{null}* mutants relative to controls, and averaged 15%, 10% and 5% in large, medium and small airways, respectively ($P < 0.05$) (Fig. 7E). Analysis of E18.5 *Rbpjk^{null}* mutants confirmed the changes in Ki67 seen in the *Pofut1* model and showed an even more severe reduction in labeling (Fig. 7F-H). Presumably, this is a consequence of the large number of ciliated cells present in the mutants. In both *Pofut1^{null}* and *Rbpjk^{null}* mutants, we could not determine precisely what types of cells were proliferating. Most of them appeared undifferentiated, although some resembled NE cells or immature ciliated cells, as

Fig. 8. Early differentiation events in *Pofut1^{null}* mouse lungs. (A,B) At E14.5, Foxj1 immunostaining (arrowhead) is present in scattered ciliated cell precursors that are restricted to the proximal airways of the control (A); labeling is increased in the same region of *Pofut1^{null}* lungs (B). (C,D) Ki67 labeling of the proximal airway epithelium appears similar in E14.5 control (C) and *Pofut1^{null}* (D) lungs. (E,F) Immunohistochemistry for Scgb3a2 at E14.5 shows strong signals in discrete epithelial cells of the proximal airways (arrowheads) in both control (E) and mutant (F), suggesting the presence of secretory cell precursors. (G) Quantitative analysis of epithelial labeling for the three epitopes in E14.5 control and *Pofut1^{null}* proximal airways. In the mutant, there is a significant increase in the percentage of Foxj1-labeled cells (*, $P < 0.05$), a trend towards a decrease in the percentage of Scgb3a2 labeling, and no change in the percentage of Ki67 labeling. (H-J) Double immunofluorescence for Foxj1 (red arrowhead) and Scgb3a2 (green arrowhead) in E15.5 controls shows overlapping and non-overlapping signals (H,I) in airways undergoing commitment to a ciliated or secretory cell fate. No expression is found in distal airways at this time (J). Scale bar: 50 μ m.

suggested by their morphology and marker analysis in serial sections. These results were further confirmed by PCNA immunostaining (not shown).

Notch restricts commitment to a ciliated cell fate

Next, we asked whether epithelial disruption of *Pofut1* could have led to a precocious commitment to the ciliated cell program and to exhaustion of the progenitor cell pool required for secretory cell differentiation. To address this question, we assessed Foxj1 and

Fig. 9. Effect of *Pofut1* deletion on Sox2 expression. (A) Sox2 immunohistochemistry in E14.5 control mouse lungs shows typical expression throughout the airway epithelium, excluding the distal buds. (B) Quantitative analysis at E14.5 shows Sox2 labeling in ~65% of epithelial cells in both control and *Pofut1*^{cnul} lungs. (C-E) In E18.5 controls, Sox2 is expressed (arrowhead) in the airway epithelium mostly in non-ciliated cells (D), although labeling in scattered ciliated cells can be found in the proximal airways (E). (F,G) In E18.5 *Pofut1*^{cnul} lungs, almost no Sox2 expression is found. (H) Quantitation of Sox2-positive cells in large, medium and small airways at E18.5 shows a substantial reduction in the number of labeled cells at all levels (*, *P* < 0.05) in *Pofut1*^{cnul} as compared with control lungs. Scale bar: 40 μ m.

Ki67 expression in controls and *Pofut1*^{cnul} mutants at E14.5, prior to ciliated differentiation, when commitment to a ciliated cell fate has just initiated in proximal airways (Rawlins et al., 2007). Foxj1 immunostaining revealed scattered epithelial labeling in the trachea and main bronchi of E14.5 controls (Fig. 8A). Interestingly, quantitative analysis of Foxj1 labeling in proximal airways (main and lobar bronchi) showed significantly more positive cells in E14.5 *Pofut1*^{cnul} lungs than in controls at the same site (Fig. 8B,G). Nevertheless, there was no evidence that in the mutants, Foxj1-expressing cells were more mature (no β -tubulin detected) or that the ciliated cell program had advanced towards more distal airways. Ki67 epithelial labeling in proximal airways was essentially similar in E14.5 control and mutant lungs (Fig. 8C,D,G). Since previous BrdU studies in Foxj1-EGP mice have shown that ciliated cell precursors do not proliferate (Rawlins et al., 2007), the Ki67-positive cells we observed presumably represented uncommitted

proximal progenitors that were still available for differentiation. Thus, at this stage, Notch does not seem to be crucial for the expansion of proximal progenitors.

We tested whether we could identify early precursors of the secretory lineage in this pool of E14.5 proximal progenitors. Although Cldn10 and Scgb3a2 have been reported in the lung at relatively early stages, their relationship to putative secretory cell progenitors prior to E16.5 remains elusive (Zemke et al., 2008; Kurotani et al., 2008). We stained E14.5 lungs with an anti-Cldn10 antibody and found signals throughout the entire airway epithelium, except for the distal buds, in both control and *Pofut1*^{cnul} lungs (not shown). By contrast, Scgb3a2 immunostaining revealed strong labeling in discrete groups of proximal epithelial cells (Fig. 8E,F). This pattern differed greatly from the more uniform Cldn10 distribution and suggested that, at E14.5, Scgb3a2-positive cells could represent early secretory cell precursors. Quantitative analysis showed a trend towards a decrease in the number of Scgb3a2-expressing cells in the *Pofut1*^{cnul} mutants, which, although not statistically significant, correlated inversely with the increase in the proportion of Foxj1-labeled cells (Fig. 8F,G). These data raise the possibility that although secretory cell differentiation is abrogated in *Pofut1*^{cnul} mutants, the initial stages of the secretory cell program might take place in the absence of Notch. Interestingly, we have evidence that early markers of ciliated and secretory cell fate can be co-expressed at the onset of differentiation. For example, at E15.5, immunofluorescence/confocal analysis showed Foxj1/Scgb3a2 single- and double-labeled cells in proximal regions where this process occurs, whereas labeling was absent in more distal regions (Fig. 8H-J). Thus, our results suggest that Notch acts when commitment to a ciliated or non-ciliated cell fate takes place, restricting ciliated fate in these cells.

Effect of Notch disruption on Sox2 expression

Notch interactions with Sox family transcription factors have been shown to regulate developmental programs in a number of systems (Kiernan et al., 2006; Dabdoub et al., 2008; Okamura and Saga, 2008). In the developing lung, Sox2 is dynamically expressed in non-branching regions of the airways and marks cells initially committed to a proximal cell fate (Ishii et al., 1998; Que et al., 2007; Gontan et al., 2008). Pharmacological inhibition of Notch in the early lung interferes with the establishment of proximal cell fate, resulting in a substantial reduction in the Sox2 expression domain in the forming airways (Tsao et al., 2008).

We hypothesized that the Notch effects in proximal progenitors could be accompanied by changes in Sox2 that are potentially relevant to the *Pofut1*^{cnul} phenotype. Sox2 immunohistochemistry in E14.5 control lungs showed signals throughout the respiratory epithelium, as consistent with previous reports, in ~65% of all epithelial cells (Fig. 9A). At E14.5, Sox2 labeling of *Pofut1*^{cnul} and control lungs was essentially similar in both the pattern and number of labeled cells (Fig. 9A,B). This suggested that Notch is not required to induce or maintain Sox2 expression in proximal progenitors, at least up to E14.5. By contrast, in E18.5 *Pofut1*^{cnul} mutants, Sox2 expression was almost abolished in the lung (Fig. 9F-H). In E18.5 controls, Sox2 was detected mostly in non-ciliated cells, although a few ciliated cells in the trachea and large airways were also labeled (Fig. 9C-E). In mutants, by contrast, only rare Sox2-expressing cells could be seen in the large airways and these appeared to be ciliated or immature cells.

The changes in the Sox2 expression pattern resembled those seen for Ki67 both at E14.5 (Fig. 9B; Fig. 8G) and E18.5 (Fig. 9H; Fig. 7E, compare with 7H). We speculate that in E14.5 airways, Sox2-

Fig. 10. Notch pathway components in the developing airway epithelium. Double immunohistochemistry for Foxj1 (brown, nuclear staining) and in situ hybridization (blue, cytoplasmic staining, arrowheads) for (A,B) *Dll1*, (C,D) *Jag1*, (E,F) *Notch1* and (G,H) *Hes1* in E18.5 control (A,C,E,G) and *Rbpjk^{null}* (B,D,F,H) mouse lungs. *Dll1* expression in the airway epithelium is restricted to neuroendocrine (NE) cells (A,B), whereas *Jag1* is largely associated with Foxj1-expressing cells in both control (C, inset) and mutants (D, note the abundant *Jag1*/Foxj1 double labeling). Conversely, *Notch1* and *Hes1* are preferentially expressed in Foxj1-negative cells, which are presumably secretory cells (E,G). In mutants, epithelial expression of *Notch1* (F) and *Hes1* (H) is greatly decreased or even abolished (asterisk); compare with the strong *Notch1* signals in the mesenchyme (arrowhead in F). Scale bar: 30 μ m.

expressing progenitor cells retain their ability to proliferate and assume different proximal cell fates. This is in agreement with studies in the developing spinal cord showing that Sox2 maintains the proliferative capacity and the pan-neural properties of progenitor cells by inhibiting their terminal differentiation (Graham et al., 2003). Later, as a differentiation program that includes Notch takes place in the airway, Sox2 expression may be silenced in cells that are differentiating into ciliated cells and NE cells, while remaining in others, such as Clara cells. This mechanism could help establish the proper balance of differentiated cell profiles in

different generations of airways. Presumably, Sox2 expression may still be seen in less mature ciliated cells, as suggested by the analysis of our mutants.

Aberrant differentiation is associated with abnormal expression of Notch components

Data from a variety of developing systems suggest that selective expression of a Notch receptor or ligand might define the Notch activation status and fate of a given cell (Radtke and Raj, 2003). There is evidence that NE cells in the developing airways selectively express the ligand *Dll1*, but not *Notch1* or *Hes1*, and that upon disruption of Notch or *Hes1* signaling the NE cells expand (Beckers et al., 1999; Post et al., 2000; Ito et al., 2000; van Tuyl et al., 2005). We asked whether the expansion of the ciliated cell population observed in our mutants was associated with noticeable changes in the expression of Notch pathway components. We performed double in situ hybridization/immunohistochemistry in E18.5 control and *Rbpjk^{null}* lungs using probes for different Notch components and an anti-Foxj1 antibody. In both groups, *Dll1* expression did not overlap with that of Foxj1 and was restricted to NE cells (Fig. 10A,B). By contrast, *Jag1* was expressed by ciliated cells, in some cases in a salt-and-pepper pattern, and was absent from secretory cells in control lungs. Remarkably, this salt-and-pepper pattern was abolished in mutants and nearly all epithelial cells became *Jag1* positive, consistent with their identity as ciliated cells (Fig. 10C,D). Neither *Jag1* nor Foxj1 signals were present in NE cells. Interestingly, in controls, *Notch1* and *Hes1* were expressed at the highest levels in Foxj1-negative cells, whereas in mutants the expression of both genes was greatly downregulated or nearly absent (Fig. 10E-H). Together, the data suggest that Notch signaling might control the balance of cell fate in the developing airways by generating differences in the levels of receptor/ligand among epithelial progenitor cells.

DISCUSSION

Here we provide novel evidence from three distinct models that Notch signaling plays a major role in controlling the number of ciliated and secretory cells during airway differentiation. Targeted disruption of Notch-ligand interactions in *Pofut1^{null}* mice, or targeted inactivation of Notch canonical signaling in *Rbpjk^{null}* mice, resulted in a remarkably similar phenotype characterized by complete ablation of the Clara cell secretory lineage and airways overpopulated with ciliated cells. The presence of the same differentiation defect in the proximal airways of lung explants in which Notch cleavage was prevented by gamma-secretase inhibitor, further supports the idea that these defects resulted from abrogation of Notch signaling in the developing airway epithelium. Moreover, our findings support conclusions from previous reports implicating *Hes1*-mediated canonical Notch signaling in restricting NE differentiation (Ito et al., 2000; Collins et al., 2004; Shan et al., 2007). The phenotype we report is, however, more severe and involves multiple lineages, consistent with a broader disruption of Notch signaling, including *Hes1* targets.

How crucial is Notch signaling for induction of the secretory lineage in the lung? The presence of Scgb3a2-labeled cells in *Pofut1^{null}* lungs at early but not late developmental stages suggests that putative secretory cell precursors might be initially specified but cannot differentiate further in the absence of Notch. To confirm whether Scgb3a2-expressing cells in the E14.5 lung truly represent secretory cell precursors would require a lineage study, which is beyond the scope of the present work. Nevertheless, the substantial increase in the population of ciliated cells without any evidence of

increased cell proliferation or cell death in our mutants supports the idea that, during normal development, Notch selectively suppresses the ciliated and the NE cell programs in proximal progenitors to allow secretory cell differentiation. This is consistent with observations reported in other developing systems, in which Notch also plays a prominent role in balancing different cell fates (Hayes et al., 2007; Stubbs et al., 2006; Deblandre et al., 1999). For example, functional studies in the *Xenopus* embryo suggest that initially, all ectodermal cells of the layer that gives rise to the ciliated cells in the epidermis express a factor that is instructive to the ciliated cell program. The role of Notch is to silence this factor in a subset of cells that is not permitted to differentiate into the ciliated phenotype. This appears to involve a classical mechanism of Notch-mediated lateral inhibition in which transient expression of the ligand Delta selectively in ciliated cell precursors prevents them from activating Notch. Meanwhile, Notch activity in neighboring cells fosters non-ciliated cell differentiation. Disruption of canonical Notch signaling in this system results in a dramatic increase in the number of ciliated cells, as in our mouse mutants. Conversely, constitutive activation of Notch signaling in the *Xenopus* skin by expression of a Notch intracellular domain inhibits ciliated cell differentiation (Deblandre et al., 1999).

Evidence of a similar mechanism controlling ciliated cell differentiation during zebrafish kidney development and neuronal differentiation during *Xenopus* neurogenesis suggests that this role of Notch has been highly conserved (Liu et al., 2007; Wettstein et al., 1997). How does this relate to the mammalian lung? Interestingly, the overall mechanism controlling ciliated cell fate in the developing *Xenopus* skin seems to be analogous to the one we have described for the mouse lung epithelium. In both cases, expression of a Notch ligand in progenitor cells is associated with the ciliated cell phenotype. However, our data suggest that instead of Dll1, the most probable ligand implicated in this process is Jag1. Future studies will explore these observations further.

The function of Clara cells is not fully understood, in part owing to the lack of adequate experimental models. Much of what is currently known about the role of Clara cells in airway homeostasis has been inferred from analysis of *CC10*-null mice. These mice appear to phenocopy pathological aspects described in conditions such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD), asthma and cystic fibrosis (Stripp et al., 2002). However, these studies focused on CC10 instead of on the Clara cell itself.

Although we have not focused on postnatal development, our model nevertheless offered a unique opportunity to observe the impact of a lack of Clara cells on airway homeostasis during the initial weeks of life. We found histological evidence of epithelial damage and an abnormal adaptive response of the epithelium to the postnatal environment in *Pofut1^{cnul}* lungs. A striking feature of these airways was the flattening of the epithelium, which is reminiscent of the metaplastic changes reported in naphthalene-injured lungs after Clara cell ablation (Stripp et al., 1995; Rawlins and Hogan, 2006). In the naphthalene model, the squamous metaplastic cells derived from the ciliated cells spread beneath the injured Clara cells to maintain the integrity of the airway epithelium and eventually lead to repair (Park et al., 2006). Analysis of *CC10*-null mice shows that loss of CC10 by itself may already lead to extensive epithelial damage if animals are exposed to ozone (Johnston et al., 1999). We speculate that the absence of Clara cells in our mutants results in changes in the epithelium and its lining fluid that greatly increase its susceptibility to damage by environmental agents such as oxygen.

In conclusion, our study provides strong *in vivo* evidence that Notch signaling is crucial to balance different cellular phenotypes in the developing airway. It is noteworthy that the differentiation profile of the airway epithelium can be profoundly altered in the adult lung under chronic inflammatory conditions. Thus, it is possible that changes in Notch might also play a major role in pathological responses of the respiratory epithelium in conditions such as asthma and COPD. Consistent with this hypothesis, a recent analysis of the airway transcriptome in human subjects has shown substantial differences in the expression of Notch components associated with smoking and COPD (Tilley et al., 2009).

Note added in proof

Since completion of this article, a complementary Notch gain-of-function approach has been published showing aberrant formation of mucous cells and decreased ciliated cells (Guseh et al., 2009).

We thank Pamela Stanley, Tasuku Honjo and Cliff Tabin for the mouse mutants; Steven Brody, G. Singh, S. Katyal and Shiko Kimura for providing valuable antibodies; Felicia Chen and Mary Williams for thoughtful discussions; and Leah Cushing, Fengzhi Shao and Ann Hinds for their help in performing some of the experiments. This work was supported by grants from NIH/NHLBI (PO1 HL47049 to W.V.C.) and by a NHRI-Taiwan-Physician Scientist Award (PS9402 to P.-N.T.). Deposited in PMC for release after 12 months.

Supplementary material

Supplementary material for this article is available at <http://dev.biologists.org/cgi/content/full/136/13/2297/DC1>

References

- Beckers, J., Clark, A., Wunsch, K., Hrabé De Angelis, M. and Gossler, A. (1999). Expression of the mouse Delta1 gene during organogenesis and fetal development. *Mech. Dev.* **84**, 165-168.
- Brody, S. L., Yan, X. H., Wuerffel, M. K., Song, S. K. and Shapiro, S. D. (2000). Ciliogenesis and left-right axis defects in forkhead factor Hfh-4-null mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **23**, 45-51.
- Cardoso, W. V. and Lü, J. (2006). Regulation of early lung morphogenesis: questions, facts and controversies. *Development* **133**, 1611-1624.
- Chen, F., Desai, T. J., Qian, J., Niederreither, K., Lü, J. and Cardoso, W. V. (2007). Inhibition of Tgf beta signaling by endogenous retinoic acid is essential for primary lung bud induction. *Development* **134**, 2969-2979.
- Collins, B. J., Kleeberger, W. and Ball, D. W. (2004). Notch in lung development and lung cancer. *Semin. Cancer Biol.* **14**, 357-364.
- Dabdoub, A., Puligilla, C., Jones, J. M., Fritzsche, B., Cheah, K. S., Pevny, L. H. and Kelley, M. W. (2008). Sox2 signaling in prosensory domain specification and subsequent hair cell differentiation in the developing cochlea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 18396-18401.
- Dang, T. P., Eichenberger, S., Gonzalez, A., Olson, S. and Carbone, D. P. (2003). Constitutive activation of Notch3 inhibits terminal epithelial differentiation in lungs of transgenic mice. *Oncogene* **22**, 1988-1997.
- Daniely, Y., Liao, G., Dixon, D., Linnoila, R. I., Lori, A., Randell, S. H., Oren, M. and Jetten, A. M. (2004). Critical role of p63 in the development of a normal esophageal and tracheobronchial epithelium. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **287**, 171-181.
- Deblandre, G. A., Wettstein, D. A., Koyano-Nakagawa, N. and Kintner, C. (1999). A two-step mechanism generates the spacing pattern of the ciliated cells in the skin of *Xenopus* embryos. *Development* **126**, 4715-4728.
- Evans, C. M., Williams, O. W., Tuvim, M. J., Nigam, R., Mixides, G. P., Blackburn, M. R., DeMayo, F. J., Burns, A. R., Smith, C., Reynolds, S. D. et al. (2004). Mucin is produced by clara cells in the proximal airways of antigen-challenged mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **31**, 382-394.
- Franks, T. J., Colby, T. V., Travis, W. D., Tuder, R. M., Reynolds, H. Y., Brody, A. R., Cardoso, W. V., Crystal, R. G., Drake, C. J., Engelhardt, J. et al. (2008). Resident cellular components of the human lung: current knowledge and goals for research on cell phenotyping and function. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **15**, 763-766.
- Gontan, C., de Munck, A., Vermeij, M., Grosveld, F., Tibboel, D. and Rottier, R. (2008). Sox2 is important for two crucial processes in lung development: branching morphogenesis and epithelial cell differentiation. *Dev. Biol.* **317**, 296-309.
- Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P. and Pevny, L. (2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* **39**, 749-765.
- Gridley, T. (2007). Notch signaling in vascular development and physiology. *Development* **134**, 2709-2718.

- Guilmeau, S., Flandez, M., Bancroft, L., Sellers, R. S., Tear, B., Stanley, P. and Augenlicht, L. H. (2008). Intestinal deletion of Pofut1 in the mouse inactivates notch signaling and causes enterocolitis. *Gastroenterology* **135**, 849-860.
- Guseh, J. S., Bores, S. A., Stanger, B. Z., Zhou, Q., Anderson, W. J., Melton, D. A. and Rajagopal, J. (2009). Notch signaling promotes airway mucous metaplasia and inhibits alveolar development. *Development* **136**, 1751-1759.
- Han, H., Tanigaki, K., Yamamoto, N., Kuroda, K., Yoshimoto, M., Nakahata, T., Ikuta, K. and Honjo, T. (2002). Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. *Int. Immunol.* **14**, 637-645.
- Harfe, B. D., Scherz, P. J., Nissim, S., Tian, H., McMahon, A. P. and Tabin, C. J. (2004). Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell* **118**, 517-528.
- Harris, K. S., Zhang, Z., McManus, M. T., Harfe, B. D. and Sun, X. (2006). Dicer function is essential for lung epithelium morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 2208-2213.
- Hayes, J. M., Kim, S. K., Abitua, P. B., Park, T. J., Herrington, E. R., Kitayama, A., Grow, M. W., Ueno, N. and Wallingford, J. B. (2007). Identification of novel ciliogenesis factors using a new *in vivo* model for mucociliary epithelial development. *Dev. Biol.* **312**, 115-130.
- Ishii, Y., Rex, M., Scotting, P. J. and Yasugi, S. (1998). Region-specific expression of chicken Sox2 in the developing gut and lung epithelium: regulation by epithelial-mesenchymal interactions. *Dev. Dyn.* **213**, 464-475.
- Ito, T., Udana, N., Yazawa, T., Okudela, K., Hayashi, H., Sudo, T., Guillemot, F., Kageyama, R. and Kitamura, H. (2000). Basic helix-loop-helix transcription factors regulate the neuroendocrine differentiation of fetal mouse pulmonary epithelium. *Development* **127**, 3913-3921.
- Johnston, C. J., Finkelstein, J. N., Oberdörster, G., Reynolds, S. D. and Stripp, B. R. (1999). Clara cell secretory protein-deficient mice differ from wild-type mice in inflammatory chemokine expression to oxygen and ozone, but not to endotoxin. *Exp. Lung Res.* **25**, 7-21.
- Kiernan, A. E., Xu, J. and Gridley, T. (2006). The Notch ligand JAG1 is required for sensory progenitor development in the mammalian inner. *PLoS Genet.* **2**, e4.
- Kong, Y., Glickman, J., Subramaniam, M., Shahsafaei, A., Allamneni, K. P., Aster, J. C., Sklar, J. and Sunday, M. E. (2004). Functional diversity of notch family genes in fetal lung development. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **286**, 1075-1083.
- Kurotani, R., Tomita, T., Yang, Q., Carlson, B. A., Chen, C. and Kimura, S. (2008). Role of secretoglobin 3A2 in lung development. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **178**, 389-398.
- Linnoila, R. I. (2006). Functional facets of the pulmonary neuroendocrine system. *Lab. Invest.* **86**, 425-444.
- Liu, Y., Pathak, N., Kramer-Zucker, A. and Drummond, I. A. (2007). Notch signaling controls the differentiation of transporting epithelia and multiciliated cells in the zebrafish pronephros. *Development* **134**, 1111-1122.
- Lü, J., Qian, J., Izvolsky, K. I. and Cardoso, W. V. (2004). Global analysis of genes differentially expressed in branching and non-branching regions of the mouse embryonic lung. *Dev. Biol.* **273**, 418-435.
- Maeda, Y., Davé, V. and Whitsett, J. A. (2007). Transcriptional control of lung morphogenesis. *Physiol. Rev.* **87**, 219-244.
- McDowell, E. M., Newkirk, C. and Coleman, B. (1985). Development of hamster tracheal epithelium: I. A quantitative morphologic study in the fetus. *Anat. Rec.* **213**, 429-447.
- Murtaugh, L. C., Stanger, B. Z., Kwan, K. M. and Melton, D. A. (2003). Notch signaling controls multiple steps of pancreatic differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 14920-14925.
- Okajima, T. and Matsuda, T. (2006). Roles of O-fucosyltransferase 1 and O-linked fucose in notch receptor function. *Methods Enzymol.* **417**, 111-126.
- Okamura, Y. and Saga, Y. (2008). Notch signaling is required for the maintenance of enteric neural crest progenitors. *Development* **135**, 3555-3565.
- Otani, E. M., Newkirk, C. and McDowell, E. M. (1986). Development of hamster tracheal epithelium: IV. Cell proliferation and cytodifferentiation in the neonate. *Anat. Rec.* **214**, 183-192.
- Park, K. S., Wells, J. M., Zorn, A. M., Wert, S. E., Laubach, V. E., Fernandez, L. G. and Whitsett, J. A. (2006). Transdifferentiation of ciliated cells during repair of the respiratory epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **34**, 151-115.
- Post, L. C., Ternet, M. and Hogan, B. L. (2000). Notch/Delta expression in the developing mouse lung. *Mech. Dev.* **98**, 95-98.
- Que, J., Okubo, T., Goldenring, J. R., Nam, K. T., Kurotani, R., Morrissey, E. E., Taranova, O., Pevny, L. H. and Hogan, B. L. (2007). Multiple dose-dependent roles for Sox2 in the patterning and differentiation of anterior foregut endoderm. *Development* **134**, 2521-2531.
- Radtke, F. and Raj, K. (2003). The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat. Rev. Cancer* **3**, 756-767.
- Ramirez, M. I., Millien, G., Hinds, A., Cao, Y., Seldin, D. C. and Williams, M. C. (2003). T1alpha, a lung type I cell differentiation gene, is required for normal lung cell proliferation and alveolus formation at birth. *Dev. Biol.* **256**, 61-72.
- Rawlins, E. L. and Hogan, B. L. (2006). Epithelial stem cells of the lung: privileged few or opportunities for many? *Development* **133**, 2455-2465.
- Rawlins, E. L., Ostrowski, L. E., Randell, S. H. and Hogan, B. L. (2007). Lung development and repair: contribution of the ciliated lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 410-417.
- Reynolds, S. D., Reynolds, P. R., Pryhuber, G. S., Finder, J. D. and Stripp, B. R. (2002). Secretoglobins SCGB3A1 and SCGB3A2 define secretory cell subsets in mouse and human airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **166**, 1498-1509.
- Rogers, D. F. (2003). The airway goblet cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**, 1-6.
- Sasamura, T., Ishikawa, H. O., Sasaki, N., Higashi, S., Kanai, M., Nakao, S., Ayukawa, T., Aigaki, T., Noda, K., Miyoshi, E. et al. (2007). The O-fucosyltransferase O-fut1 is an extracellular component that is essential for the constitutive endocytic trafficking of Notch in Drosophila. *Development* **134**, 1347-1356.
- Shan, L., Aster, J. C., Sklar, J. and Sunday, M. E. (2007). Notch-1 regulates pulmonary neuroendocrine cell differentiation in cell lines and in transgenic mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **292**, 500-509.
- Shi, S. and Stanley, P. (2003). Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 5234-5239.
- Shi, S., Stahl, M., Lu, L. and Stanley, P. (2005). Canonical Notch signaling is dispensable for early cell fate specifications in mammals. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 9503-9508.
- Stripp, B. R., Maxson, K., Mera, R. and Singh, G. (1995). Plasticity of airway cell proliferation and gene expression after acute naphthalene injury. *Am. J. Physiol.* **269**, 791-799.
- Stripp, B. R., Reynolds, S. D., Boe, I. M., Lund, J., Power, J. H., Coppens, J. T., Wong, V., Reynolds, P. R. and Plopper, C. G. (2002). Clara cell secretory protein deficiency alters clara cell secretory apparatus and the protein composition of airway lining fluid. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **27**, 170-178.
- Stubbs, J. L., Davidson, L., Keller, R. and Kintner, C. (2006). Radial intercalation of ciliated cells during Xenopus skin development. *Development* **133**, 2507-2515.
- Tilley, A. E., Harvey, B. G., Heguy, A., Hackett, N. R., Wang, R., O'Connor, T. P. and Crystal, R. G. (2009). Downregulation of the notch pathway in human airway epithelium in association with smoking and COPD. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **179**, 457-466.
- Toskala, E., Smiley-Jewell, S. M., Wong, V. J., King, D. and Plopper, C. G. (2005). Temporal and spatial distribution of ciliogenesis in the tracheobronchial airways of mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **283**, 454-459.
- Tsao, P. N., Chen, F., Izvolsky, K. I., Walker, J., Kukuruzinska, M. A., Lu, J. and Cardoso, W. V. (2008). Gamma-secretase activation of notch signaling regulates the balance of proximal and distal fates in progenitor cells of the developing lung. *J. Biol. Chem.* **283**, 29532-29544.
- van Es, J. H., van Gijn, M. E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D. J., Radtke, F. et al. (2005). Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* **435**, 959-963.
- van Tuyl, M., Groenman, F., Kuliszewski, M., Ridsdale, R., Wang, J., Tibboel, D. and Post, M. (2005). Overexpression of lunatic fringe does not affect epithelial cell differentiation in the developing mouse lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **288**, 672-682.
- Warburton, D., Perin, L., Defilippo, R., Bellusci, S., Shi, W. and Driscoll, B. (2008). Stem/progenitor cells in lung development, injury repair, and regeneration. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **15**, 703-706.
- Weibel, E. R. (1984). Lung cell biology. In *The Pathway for Oxygen: Structure and Function in the Mammalian Respiratory System*, pp. 231-233. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Weinmaster, G. and Kopan, R. (2006). A garden of Notch-ly delight. *Development* **133**, 3277-3282.
- Wettstein, D. A., Turner, D. L. and Kintner, C. (1997). The Xenopus homolog of Drosophila Suppressor of Hairless mediates Notch signaling during primary neurogenesis. *Development* **124**, 693-702.
- Zemke, A. C., Snyder, J. C., Brockway, B. L., Drake, J. A., Reynolds, S. D., Kaminski, N. and Stripp, B. R. (2009). Molecular staging of epithelial maturation using secretory cell-specific genes as markers. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **40**, 340-348.

ARTIGOS PUBLICADOS

ANEXO B - Activation dynamics and signaling properties of Notch3 in the developing pulmonary artery. Shamik Ghosh¹, Jesus R. Paez-Cortez, Karthik Boppidi, **Michelle Vasconcelos**, Monideepa Roy, Wellington Cardoso, Xingbin Ai, and Alan Fine. J Biol Chem. 2011 Jun 24;286(25):22678-87. Epub 2011 May 2.#

Activation Dynamics and Signaling Properties of Notch3 Receptor in the Developing Pulmonary Artery^{*[5]}

Received for publication, March 17, 2011, and in revised form, April 20, 2011. Published, JBC Papers in Press, May 2, 2011, DOI 10.1074/jbc.M111.241224

Shamik Ghosh^{†1}, Jesus R. Paez-Cortez^{†1}, Karthik Boppidi[‡], Michelle Vasconcelos[‡], Monideepa Roy[§], Wellington Cardoso[‡], Xingbin Ai[‡], and Alan Fine^{‡2}

From the [†]Pulmonary Center, Boston University School of Medicine, Boston, Massachusetts 02118, and the [§]Department of Pathology, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115

Notch3 signaling is fundamental for arterial specification of systemic vascular smooth muscle cells (VSMCs). However, the developmental role and signaling properties of the Notch3 receptor in the mouse pulmonary artery remain unknown. Here, we demonstrate that Notch3 is expressed selectively in pulmonary artery VSMCs, is activated from late fetal to early postnatal life, and is required to maintain the morphological characteristics and smooth muscle gene expression profile of the pulmonary artery after birth. Using a conditional knock-out mouse model, we show that Notch3 receptor activation in VSMCs is Jagged1-dependent. *In vitro* VSMC lentivirus-mediated Jagged1 knockdown, confocal localization analysis, and co-culture experiments revealed that Notch3 activation is cell-autonomous and occurs through the physical engagement of Notch3 and VSMC-derived Jagged1 in the interior of the same cell. Although the current models of mammalian Notch signaling involve a two-cell system composed of a signal-receiving cell that expresses a Notch receptor on its surface and a neighboring signal-sending cell that provides membrane-bound activating ligand, our data suggest that pulmonary artery VSMC Notch3 activation is cell-autonomous. This unique mechanism of Notch activation may play an important role in the maturation of the pulmonary artery during the transition to air breathing.

Lung development involves the integration of multiple signaling pathways to ensure coordinated growth and differentiation of airway and vascular structures (1). The initial event in vessel development is the formation of basic tubular structures from endothelial precursors (2). Under the influence of PDGF- β and Wnt signaling (3, 4), formation of mature vessels occurs by the stepwise recruitment, growth, and differentiation of mesenchymal precursors into a circumferential mural cell layer composed of smooth muscle cells and pericytes (5).

It is noteworthy that the lung vascular system is subjected to a dramatic switch at birth, from a low-flow, low-pressure fetal state to a high-flow, higher pressure postnatal state (1). Although it is recognized as an essential feature of the transition

from intrauterine life, the timing and identification of signals that control how lung vascular cells adapt to this changeover remain unclear. The involvement of Notch signals in multiple aspects of vessel development led us to investigate the role of this pathway during this transition period.

The Notch signaling pathway is highly conserved across species, controlling cell fate decisions and tissue patterning during development (6). In classical Notch signaling, a cell surface Notch receptor is activated by binding with a membrane-bound ligand delivered by a neighboring signal-sending cell (7). This interaction initiates a series of proteolytic cleavages that release the Notch intracellular domain into the cytoplasm of the signal-receiving cell before translocation to the nucleus and induction of target gene transcription (8, 9).

Of the four mammalian Notch receptors, Notch3 is expressed predominantly in vascular smooth muscle cells (VSMCs)³ (10, 11). Notch3 regulates arterial specification of VSMCs in fetal systemic arteries (12). In the developing retinal vasculature, Notch3 deletion impairs mural cell recruitment, resulting in progressive loss of vessel coverage (13). Its role, however, in pulmonary artery development has not yet been examined. Of note, Notch3 serves as a sensor of hemodynamic stress (14) and is involved in vascular tone regulation (15), two properties unique to this receptor. Furthermore, Notch3 has several structural features that differ from other Notch family members, including a lack of transactivation domain, a smaller number of EGF-like repeats, and a distinctive ligand-binding domain (16), thereby raising the possibility that Notch3 activation may occur through a mechanism that is distinct from classical Notch signaling. In this context, recent studies in *Drosophila* demonstrated an alternative mode of Notch activation that is cell-autonomous and occurs inside the cell (17, 18).

In this study, we show that Notch3 is expressed selectively in pulmonary artery VSMCs and is active from late fetal to early postnatal life. Our data point to a key role for Notch3 in the final stages of VSMC maturation during the adaptation to postnatal life. Most notably, we provide evidence indicating that Notch3 signaling in pulmonary artery VSMCs occurs through a unique cell-autonomous mechanism that is dependent on an interaction with Jagged1 in the interior of VSMCs.

^{*} This work was supported, in whole or in part, by National Institutes of Health Grant HL-089795. This work was also supported by a grant from the United States Army Medical Research Acquisition Activity.

^[5] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. S1–S8 and Tables 1–5.

[†] Both authors contributed equally to this work.

² To whom correspondence should be addressed: Pulmonary Center, R-304, Boston University School of Medicine, 80 East Concord St., Boston, MA 02118. Tel.: 617-638-4860; Fax: 617-536-8093; E-mail: afine@bu.edu.

³ The abbreviations used are: VSMC, vascular smooth muscle cell; hrGFP, humanized *R. reniformis* GFP; α -SMA, α -smooth muscle actin; N3ECD, Notch3 extracellular domain; RPASMC, rat pulmonary artery smooth muscle cell; qPCR, quantitative real-time PCR; eGFP, enhanced GFP; E, embryonic day; N3ICD, Notch3 intracellular domain.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals—Pregnant CD1 mice were obtained from Charles River Laboratories (Wilmington, MA). *Notch3*^{-/-} mice were provided by Dr. Thomas Gridley (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). A transgenic mouse (α -SMA-hrGFP) that expresses humanized *Renilla reniformis* GFP (hrGFP; Stratagene, Cedar Creek, TX) under the control of the rat α -smooth muscle actin (*SMA*) gene promoter was generated. In brief, the rat *SMA* promoter was ligated into the multiple cloning site of the phrGFP vector (Stratagene) immediately upstream of sequences that encode hrGFP. The promoter fragment consists of 2.6 kb of sequence upstream of the transcription start site and all of intron 1 from the rat *SMA* gene. A linearized construct was microinjected into pronuclei of fertilized C57/Bl6 eggs before implantation in foster mothers. A founder line containing two copies of the transgene (as determined by quantitative Southern hybridization) was chosen. These mice selectively express hrGFP in smooth muscle cell populations *in vivo*. *Notch3*^{-/-} α -SMA-hrGFP mice were generated by crossing *Notch3*^{-/-} and α -SMA-hrGFP mice. *Jagged1*^{flox/flox} mice were provided by Dr. Nadean Brown (Cincinnati Children's Hospital, Cincinnati, OH). To selectively delete VSMC *Jagged1*, *Jagged1*^{flox/flox} mice were crossed with *sma22 α 945*, *Cre* (*Sma-22*^{cre/cre}) mice (The Jackson Laboratory). Animal studies were approved by the Boston University Institutional Animal Care and Use Committee.

Antibodies—A goat polyclonal antibody directed to the mouse Notch3 extracellular domain (N3ECD; Sf21 recombinant mouse Notch3 amino acids 40–486) was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). Goat anti-Notch3 polyclonal antibodies directed to the extracellular (Q-14) and intracellular (M-134) domains and goat anti-Jagged1 polyclonal antibody (C-20) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). A directly conjugated hamster anti-N3ECD monoclonal antibody (HMN3-133) was purchased from BioLegend (San Diego, CA). For Western blot analysis of rat cells, rat anti-N3ICD monoclonal antibody (8G5) from Cell Signaling Technology (Danvers, MA) was used. Antibodies directed to CD45 (30-F11) and CD31 (MEC 13.3) were obtained from Pharmingen. Biotinylated anti- α -SMA antibody (1A4) was purchased from Thermo Scientific (Waltham, MA). Cy2-conjugated donkey anti-rabbit IgG and Cy3-conjugated anti-goat IgG were obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). Alexa Fluor 488-, 568-, and 647-conjugated anti-rabbit and anti-goat antibodies were purchased from Invitrogen. For Western blot analysis, anti-Jagged1 antibody obtained from Cell Signaling Technology was used. For all flow cytometry studies, conjugated isotype antibodies were used as controls.

Immunohistochemistry and Immunofluorescence—Lungs were fixed with 4% formalin, paraffin-embedded, sectioned, deparaffinized, and subjected to antigen retrieval before application of primary antibodies and incubation with HRP-conjugated or fluorescence-conjugated antibodies. Details are provided in supplemental Table 1.

In Situ Hybridization—*In situ* hybridization was performed on 10- μ m lung sections using digoxigenin-UTP-labeled *Hey1*

and *Hey2* riboprobes as described previously (19). See supplemental Table 2 for probe details.

Cell Isolation—Cell suspensions were obtained by digesting lungs with 0.1% collagenase A (Roche Diagnostics), 2.4 units/ml Dispase (Roche Diagnostics), and 6 units/ml DNase I (Qiagen, Valencia, CA) at 37 °C for 1 h. Neonatal rat pulmonary artery smooth muscle cells (RPASMCs) were isolated as described (20).

Confocal Microscopy—Cells were cultured for 48 h, fixed with 4% paraformaldehyde, and permeabilized with 0.25% Triton X-100 in PBS before addition of primary and fluorochrome-conjugated secondary antibodies. Images were captured using a Zeiss LSM 510 confocal laser microscope and analyzed using NIH ImageJ browser software. Further details are provided in supplemental Table 3.

Western Blotting and Immunoprecipitation—Lung cells were obtained as described above. CD45⁺ and CD31⁺ cells were depleted from lung preparations by incubation with biotinylated anti-mouse CD45 and CD31 antibodies for 30 min on ice. After washing, biotin-binding magnetic beads (Dynabeads, Invitrogen) were added before submission to a magnetic field. The non-binding cell fraction was lysed in radioimmune precipitation assay buffer in the presence of protease inhibitors (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml aprotinin, and 1 μ g/ml pepstatin A) for 30 min at 4 °C. Protein concentration was measured in the supernatant using the Bradford assay. For analysis, 80 μ g of protein was separated through a 4–12% SDS-polyacrylamide gel before electrophoretic transfer to a PVDF membrane. Membranes were blocked with 2% BSA in TBS for 1 h. Blots were probed with anti-N3ICD (1:200) or anti-Jagged1 (1:200) antibody. Antigen-antibody complexes were identified with HRP-conjugated secondary antibodies. Enhanced chemiluminescence was used for detection. For immunoprecipitation, equal amounts of protein lysates were incubated with anti-N3ECD antibody for 3 h at 4 °C. Immune complexes were collected by incubation with protein A-Sepharose for 2 h before washing with PBS, separation by SDS-PAGE, and electrophoretic transfer to a PVDF membrane. Western blotting was performed with anti-Jagged1 or anti-N3ECD antibody as described above.

Flow Cytometry and Cell Sorting—Non-permeabilized and permeabilized cells were stained with fluorochrome-conjugated mouse-specific monoclonal antibodies prior to analysis. Permeabilization was achieved using BD Cytotfix/Cytoperm solution (BD Biosciences). Flow cytometry was performed on an LSR II cytometer (BD Biosciences), and data were analyzed using FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, OR). Antibody conditions are detailed in supplemental Table 4. hrGFP⁺ cells were collected from lung cell suspensions of α -SMA-hrGFP mice using a MoFlo cell sorter (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

Real-time PCR Analysis—RNA was isolated using an RNeasy mini kit (Qiagen). cDNA was transcribed using the Promega reverse transcription system. Quantitative real-time PCR (qPCR) was performed in a StepOne Plus instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA). All assays were performed in triplicate at two different cDNA concentrations to ensure that the amplification efficiencies for reference genes and genes of

FIGURE 1. **Pulmonary artery morphology and smooth muscle marker gene expression profiles in WT and Notch3^{-/-} mice at E18.5 and postnatal day 3 and in the adult.** A, α -SMA expression pattern in WT and Notch3^{-/-} mouse pulmonary artery segments. B, smooth muscle gene expression profiles as determined by qPCR of whole lung RNA in WT (white bars) and Notch3^{-/-} (black bars) mice. Smmhc, smooth muscle myosin heavy chain. Data show means $\pm$ S.D. and are representative of three independent experiments. NS, not significant; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

interest were the same. Reactions were normalized to 18 S rRNA. All TaqMan[®] probes were obtained from Applied Biosystems. For contractile smooth muscle-related genes, qPCR was performed with fast SYBR reagent (Invitrogen) as described (21). GAPDH was used as an internal control. After PCR, a melting curve was constructed in the range of 60–95 °C to evaluate the specificity of the amplification. See supplemental Table 5 for TaqMan primer details.

Cell Culture—Primary RPASMCs were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS. The rat alveolar macrophage NR8383 cell line was purchased from American Type Culture Collection and maintained as recommended. For inhibition of γ -secretase activity, RPASMCs were cultured in the presence of either 10 μ M DAPT dissolved in Me₂SO or only Me₂SO for 72 h.

Lentivirus-mediated Jagged1 Knockdown—Jagged1 shRNA or scrambled shRNA (22) was cloned into the pLVTHM lentiviral vector (23), a kind gift of Dr. D. Trono (Ecole Polytechnique Fédérale, Lausanne, Switzerland). Replication-incompetent lentivirus was created using a five-plasmid transfection procedure (24). All viral supernatants were concentrated ~100-fold by ultracentrifugation. Titering of all vectors was performed by infection of FG293 cells. RPASMCs were transduced with a single exposure at a multiplicity of infection of 100. Infected cells were identified by enhanced GFP (eGFP) expression. Jagged1 knockdown was confirmed by qPCR and

Western blot analysis. Co-culturing of the wild type with Jagged1 or scrambled shRNA-transduced cells was performed at a 1:1 ratio for 72 h prior to collection by cell sorting.

Cell Transfection—Plasmids containing cDNAs encoding the mouse N3ICD or full-length Notch3 fused to GFP (25) were gifts of Dr. J. Arboleda-Velasquez (Harvard Medical School, Boston, MA). Neonatal RPASMCs and 293T cells were transiently transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). After transfection, cells were stained with anti-GFP antibody (Millipore) for microscopic analysis.

Cell Surface Biotinylation—To enrich for surface proteins, cell surface biotinylation of RPASMCs was performed using a cell surface protein biotinylation kit (Pierce). During the biotinylation procedure, all reagents and cultures were kept on ice. In brief, RPASMC cultures were washed with ice-cold PBS and then incubated in EZ-Link NHS-SS-biotin reagent for 30 min. Excess biotin was blocked with glycine. Cells were washed again with glycine buffer and lysed. Lysates were rocked for 1 h on a NeutrAvidin-agarose column. Non-biotinylated internal fractions were collected by washing the column with wash buffer, and biotinylated external proteins were collected by elution with 50 μ M DTT. Western blotting was performed using anti-N3ECD, anti-Jagged1, and anti-p53 antibodies in the biotinylated extracellular fraction, non-biotinylated intracellular fraction, and total cell lysates.

FIGURE 2. **Notch3 expression and activation in developing and adult lungs.** A, N3ECD expression at E14.5 and E18.5 and in the adult. B, N3ICD expression in developing and adult lungs. *Insets* show higher power views of perinuclear (E14.5 and adult) and nuclear (E18.5) N3ICD localization. Scale bars = 20 μ m. C, Western blot analysis for cleaved N3ICD in E18.5 and adult lung lysates. β -Actin was used as a loading control. D, relative *Hey1* and *Hey2* mRNA expression in E14.5 (gray bars), E18.5 (white bars), and adult (black bars) hrGFP⁺ lung cells. E, non-isotopic *in situ* hybridization for *Hey1* and *Hey2* mRNAs showing restricted VSMC (arrows) expression in E18.5 lungs. Ep, airway epithelium. F, relative *Hey1* and *Hey2* mRNA expression in WT (white bars) and *Notch3*^{-/-} (black bars) E18.5 hrGFP⁺ lung cells. qPCR data show means $\pm$ S.D. and are representative of three independent experiments. **, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$.

Statistical Analysis—Data are presented as means $\pm$ S.D. Statistical analysis was performed using Student's *t* test. Significant differences were determined as $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$.

RESULTS

Abnormal Pulmonary Artery Morphology and Smooth Muscle Marker Gene Expression in *Notch3*^{-/-} Mice—To evaluate the contribution of Notch3 receptor signaling in pulmonary artery development, we compared the morphology of vessels stained with anti- α -SMA antibody in WT and *Notch3*^{-/-} mice. The pulmonary arteries in WT and *Notch3*^{-/-} embryos at embryonic day (E) 18.5 appeared grossly similar (Fig. 1A). At postnatal day 3, however, VSMCs in *Notch3*^{-/-} mice were dysmorphic, non-cohesive, and vacuolated and showed a disorganized distribution of SMA (Fig. 1A). Alterations in the α -SMA staining pattern and the morphology of smooth muscle cells persisted into adulthood, although the changes were less pronounced than at postnatal day 3 (Fig. 1A). To determine whether these morphological abnormalities are associated with changes in expression of smooth muscle-related genes in the *Notch3*^{-/-} mouse, we quantified mRNAs for transgelin (*Sma22*), α -SMA, γ -SMA, smoothelin, and calponin as described (21). At all ages examined, down-regulation of these genes was observed in *Notch3*^{-/-} mice (Fig. 1B). In contrast, the morphology of bronchial smooth

muscle was not affected in *Notch3*^{-/-} mice (data not shown), consistent with the restricted expression of Notch3 to VSMCs (supplemental Fig. S1A).

Temporal Expression and Activation of Notch3 in the Developing Lung—Using an antibody directed against the N3ECD, we found that this receptor is expressed in lung arterial VSMCs from E14.5 into adulthood (Fig. 2A). To determine the kinetics of Notch3 activation, the cellular localization of the Notch3 intracellular domain (N3ICD) was determined. As discussed, the N3ICD arises from a γ -secretase-dependent cleavage that follows receptor activation, before translocation to the nucleus (26). For this analysis, we employed an antibody previously shown to identify the mouse N3ICD (27); the specificity of this antibody was further confirmed by the lack of positive VSMC staining in the *Notch3*^{-/-} mouse lung (supplemental Fig. S1B). We found that the N3ICD was distributed in the cytoplasm of lung VSMCs at E14.5 (Fig. 2B) but in the nucleus at E18.5, indicating active Notch3 signaling at late gestation (Fig. 2B, *inset*). N3ICD nuclear localization persisted until postnatal day 5 (data not shown) before reverting to a perinuclear distribution in adult VSMCs (Fig. 2B). Consistent with the timing of nuclear localization of the N3ICD (Fig. 2B), cleaved N3ICD protein was found in E18.5 lysates but was absent in adult lysates as determined by Western blot analysis (Fig. 2C).

FIGURE 3. Jagged1 expression in developing and adult lungs. A, absolute mRNA copy number for Notch3 ligands in E18.5 (white bars) and adult (black bars) hrGFP⁺ lung cells. Data show means $\pm$ S.D. and are representative of three independent experiments. ***, $p < 0.001$. B–D, Jagged1 protein expression in lung at E14.5 (B) and E18.5 (C) and in the adult (D). *, endothelium; Ep, epithelium (arrowhead); arrows, VSMCs. The inset in D shows a high-magnification view of diminished Jagged1 expression in adult VSMCs. Scale bars = 20 μ m.

Notch3 activation has been shown to promote RBP-Jk-mediated induction of *Hey1* and *Hey2* mRNAs in VSMCs *in vitro* and *in vivo* (28). Therefore, to confirm the temporal dynamics of Notch3 signaling in the pulmonary artery, we evaluated the relative expression of *Hey1* and *Hey2* in isolated smooth muscle cells. For isolation of pulmonary artery VSMCs, a transgenic mouse that expresses hrGFP under the control of the rat α -SMA promoter (α -SMA-hrGFP) was generated. In the α -SMA-hrGFP mouse, hrGFP co-localized exclusively with α -SMA-expressing smooth muscle cells of the pulmonary artery and bronchial tubes (supplemental Fig. S2). hrGFP⁺ cells were collected from E18.5 and adult lungs, and the levels of *Hey1* and *Hey2* were determined by qPCR. *Hey1* and *Hey2* mRNA levels were significantly higher at E18.5 compared with E14.5 or adult lungs (Fig. 2D), consistent with the timing of Notch3 activation (Fig. 2, B and C).

To further validate that the time-restricted up-regulation of *Hey1* and *Hey2* in VSMCs reflects Notch3 activation, we assessed expression of other Notch family members in E18.5 VSMCs. We found that *Notch1* and *Notch4* mRNAs were nearly undetectable, as determined by qPCR (data not shown). Although there was a low level of *Notch2* mRNA in VSMCs, Notch2 protein expression was not observed in E18.5 pulmonary artery VSMCs but was observed in adventitial cells surrounding adult pulmonary arteries (supplemental Fig. S3). Moreover, *in situ* hybridization confirmed that *Hey1* and *Hey2* were expressed only in VSMCs, but not in E18.5 bronchial smooth muscle cells (Fig. 2E).

To definitively prove that *Hey1* and *Hey2* mRNA expression in E18.5 VSMCs is reflective of Notch3 signaling, a *Notch3*^{−/−} α -SMA-hrGFP mouse was generated. In isolated E18.5 *Notch3*^{−/−} VSMCs, *Hey1* and *Hey2* mRNA levels were decreased by $\sim$ 75% relative to WT VSMCs (Fig. 2F). Taken together, these observations show that Notch3 signaling is active in VSMCs from late fetal to early postnatal life.

Notch3 Activation Is Dependent on VSMC-derived Jagged1—Based on *in vitro* co-culture studies, endothelium-derived Notch ligands have been proposed to engage Notch receptors expressed in VSMCs (29). However, the presence of an intervening basement membrane between the endothelium and VSMC layer raises questions regarding the feasibility of this mode of activation *in vivo*. To identify the activating Notch3 ligand in VSMCs, we assessed the relative mRNA expression of *Delta1*, *Delta4*, *Jagged1*, and *Jagged2* in sorted hrGFP⁺ cells from E18.5 and adult lungs. We found that *Jagged1* was the most abundantly expressed ligand at E18.5 and was down-regulated in the adult (Fig. 3A).

To further assess the dynamics and pattern of Jagged1 expression, immunohistochemistry of embryonic and adult lungs was performed. At E14.5, Jagged1 was located in the endothelium (Fig. 3B). At E18.5, Jagged1 was expressed in the endothelium, airway epithelium, and, consistent with the timing of Notch3 activation, VSMCs (Fig. 3C). In the adult, Jagged1 was expressed primarily in the airway epithelium and endothelium (Fig. 3D) and was reduced in VSMCs (Fig. 3D, inset). Taken together, these findings demonstrate that lung VSMCs

FIGURE 4. Notch3 activation is dependent on VSMC Jagged1 expression. A and B, immunohistochemistry for Jagged1 in E18.5 WT (A) and *Jagged1^{flox/flox} Sma22-Cre* (B) mouse lungs. Arrows indicate the VSMC layer, and arrowheads indicate the endothelium. Insets show higher power views of WT and *Jagged1^{flox/flox} Sma22-Cre* VSMCs. C and D, immunohistochemistry for the N3ICD in E18.5 WT (C) and *Jagged1^{flox/flox} Sma22-Cre* (D) mouse lungs. Arrows indicate VSMC nuclei. Insets show higher power views of nuclei. Scale bars = 20 mm. E, relative *Hey1* and *Hey2* mRNA expression in the lungs of E18.5 WT (white bars) and *Jagged1^{flox/flox} Sma22-Cre* (black bars) mice. Data show means $\pm$ S.D. and are representative of two independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. F, proteins derived from CD45/CD31-depleted E18.5 lung cells immunoprecipitated with anti-Notch3 antibody (α -NECD) or with nonimmune rabbit serum (Ctrl) and immunoblotted with anti-Jagged1 or anti-N3ECD antibody.

express activated Notch3 and its ligand Jagged1 in a time-coordinated manner.

To specifically evaluate the importance of VSMC-derived Jagged1 in Notch3 activation, we generated a VSMC-specific Jagged1-deficient mouse by crossing the *Jagged1^{flox/flox}* mouse and a mouse that expresses *Cre* under the control of the smooth muscle-specific transgelin promoter (*Sma22-Cre*) (30). Lungs derived from E18.5 *Jagged1^{flox/flox} Sma22-Cre* embryos exhibited widespread loss of Jagged1 selectively in VSMCs. In contrast, Jagged1 expression in the endothelium was intact in this mouse (Fig. 4, A and B), confirming the tissue-specific expression of the *Cre* recombinase. Jagged1 deletion in VSMCs resulted in suppression of Notch3 activation, as assessed by diminished N3ICD nuclear localization in VSMCs (Fig. 4, C and D) and diminished *Hey1* and *Hey2* expression (Fig. 4E).

In recent work, expression of contractile smooth muscle marker genes was found to be down-regulated in the ductus arteriosus of *Jagged1^{flox/flox} Sma22-Cre* embryos (21). Interestingly, we also observed down-regulation of contractile smooth muscle marker genes in the absence of VSMC-derived Jagged1 (supplemental Fig. S4) in the embryonic lung. This pattern of smooth muscle gene expression was nearly identical to what was observed in the *Notch3^{-/-}* mouse lung (Fig. 1B), providing

further evidence that endothelium-derived Jagged1 is not involved in VSMC Notch3 activation but rather requires the action of VSMC-derived Jagged1.

In view of these observations, we sought to demonstrate that Notch3 and Jagged1 are physically associated in the E18.5 lung. For this, immunoprecipitation of Notch3 was performed on lysates isolated from CD45/CD31-depleted E18.5 whole lung preparations, followed by Western blot analysis using anti-Jagged1 antibody. Jagged1 was detected in immunoprecipitates obtained with anti-Notch3 antibody, but not in a preimmune rabbit serum control (Fig. 4F). This finding shows that Jagged1 is engaged with Notch3 at E18.5.

Evidence for Cell-autonomous Notch3 Cell Activation in Pulmonary Artery VSMCs—Our observations are thus far consistent with two possible modes of Notch3 activation by Jagged1 in lung VSMCs. Notch3 may be activated through (a) a cell-autonomous pathway or (b) a homotypic interaction between two neighboring VSMCs. To help distinguish between these possibilities, we established an *in vitro* culture system with RPASMCs isolated from neonatal rats. Similar to murine VSMCs, cultured RPASMCs expressed Jagged1, Notch3, and the cleaved N3ICD (supplemental Fig. S5, A and B). Interestingly, Western blot analysis indicated that the majority of Notch3 in these cells was found in the cleaved form (supplemental Fig. S5C). Importantly, the diminished intensity of the band corresponding to the cleaved N3ICD in lysates from cells incubated with a γ -secretase inhibitor (DAPT) confirmed that expression of this protein fragment reflects Notch3 activation (supplemental Fig. S5C).

To evaluate whether Notch3 activation in RPASMCs is cell-autonomous, N3ICD cellular localization was determined in sparsely plated cells by confocal microscopy. As shown in Fig. 5 (A–C), individual RPASMCs exhibited a nuclear N3ICD despite a lack of contact with neighboring cells, compatible with cell-autonomous activation. It is noteworthy that the N3ICD was predominantly localized in nuclei, consistent with our assessment of Notch3 activation by Western blot analysis (supplemental Fig. S5B).

To further address whether cell-cell contact contributes to Notch3 activation, we designed a functional *in vitro* assay. We hypothesized that 1) if Jagged1 activates Notch3 independently of cell-to-cell contact, then we will observe down-regulation of target genes after knocking down *Jagged1* in RPASMCs and 2) this down-regulation will not be rescued by co-culturing *Jagged1* knockdown cells with WT RPASMCs. To evaluate this, RPASMCs were transduced with a lentivirus expressing *Jagged1* shRNA or a control scrambled shRNA coupled to the reporter gene eGFP. RPASMC transduction with the *Jagged1* shRNA lentivirus resulted in *Jagged1* knockdown (supplemental Fig. S6, A and B), as well as a significant reduction in *Hey1* and *Hey2* gene expression (supplemental Fig. S6, C and D).

To test whether WT RPASMCs could rescue *Hey1* and *Hey2* expression in knockdown cells, control scrambled shRNA or *Jagged1* knockdown RPASMCs were co-cultured with WT RPASMCs at a 1:1 ratio for 72 h. Cells were then separated by cell sorting using eGFP as a selection marker, and *Hey1* and *Hey2* expression was assessed by qPCR. Consistent with a cell-

FIGURE 5. Evidence for cell-autonomous Notch3 signaling in VSMCs. A–C, N3ICD localization in RPASMCs by confocal microscopy. A, nuclei; B, N3ICD; C, merged signals. Dashes indicate cell outlines. Scale bars = 20 μm. D and E, relative *Hey1* and *Hey2* mRNA levels, respectively, in scrambled shRNA RPASMCs (Scr), scrambled shRNA RPASMCs co-cultured with WT RPASMCs (Scr-Co), *Jagged1* knockdown RPASMCs (shRNA), and *Jagged1* knockdown RPASMCs co-cultured with WT RPASMCs (shRNA Co). F and G, relative *Hey1* and *Hey2* mRNA levels, respectively, in rat macrophages cultured alone or co-cultured with WT, scrambled shRNA, or *Jagged1* knockdown RPASMCs. For qPCR, data show means ± S.D. and are representative of two independent experiments run in triplicates. NS, not significant; *, $p < 0.05$.

autonomous signaling model, determination of *Hey1* and *Hey2* in WT, scrambled shRNA, and *Jagged1* knockdown cells showed that WT cells were unable to rescue the down-regulation of *Hey1* or *Hey2* mRNA in *Jagged1* knockdown cells (Fig. 5, D and E).

To confirm that RPASMCs are capable of activating Notch signaling in neighboring cells *in vitro*, we co-cultured RPASMCs with a rat alveolar macrophage cell line that expresses detectable cell surface Notch3 (supplemental Fig. S7), but neither *Jagged1* (data not shown) nor *Hey1* or *Hey2* mRNA (Fig. 5, F and G). We found that WT cells and RPASMCs expressing scrambled shRNA stimulated *Hey1* and *Hey2* mRNA expression in co-cultured macrophages to a greater level than *Jagged1* knockdown RPASMCs (Fig. 5, F and G). These findings confirm that RPASMC-derived *Jagged1* is competent to activate neighboring cells. These observations also raise the possibility that Notch3 may not be expressed on or activated from the surface of VSMCs.

Evidence for Intracellular Localization of Notch3 in VSMCs—To investigate the cellular localization of Notch3 in E18.5 mouse lung cells, flow cytometry was performed. We were unable to detect the N3ECD on the surface of E18.5 lung cells (Fig. 6A). In contrast, the N3ECD was detected in permeabilized lung cells (Fig. 6A). To more specifically evaluate N3ECD expression in VSMCs, non-permeabilized and permeabilized

E18.5 hrGFP⁺ cells were analyzed by flow cytometry. As observed with whole lung cells, the N3ECD was detected only in permeabilized cells (Fig. 6B), consistent with an intracellular localization of Notch3 in VSMCs.

To examine this further, confocal microscopy of isolated E18.5 hrGFP⁺ cells was performed. Analysis of individual cells stained with anti-N3ECD antibody revealed a cytoplasmic distribution of Notch3, with no evidence of cell surface expression (Fig. 6C). In accordance, individual cells simultaneously stained with anti-N3ECD and anti-N3ICD antibodies showed co-localization of these two domains only in the cytoplasm of E18.5 VSMCs (Fig. 6D). In contrast *Jagged1* was found intracellularly and on the cell surface, and consistent with their physical association (Fig. 4F), co-localized with Notch3 in the interior of E18.5 VSMCs (Fig. 6E).

To rule out the possibility of Notch3 epitope masking or disruption by the enzymatic cell isolation procedure, Notch3 expression in adult lung CD45⁺ cells isolated by the same method was determined. We observed that Notch3 was detectable on the surface in this cell population (supplemental Fig. S8), consistent with published work (31) and confirming that this procedure does not affect Notch3 integrity or antibody binding. To demonstrate that the intracellular localization of Notch3 is not due to receptor internalization during cell processing, E18.5 hrGFP⁺ cells were fixed and stained at 4 °C. Under

FIGURE 6. Intracellular localization of Notch3 in VSMCs. *A*, flow cytometry for the N3ECD in non-permeabilized and permeabilized E18.5 lung cells. *B*, flow cytometry for the N3ECD in non-permeabilized and permeabilized E18.5 hrGFP⁺ mouse lung cells. *Red histogram*, isotype; *green histogram*, the N3ECD. *C*, perinuclear distribution of the N3ECD in E18.5 hrGFP⁺ mouse lung cells as determined by confocal microscopy. *Upper left panel*, nucleus; *upper right panel*, GFP; *lower left panel*, the N3ECD (red); *lower right panel*, merged image. *D*, intracellular co-localization of the N3ECD and N3ICD in isolated E18.5 hrGFP⁺ mouse lung cells. *Upper left panel*, nucleus (blue); *upper right panel*, the N3ECD (pseudo-colored green); *lower left panel*, the N3ICD (red); *lower right panel*, merged image. Co-localization is shown in white. *E*, intracellular co-localization of the N3ECD and Jagged1 in isolated E18.5 hrGFP⁺ mouse lung cells. *Upper left panel*, nucleus; *upper right panel*, the N3ECD (pseudo-colored green); *lower left panel*, Jagged1 (red); *lower right panel*, merged image. Co-localization is shown in white. Scale bars = 20 μ m.

these conditions, the N3ECD was observed only inside VSMCs, thus ruling out receptor recycling from the cell surface.

To evaluate whether Notch3 cellular localization in RPASMCs is similar to that in mouse VSMCs, confocal microscopy was employed. As in the mouse, Notch3 was not detected on the cell surface of RPASMCs but rather localized to the perinuclear region (Fig. 7, *A* and *B*). To further corroborate these findings, biotinylated proteins from RPASMCs were analyzed. In agreement, we were unable to detect Notch3 in a biotinylated surface protein fraction by Western analysis ([supplemental Fig. 7C](#)). In contrast, Notch3 was detected in the non-biotinylated fractions and total cell lysates. As expected, Jagged1 was found in biotinylated and non-biotinylated fractions and whole cell lysates. On the other hand, the intracellular protein p53 was markedly enriched in the non-biotinylated internal fraction (Fig. 7C). Additionally, Ponceau S staining revealed approximate equal protein loading (data not shown). Taken together, these results demonstrate Notch3 expression restricted to the interior of pulmonary artery VSMCs.

To determine whether the restricted intracellular Notch3 receptor localization is dependent on cellular context, recombinant GFP, N3ICD-GFP, and Notch3-GFP fusion proteins

FIGURE 7. Notch3 localization in neonatal RPASMCs. *A* and *B*, confocal microscopy of N3ECD staining (red) in non-permeabilized (*A*) and permeabilized (*B*) RPASMCs. β -Tubulin staining is shown in green. Scale bars = 20 μ m. *C*, Western blot for the N3ECD, Jagged1, and p53 in the biotinylated extracellular fraction (*Ext*), non-biotinylated intracellular fraction (*Int*), and total cell lysates.

were transfected into RPASMCs and human kidney epithelial 293T cells. Confocal microscopy showed cytoplasmic GFP expression in both cell types with the control plasmid (Fig. 8, *A*

FIGURE 8. Localization for recombinant Notch3-GFP fusion proteins in transfected RPASMCs and 293T cells as determined by confocal microscopy. A and B, cytoplasmic GFP distribution in cells transfected with a control plasmid. C and D, nuclear GFP localization in cells transfected with the N3ICD-GFP construct. E, cytoplasmic and cellular membrane GFP distribution in 293T cells transfected with the full-length Notch3-GFP construct. F, perinuclear GFP distribution in RPASMCs cells transfected with the full-length Notch3-GFP construct. Green, GFP; red, β -tubulin; blue, nuclei. Scale bars = 20 μ m.

and B). GFP was localized in the nuclei of both RPASMCs and 293T cells transfected with N3ICD-GFP (Fig. 8, C and D). Consistent with previous reports (32), GFP was detected on the cell surface and cytoplasm of 293T cells transfected with Notch3-GFP (Fig. 8E). In RPASMCs transfected with Notch3-GFP, however, GFP localized exclusively to the perinuclear region without evidence of surface expression (Fig. 8F). These findings show that, even under conditions of overexpression, Notch3 localizes to the interior of VSMCs.

DISCUSSION

In this study, we found that Notch3 expression is restricted to pulmonary artery VSMCs in the developing lung. We observed that activation of this receptor occurs during a discrete time period spanning late fetal to early postnatal life and is dependent upon VSMC-derived Jagged1. This time-restricted signal regulates pulmonary artery cell phenotype, as evidenced by alterations in expression of smooth muscle-related genes and VSMC morphology in the *Notch3*^{-/-} mouse.

Importantly, we were unable to detect Notch3 cell surface expression in lung VSMCs by a variety of assays. Rather, we demonstrated that this receptor displays an intracellular localization that appears unique to VSMCs. The differential targeting of overexpressed Notch3 to the interior of RPASMCs and to the cell surface of human kidney epithelial 293T cells and macrophages underscores the importance of cellular context in determining the cellular localization of Notch3. The relative basis for how particular structural elements of the Notch3 protein facilitate targeting to an intracellular compartment in VSMCs, as opposed to the surface of macrophages, is not yet evident but is a focus of ongoing investigation. On the basis of our overexpression data, we speculate that differences in asso-

ciated Notch3 targeting molecules underlie these observations. Overall, these data argue for a cell-autonomous signaling mode of Notch3 signaling that involves an engagement with the Jagged1 ligand in the interior of VSMCs.

It is important to emphasize the functional differences between the ligand-dependent intracellular Notch pathway described in *Drosophila* (17) and the pathway we identified in VSMCs. In *Drosophila*, this pathway is active during mitosis and plays a defining role in determining the differential cell fates of the two daughter cells that arise from the asymmetric cell division of sensory organ progenitor cells. This process involves the asymmetric sorting of a subtype of endosomes containing Notch and Delta, which leads to release of the Notch intracellular domain to only one daughter cell (17). In contrast, during active intracellular Notch3 signaling, we found no evidence that VSMCs are proliferating (data not shown). Furthermore, cell-autonomous Notch3 signaling occurs in cells with an already established fate during late gestation.

There are differences in the structure of Notch3 compared with other family members. One speculation is that these structural features mediate selectivity for Jagged1 (33). There are, however, unique functional properties for Notch3. In systemic vessels, Notch3 may serve as a direct regulator of hemodynamic tone (15). One possibility is that Notch3 is a direct regulator of tone in the pulmonary artery during the transition to postnatal life.

Previous work has indicated Notch-ligand interactions occurring in *cis*, resulting in inhibition of Notch signaling (34). Rather, we found in VSMCs that Notch3-Jagged1 interaction in *cis* leads to activation. In ongoing work, we found that Notch3 and Jagged1 reside in the same endosomal compartments, suggesting the possibility of receptor-ligand interaction and proteolytic release of the N3ICD at this site.

In the context of our findings, this leads us to propose two models of cell-autonomous intracellular Notch3 activation in VSMCs. In one model, membrane-bound Jagged1 interacts with membrane-bound Notch3 in the interior of the same endosome, thereby generating the force required to expose the γ -secretase target site in the cytoplasm for cleavage. In the second model, membrane-bound Jagged1 and membrane-bound Notch3 interact on the cytoplasmic side of two contiguous endosomes, thereby exposing the Notch intracellular domain cleavage site in the endosomal interior. Of note, although γ -secretase substrates are processed at or near the cell surface, this enzyme complex also resides in the endoplasmic reticulum, Golgi network, and intermediate compartments (17). Its optimal activity is at low pH, indicating that γ -secretase could function within the acidic milieu of late endosomes (35).

A broader biological question relates to why this alternative mode of Notch activation is operative in pulmonary artery VSMCs. Although unclear at this time, cell-autonomous Notch3 signaling may have involved, in part, to ensure the efficient and homogeneous adaptation of pulmonary artery VSMCs to the sudden and dramatic increase in blood flow and pressure associated with birth and air breathing. The restricted timing of Notch3 activation is consistent with this possibility, thereby pointing to a key role for this pathway in regulating the final stages of VSMC maturation. The emer-

gence of dysmorphic VSMCs early after birth in *Notch3*^{-/-} mice, which is highly suggestive of an injury response (36), further underscores a role for Notch3-dependent signals in the adaptation from a fetal to a postnatal pulmonary vasculature. The improved morphological appearance of the adult as opposed to the postnatal day 3 vessels in *Notch3*^{-/-} mice suggests the presence of an active repair process.

Finally, we posit that our findings may have relevance to understanding two pathological conditions. Recently, dysregulation of Notch3 activation has been implicated as a key factor in the pathogenesis of adult pulmonary hypertension (27). Whether Jagged1-dependent cell-autonomous Notch activation is involved in this pathological process will need to be clarified, particularly if targeted Notch3-dependent therapies are considered. Furthermore, in view of the late timing of Notch3 activation during development and its effects on VSMC phenotype, we wonder whether relative Notch3 signaling deficiency plays a role in the pathogenesis of the pulmonary vasculopathy associated with prematurity.

Acknowledgments—We thank Anne Hinds and Yun Qian for technical support.

REFERENCES

- Gao, Y., and Raj, J. U. (2010) *Physiol. Rev.* **90**, 1291–1335
- deMello, D. E., Sawyer, D., Galvin, N., and Reid, L. M. (1997) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **16**, 568–581
- Hellström, M., Kalén, M., Lindahl, P., Abramsson, A., and Betsholtz, C. (1999) *Development* **126**, 3047–3055
- Wang, Z., Shu, W., Lu, M. M., and Morrissey, E. E. (2005) *Mol. Cell. Biol.* **25**, 5022–5030
- Tallquist, M. D., French, W. J., and Soriano, P. (2003) *PLoS Biol.* **1**, E52
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., and Lake, R. J. (1999) *Science* **284**, 770–776
- Nichols, J. T., Miyamoto, A., and Weinmaster, G. (2007) *Traffic* **8**, 959–969
- Nakagawa, O., McFadden, D. G., Nakagawa, M., Yanagisawa, H., Hu, T., Srivastava, D., and Olson, E. N. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 13655–13660
- Schroeter, E. H., Kisslinger, J. A., and Kopan, R. (1998) *Nature* **393**, 382–386
- Clément, N., Gueguen, M., Glorian, M., Blaise, R., Andréani, M., Brou, C., Bausero, P., and Limon, I. (2007) *J. Cell Sci.* **120**, 3352–3361
- Sweeney, C., Morrow, D., Birney, Y. A., Coyle, S., Hennessy, C., Scheller, A., Cummins, P. M., Walls, D., Redmond, E. M., and Cahill, P. A. (2004) *FASEB J.* **18**, 1421–1423
- Domenga, V., Fardoux, P., Lacombe, P., Monet, M., Maciazek, J., Krebs, L. T., Klonjowski, B., Berrou, E., Mericskay, M., Li, Z., Tournier-Lasserre, E., Gridley, T., and Joutel, A. (2004) *Genes Dev.* **18**, 2730–2735
- Liu, H., Zhang, W., Kennard, S., Caldwell, R. B., and Lilly, B. (2010) *Circulation Res.* **107**, 860–870
- Morrow, D., Sweeney, C., Birney, Y. A., Cummins, P. M., Walls, D., Redmond, E. M., and Cahill, P. A. (2005) *Circ. Res.* **96**, 567–575
- Belin de Chantemèle, E. J., Retailliau, K., Pinaud, F., Vessièrès, E., Bocquet, A., Guihot, A. L., Lemaire, B., Domenga, V., Baufréon, C., Loufrani, L., Joutel, A., and Henrion, D. (2008) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 2216–2224
- Lin, L., Mernaugh, R., Yi, F., Blum, D., Carbone, D. P., and Dang, T. P. (2010) *Cancer Res.* **70**, 632–638
- Coumilleau, F., Fürthauer, M., Knoblich, J. A., and González-Gaitán, M. (2009) *Nature* **458**, 1051–1055
- Wilkin, M., Tongngok, P., Gensch, N., Clemence, S., Motoki, M., Yamada, K., Hori, K., Taniguchi-Kanai, M., Franklin, E., Matsuno, K., and Baron, M. (2008) *Dev. Cell* **15**, 762–772
- Tsao, P. N., Chen, F., Izvolsky, K. I., Walker, J., Kukuruzinska, M. A., Lu, J., and Cardoso, W. V. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 29532–29544
- Woodsome, T. P., Polzin, A., Kitazawa, K., Eto, M., and Kitazawa, T. (2006) *J. Cell Sci.* **119**, 1769–1780
- Feng, X., Krebs, L. T., and Gridley, T. (2010) *Development* **137**, 4191–4199
- Choi, J. H., Park, J. T., Davidson, B., Morin, P. J., Shih, I. M., and Wang, T. L. (2008) *Cancer Res.* **68**, 5716–5723
- Wiznerowicz, M., and Trono, D. (2003) *J. Virol.* **77**, 8957–8961
- Murphy, G. J., Mostoslavsky, G., Kotton, D. N., and Mulligan, R. C. (2006) *Nat. Med.* **12**, 1093–1099
- Arboleda-Velasquez, J. F., Rampal, R., Fung, E., Darland, D. C., Liu, M., Martinez, M. C., Donahue, C. P., Navarro-Gonzalez, M. F., Libby, P., D'Amore, P. A., Aikawa, M., Haltiwanger, R. S., and Kosik, K. S. (2005) *Human Mol. Genet.* **14**, 1631–1639
- Zhu, J. H., Chen, C. L., Flavahan, S., Harr, J., Su, B., and Flavahan, N. A. (2010) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **300**, 1762–1769
- Li, X., Zhang, X., Leathers, R., Makino, A., Huang, C., Parsa, P., Macias, J., Yuan, J. X., Jamieson, S. W., and Thistlethwaite, P. A. (2009) *Nat. Med.* **15**, 1289–1297
- Wang, W., Campos, A. H., Prince, C. Z., Mou, Y., and Pollman, M. J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 23165–23171
- Liu, H., Kennard, S., and Lilly, B. (2009) *Circ. Res.* **104**, 466–475
- Holtwick, R., Gotthardt, M., Skryabin, B., Steinmetz, M., Potthast, R., Zetsche, B., Hammer, R. E., Herz, J., and Kuhn, M. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 7142–7147
- Fung, E., Tang, S. M., Canner, J. P., Morishige, K., Arboleda-Velasquez, J. F., Cardoso, A. A., Carlesso, N., Aster, J. C., and Aikawa, M. (2007) *Circulation* **115**, 2948–2956
- Rauen, T., Raffetseder, U., Frye, B. C., Djudaj, S., Mühlenberg, P. J., Eitner, F., Lendahl, U., Bernhagen, J., Dooley, S., and Mertens, P. R. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 26928–26940
- Bellavia, D., Checquolo, S., Campese, A. F., Felli, M. P., Gulino, A., and Screpanti, I. (2008) *Oncogene* **27**, 5092–5098
- D'Souza, B., Miyamoto, A., and Weinmaster, G. (2008) *Oncogene* **27**, 5148–5167
- Pasternak, S. H., Bagshaw, R. D., Guiral, M., Zhang, S., Ackerley, C. A., Pak, B. J., Callahan, J. W., and Mahuran, D. J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 26687–26694
- White, T. A., Witt, T. A., Pan, S., Mueske, C. S., Kleppe, L. S., Holroyd, E. W., Champion, H. C., and Simari, R. D. (2010) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **43**, 35–45

ARTIGOS PUBLICADOS

ANEXO C- Artigo em revisão (PNAS): The neuroendocrine microenvironment generates a distinct subpopulation of secretory cell precursors in the developing airways. #Arjun Guha*, **Michelle Vasconcelos***, Yan Cai, Mitsuru Yoneda, Anne Hinds, Jun Qian, Guihua Li, Lauren Dickel, Jane Johnson, Shioko Kimura, Wellington Cardoso. **These authors contributed equally to this work.*

Dear Managing Editor,

Here we would like to co-submit the manuscripts: "*The neuroendocrine microenvironment generates a distinct subpopulation of secretory cell precursors in the developing airways*" by Guha et al. and "*A new, SSEA-1-positive, CC10 negative and Notch-dependent cell type regulates pulmonary neuroepithelial body size in the developing lung*" by Morimoto et al. to be considered for publication in PNAS.

We have contacted Dr. Brigid Hogan, who agreed to serve as the Editor for this co-submission. Both manuscripts were presented as abstracts at the Keystone Symposia Meeting on Lung Development (February 2011). They focus on the role of Notch in airway progenitor cell fate and result from independent work. Although they differ in approaches and content, they are highly complementary. Given the common theme and complementarity of the results, the authors agreed on a joint submission of the manuscripts.

In Guha et al. the authors provide evidence of a role for Notch in induction of a secretory cell-specific program of gene expression. They show that the secretoglobin Scgb3a2 is present early in subsets of cells of developing airways, correlating with Notch activation and that its expression depends on Notch. They show that canonical Notch can transactivate the Scgb3a2 gene in the presence of the airway transcription factor Nkx2.1 *in vitro*. Moreover this secretory program is modified in the neuroendocrine (NE) microenvironment to generate a distinct subpopulation of secretory cells, which depend on Ascl1.

In Morimoto et al., the authors show that whereas Notch2 mediates the Clara/ciliated cell fate decision with negligible contributions from Notch1 and 3, all three Notch receptors contribute in an additive manner to regulate pulmonary neuroepithelial bodies (pNEB) size and abundance through a feedback loop between ligand expressing NE cells and Notch-dependent, SSEA-1-positive, CC10-negative cell population surrounding the NE cells (SPNC cells). Removal of Notch alleles enlarged pNEBs in a dose-dependent manner. Hes1 is a key regulator of pNEB and although epithelial Hes1 expression correlated with the dose of Notch alleles during NE cell selection, we provide evidence that Notch signaling co-regulates Hes1 with other, yet to be identified pathway. Interestingly, constitutive activation of Notch in non-NE lineages increased the numbers of SSEA-1-positive cells throughout the conducting airways and led to loss of NE cells, revealing a Notch-dependent feed-back mechanism regulating the pNEB size during lung development.

We believe both papers are of interest to PNAS as they provide novel insights into Notch-mediated mechanisms of epithelial cell specification during organogenesis. Moreover they help understanding how distinct subpopulations of airway epithelial progenitors form in the developing lung.

Sincerely,

Wellington V. Cardoso, MD, PhD,
Professor of Medicine and Pathology & Laboratory Medicine
Pulmonary Center, Boston University School of Medicine
72 East Concord Street R-304
Boston, MA 02118
phone (617) 638-6198
wcardoso@bu.edu

Raphael Kopan, Ph.D.
Professor
Dept. of Molecular Biology and Pharmacology & Dept. of Medicine,
Washington University
3600 Cancer Research Building, Box 8103
660 South Euclid
St. Louis, MO 63110
phone: (314) 747-5520
kopan@wustl.edu

Major: Biology Minor: Developmental Biology

The neuroendocrine microenvironment generates a distinct subpopulation of secretory cell precursors in the developing airways.

Arjun Guha¹, Vasconcelos M.¹, Cai, Y.³, Yoneda, M.³, Hinds A.¹, Qian J.¹, Li, G.¹, Dickel L.²,
Johnson J.², Kimura, S.³, and Wellington V. Cardoso¹

¹Pulmonary Center, Boston University School of Medicine,
Boston, MA 02118

² Department of Neuroscience, UT Southwestern Medical Center,
Dallas, TX75390

³ Laboratory of Metabolism, National Cancer Institute,
Bethesda, MD 20892

Keywords: Notch signaling, neuroendocrine cell, Clara cell, Ascl1, lung development

Running title: Neuroendocrine microenvironment and secretory cell precursors

Corresponding authors:

Wellington V. Cardoso, MD, PhD,
Professor of Medicine and Pathology,
Pulmonary Center - Boston University School of Medicine,
72 East Concord Street, R-304,
Boston, MA, 02118.
Tel: 617-638-6198;
Fax: 617-536-8093;
E-mail:wcardoso@bu.edu

Arjun Guha, PhD
Assistant Professor of Medicine
Pulmonary Center, Boston University School of Medicine,
72 East Concord Street R-304,
Boston, MA 02118
Phone: (617) 638-6198
FAX : (617) 536-8093
e-mail: aguha@bu.edu

ABSTRACT

Secretory cells of mammalian airways have multiple functions and are markedly heterogeneous. While Notch signaling is essential for the development of these cells, it is unclear how Notch influences secretory cell specification and how diversity is established among secretory precursors. Here we identify expression of the secretoglobin *Scgb3a2* and Notch activation as early events in a program of secretory cell fate in developing murine airways. We show that *Scgb3a2* expression *in vivo* is Notch-dependent at early stages, is ectopically induced by constitutive Notch1 activation, and that *in vitro* Notch signaling together with the pan-airway transcription factor Ttf1 (Nkx2.1) synergistically regulate secretoglobin gene transcription. Furthermore, we identified a novel subpopulation of secretory precursors juxtaposed to presumptive Neuroepithelial Bodies (pNEB), distinguishable by their strong *Scgb3a2* and uroplakin *Upk3a* signals and reduced *Ccsp* (*Scgb1a1*) expression. Their association with pNEB precursors is crucial, since genetic disruption of *Ascl1* prevented pNEB formation and selectively interfered with formation of this subpopulation of cells. Together our study supports a role for Notch in induction of a secretory cell-specific program of gene expression and shows that this program is modified in the pNEB microenvironment to generate a distinct subpopulation of secretory cells.

.

\body INTRODUCTION

The airways of the mammalian lung are populated by distinct epithelial cell types recognized by their morphology and expression of molecular markers. Secretory and ciliated cells are the most abundant cell types while basal and neuroendocrine (NE) cells are restricted in number and distribution (1). Secretory cells synthesize components of the airway lining fluid, mediate mucociliary clearance in concert with ciliated cells, and metabolize environmental toxins. Furthermore, they act as facultative progenitor cells during lung injury-repair (1-3).

Secretory cells in the mouse lung have been distinguished in molecular terms by the expression of the secretoglobin *Scgb1a1*/Clara cell secretory protein (Ccsp) and show great diversity of cellular phenotypes. Subpopulations of secretory cells with distinctive morphology and susceptibility to environmental exposures have been reported in the mouse lung and in other species. (4). Ultrastructural analysis of conducting airways shows that secretory cells surrounding clusters of neuroepithelial cells (neuroepithelial bodies, NEBs) can be distinguished from their neighbors by their flattened morphology (5). These cells are also functionally distinct from other secretory cells as they are deficient in the cytochrome P450 enzyme *Cyp2f2* (6). It is thought that the absence of *Cyp2f2* renders resistance to Naphthalene injury (6).

Genetic studies in mice demonstrate an essential role for the Notch signaling in the specification of secretory cells during lung development(7, 8). The Notch pathway is a juxtacrine signaling system that regulates cell fate choices in multiple biological systems (9-11). The pathway is activated by the engagement of transmembrane Notch receptors (Notch1-4) by the transmembrane ligands Delta-like (Dll1,3,4) or Jagged (Jag1, Jag2). Ligand- receptor interaction results in gamma-secretase-dependent cleavage of the cytoplasmic domain of the Notch receptor. Nuclear translocation and interaction of this cleaved intracellular domain (NICD) with the Rbp-jk transcriptional complex then leads to activation of a canonical pathway and the expression of target genes. Developing airways that are deficient in Rbpjk or Protein O-fucosyltransferase-1 (*Pofut1*), an enzyme required for the efficient binding of Notch receptor with ligand, lack secretory cells and have supernumerary ciliated cells (7, 8). Conversely, constitutive Notch activation in developing lung epithelium results in increased number of secretory cells relative to ciliated cells (12).

Studies to better understand the role of Notch in secretory cell specification have been limited in part by the paucity of markers and specifically early markers of differentiation. Transcription factors that label ciliated (*Foxj1*), neuroendocrine (*Ascl1*) and basal (*Trp63*) progenitors are known. However, with the exception of NICD, no nuclear factor specific to secretory progenitors has been identified. *Hes1*, a Notch transcriptional target, is expressed in developing airways, including secretory precursors, but it is not required to specify secretory cell fate (13). Secretoglobins are a family of small, secreted, structurally similar disulfide-linked dimers of which three members, *Ccsp*, *Scgb3a1* and *Scgb3a2* are expressed in secretory cells in the lung(14). At present, the secretoglobin *Ccsp* is the only definitive marker for secretory cells. Markers like *Trp63*, *Ascl1* and *Foxj1* have been localized to the developing airways E12.5 onwards. In contrast, *Ccsp* expression has been observed E15.5 onwards.(14).

Here we examine the early events associated with the induction of secretory cell fate and the contribution of developmental programming in establishing differences among secretory cells in the mouse airway epithelium. We identify *Scgb3a2* and activated Notch as markers of an early program of secretory cell fate. Moreover, we implicate Notch as a mediator of a secretory cell-

specific program of gene expression in airway epithelial precursors. This program is modified in the developing NEB microenvironment to generate a distinct subpopulation of secretory precursors that can be identified both in the embryonic and the adult lung.

RESULTS

Notch activation in the developing airways precedes expression of *Ccsp*

Lineage-tracing and genetic studies have shown that during Notch activation in developing airways correlates with and is essential for the acquisition of a secretory fate (Fig. 1A) (7, 8). It was unclear, however, when activation of Notch signaling initiates in airway epithelial progenitors and whether regional patterns of cellular differentiation are associated with Notch activation. We examined the spatio-temporal overlap between the activation of Notch signaling and the expression of well-established markers of secretory (*Ccsp*, or *Scgb1a1*) and ciliated (*Foxj1*) cells throughout development. Although Notch1-3 have been reported in the lung epithelium, Notch1 is the predominant receptor expressed in the developing airway (15, 16). Thus, we used immunohistochemistry with an antibody against cleaved Notch1 (hereafter NICD) reported to label the nuclei of cells undergoing Notch1 activation (7). NICD labeling was first detected in the respiratory epithelium at E12.5, at low levels, and restricted to the trachea and main bronchi (Fig. 1B,C). At E14.5 signals increased in intensity and frequency in proximal airways but were absent in the distal airways (Fig. 1D-F). At this stage strong NICD signals were detected in clusters occupying a relatively apical position within the pseudo-stratified epithelium in proximal intrapulmonary airways (Fig.1F). This contrasted with the lower intensity and more homogenous pattern of NICD outside the clusters (Fig. 1E). Expression of *Foxj1* and NICD did not overlap at any stage. At E16.5, when NICD and *Foxj1* expression extended to the distal epithelium, *Ccsp* was most abundant in NICD-expressing cells of proximal airways (Fig.1 G,H). By E18.5 *Ccsp*-NICD double-labeled cells were present throughout the proximal-distal (P-D) axis of the lung (Fig.1 G,H). Our data showed that Notch signaling is activated in the developing airway epithelium prior to the expression of known markers of differentiation. Moreover, NICD expression followed a time-course and pattern of induction that is consistent with the P-D pattern of airway differentiation, with discrete cell clusters exhibiting the strongest signals.

Scgb3a2 marks cells undergoing an early program of secretory cell fate

The early onset of Notch activation in the developing lung suggested that airway progenitors initiate a program of secretory cell fate well before *Ccsp* is expressed. Previous studies showed that *Scgb3a2*, another member of the secretoglobin gene family, is expressed in secretory Clara cells of developing airways (8, 17). This led us to investigate whether *Scgb3a2* could label early secretory precursors in embryonic lungs. Consistent with an earlier report (18), Real Time PCR (RT-PCR) analysis detected signals as early as E12.5 with levels increasing thereafter. In situ hybridization (ISH) revealed *Scgb3a2* expression E12.5 onwards; expression was localized to the trachea and extrapulmonary bronchi (Fig. 2A). *Scgb3a2* expression became stronger and expanded to lobar bronchi at E13.5-14.5 and was widespread by E18.5 (Fig. 2B-E;I). A closer examination of the *Scgb3a2* pattern at early stages showed a remarkable overlap with the pattern of Notch activation. Earliest expression of both markers was detected in the trachea and bronchi (Fig1A, 2B) and at E14.5 strong expression in clusters of cells in proximal airways was observed (Fig.1F, 2B-H). Double ISH-immunohistochemistry (IHC) and confocal analysis of E14.5 lungs confirmed co-localization of *Scgb3a2* and NICD (Fig. 2D). Co-localization was not restricted to these cell clusters but was harder to detect elsewhere in the epithelium due to the weaker NICD signals. At subsequent stages *Scgb3a2* expression increased

and extended to the terminal bronchioles (Fig.2I), overlapping with *Ccsp* (Fig.2 N-Q) and NICD (Fig.1G-H) .

A distinct subpopulation of early secretory progenitors develops in close association with presumptive NEBs

The presence of cell clusters with strong *Scgb3a2* and NICD signals compared to elsewhere is consistent with the idea that heterogeneity among secretory precursors is spatially regulated. Expression in clusters were reminiscent of the distribution of *Ascl1* (mouse achaete-scute complex homologue 1, *Mash1*), a bHLH transcription factor essential for NE cell fate (19). We hypothesized that clusters of *Scgb3a2* and NICD positive cells were arising at sites of *Ascl1*-expressing cells. Thus, sections from E13.5 –E18.5 lungs were sequentially labeled with an *Scgb3a2* riboprobe and an anti *Ascl1* antibody. At E14.5, *Scgb3a2* signals were present in the expected uniform and clustered patterns (Fig. 2E); 70-80% of the *Scgb3a2*-expressing clusters were associated with the *Ascl1*-expressing cell clusters (pNEBs). Confocal microscopy confirmed that cells expressing *Scgb3a2* or *Ascl1* were distinct and in direct contact. (Fig. 2E,G). Next we examined the relationship between NICD and pNEBs to find that most, if not all, clusters of NICD were juxtaposed to pNEBs (Fig. 2H). Moreover, analysis of E13.5-E14.5 lungs showed a proximal-to-distal pattern of pNEB formation in intrapulmonary airways, preceding the local appearance of *Scgb3a2* (Fig. 2F). Thus, we conclude that the pNEB-microenvironment at E14.5 consists of clusters of *Ascl1*-expressing cells and another cell population expressing high levels of NICD and *Scgb3a2*. No *Foxj1* labeling was detected in these cells at any of the stages studied. Therefore, we propose that the pNEB microenvironment is a niche for specification of secretory progenitors.

At later stages, secretory precursors in the pNEB microenvironment could no longer be distinguished from their neighbors based on NICD or *Scgb3a2* expression. However, simultaneous labeling of NICD/*Ccsp*/*Ascl1* at E18.5 demonstrated that cells clustered around pNEBs had high levels of NICD but low or negligible levels of *Ccsp* (Fig. 2J-M). Three-color labeling of *Scgb3a2* (ISH)/*Ccsp* (ISH)/CGRP(IHC) (Calcitonin gene-related peptide, another NE cell marker) confirmed that cells in the pNEB microenvironment continue to express *Scgb3a2* at this stage (Fig 2I-N) and have low/negligible levels of *Ccsp*. Our data strongly suggested that the secretory progenitors in the pNEB microenvironment represent a separate subpopulation.

NEB-associated secretory precursor cells show unique features also found in a subpopulation of adult Clara cells

We reasoned that the absence of secretory cells in the airways of Notch signaling-deficient mice represented a unique opportunity to screen for additional markers enriched in secretory cells. Thus, we compared the global gene expression profile of E18.5 lungs from control and mutant mice in which the *Rbpjk* gene was disrupted in the airway epithelium (*Shh-Cre*;*Rbpjk*, or *Rbpjk*^{cnull})(16). As expected, genes associated with the secretory phenotype, such as *Ccsp* (*Scgb1a1*), *Scgb3a2* and *Cyp2f2* were significantly enriched in control lungs (Fig. 3A). A comprehensive description of this screen will be reported elsewhere. Importantly, this screen identified Uroplakin 3a (*Upk3a*, Fig. 3A) as a novel marker of secretory precursors. *Upk3a* encodes a single-pass transmembrane domain-containing protein of the Uroplakin family that is expressed in the urinary bladder epithelium (20, 21). Mice deficient in *Upk3a* have compromised urothelial permeability but no phenotype has been described in the lung(20).

Upk3a expression was nearly absent in airways of *Rbpjk^{cnull}* mice both by RT-PCR and ISH (Fig. 3B-D). At E18.5 control lungs revealed *Upk3a* expression highly enriched in cell clusters in the proximal airways (Fig. 3C). This differed from the widespread expression patterns of *Scgb3a2* and *Ccsp*. *Upk3a* signals could be also detected sporadically and at lower levels in scattered airway epithelial cells (Fig.3C). Developmental analysis of *Upk3a* expression detected signals at E12.5 (RT-PCR, 13.5 by ISH) and showed increasing levels thereafter (Fig. 3E). ISH revealed clustered distribution from early stages and prompted us to investigate the relationship of *Upk3a*-expressing cells with pNEBs. Double ISH (*Upk3a*)/IHC (*Ascl1*) showed that *Upk3a*-expressing cells were indeed juxtaposed to the *Ascl1*-labeled clusters from the earliest stages (Fig.3F-G).

We then investigated whether *Upk3a*-expressing cells were present in the NEB microenvironment in the adult lung. Sections of the adult lung were double-labeled with a *Upk3a*-riboprobe and an anti-Cgrp antibody. We detected *Upk3a*-expressing single cells or groups of cells in contact with Cgrp-expressing cells (Fig.3H). Quantitative analysis showed 1-3 *Upk3a*-expressing cells in 50% of all NEBs examined. We also examined the distribution of *Upk3a* in adult lungs 48h-post Naphthalene injury to determine if these cells were Naphthalene-resistant (Fig.3I-J). Analysis of lungs from control and Naphthalene-treated mice showed that at least 30% of the NEBs were associated with *Upk3a*-expressing cells. Serial sections labeled with *Scgb3a2* (Fig.3I) or *Ccsp* (not shown) showed that the *Upk3a*-expressing population in the NEB microenvironment is a subset of the total naphthalene-resistant, variant-Clara cells (Fig. 3J).

We also examined additional features of the adult NEB microenvironment in the developing airways. A distinguishing feature of the NEB-associated secretory cells is the negligible expression of the cytochrome P450, *Cyp2f2*. Since *Cyp2f2* was also identified by our expression profiling as differentially downregulated in Notch-deficient airways, we further characterized its developmental pattern of expression. ISH showed *Cyp2f2* expression throughout the epithelium of the trachea and extrapulmonary airways from E13.5, as also observed for *Scgb3a2*, expanding thereafter to distal airways (Suppl.Fig.1A,B). To determine the spatial relationships among *Scgb3a2*, *Upk3a*, *Cyp2f2* and pNEBs, serial sections were labeled with these riboprobes and subsequently stained with an anti-*Ascl1* antiserum. Analysis of E14.5 lungs showed that the pNEB-associated cell clusters that typically express strong *Scgb3a2* and *Upk3a* signals, had little, if any, *Cyp2f2* (Suppl Fig.1C-E). This contrasted with the strong *Cyp2f2* signals in neighbor *Scgb3a2* positive cells, and further supported the idea that the pNEB-microenvironment harbors a distinct subpopulation of secretory progenitors. At E18.5 this subpopulation could be distinguished by strong *Upk3a* but not by low *Cyp2f2* expression as seen before.

pNEBs are critical to generate secretory cell diversity in developing airways

Next we asked whether the features identified in the pNEB-associated cells were dependent on the pNEB. *Ascl1* is essential for NE specification. Neither solitary NE cells nor NEBs are detected in *Ascl1* null mice (13, 19). However, no impact in the abundance of other airway cell types has been reported. Given the small numbers of cells in the pNEB microenvironment and paucity of specific markers for these cells, we reasoned that the ablation of these cells would have escaped detection and reexamined the *Ascl1* null mice.

Sections from control and *Ascl1* null lungs at E14.5 and E18.5 were labeled for *Scgb3a2* and *Upk3a*. The diffuse expression of *Scgb3a2* expression was still detected in trachea and main bronchi in mutant lungs at E14.5 but clusters of both *Scgb3a2* and *Upk3a* signals were lost in the

intrapulmonary airways (Fig.4A,B,E,F). The impact of *Ascl1* deletion in this subpopulation was further confirmed by the absence of *Upk3a*-labeled clusters in E18.5 lungs, although signals could still be seen in the few scattered cells outside the pNEB microenvironment (Fig.4G,H; see also Morimoto et al., co-submitted). At E18.5, ISH of *Scgb3a2* could not distinguish the pNEB-associated subpopulation from the other secretory precursors and signals were broadly present in control and *Ascl1* mutants (Fig.4C,D). We concluded that pNEB cells are crucial for the specification of a distinct subpopulation of secretory progenitors in the developing airways.

Notch signaling activates secretoglobin gene transcription to foster secretory cell fate

To gain further insights into the mechanisms by which secretory cells are specified in developing airways, we examined the effect of loss or gain of Notch function at an early stage prior to *Ccsp* expression. We generated mice in which Notch signaling was disrupted (*Rbpjk*^{cnul}; (16)) or constitutively activated in the lung epithelium using *ShhCre* and *Rosa-NICD* transgenes (12). Analysis of the *Scgb3a2* pattern in E14.5 *Rbpjk*^{cnul} lungs showed marked downregulation in extrapulmonary airways and negligible signals in intrapulmonary airways, including the cells in the pNEB-microenvironment which normally express strong *Scgb3a2* (Fig.5A). In contrast, E14.5 *ShhCreNICD* mice showed widespread expression of *Scgb3a2* in the airway progenitors (Fig. 5C). *Upk3a* expression was similarly modulated by Notch signaling (Fig. 5B,D). Interestingly, we did not detect expression of the late marker *Ccsp* in lungs overexpressing NICD (Fig.5C-E). Together, these data support the idea that Notch induces an early program of secretory cell fate. As evidenced by the morphology, NICD overexpression led to aberrantly enlarged airways. Nevertheless, these airways retained respiratory identity as they expressed Ttf1.

Based on the genetic data above and our evidence establishing *Scgb3a2* as an early secretory marker, we investigated whether Notch could directly regulate *Scgb3a2* transcription. A screen for *Rbpjk* binding sites 1kb region upstream to the Transcription Start Site (TSS) of the murine *Scgb3a2* promoter revealed high (YGTGRGAA) and low (RTGRGAR) affinity binding sites (Fig.5F)(22-24). For subsequent analysis we focused on the putative high affinity binding site. We performed electrophoretic mobility shift analysis (EMSA) using COS-1 cell nuclear extracts and oligonucleotides containing the *Rbpjk* high affinity binding site sequence (intact, mutated). COS-1 cells are known to express *Rbp-jk*(25). Detection of a DNA-protein band that was selectively supershifted with an anti-*Rbpj* antibody suggested that endogenous *Rbpjk* could bind to this site to mediate Notch canonical gene transcription (Fig.5G). Next, we performed luciferase reporter assays using *Scgb3a2* promoter sequences -273 bp to the TSS containing either a control (WT) or a mutated *Rbpjk* high affinity site. Co-transfection with an NICD-containing plasmid resulted in minimal induction of reporter activity (<2-fold). This response was similar to that elicited by cotransfection of the same construct with an expression plasmid-containing Ttf1, a known transcriptional regulator of *Scgb3a2*.

Studies on the transcriptional role of Notch signaling in distinct tissues underscore the importance of tissue-specific transcription factors (22, 26). Moreover, synergistic regulation of the mouse *Scgb3a2* gene by TTF1 and other transcription factors such as C/EBP has been previously reported (18). We tested the possibility that NICD could act in concert with Ttf1 to transactivate the *Scgb3a2* promoter (Fig.5I). Co-expression of Ttf1 and NICD dramatically increased reporter activity (over 40 fold). Moreover, introducing a mutation in the *Rbpjk* high affinity site (TTCTCACG to TTGTCTCG) nearly abolished this synergistic interaction (Fig.5I). Together our data suggest a model in which the establishment of *Scgb3a2* expression airway progenitors is

critically dependent on Notch, which in conjunction with locally expressed transcription factors such as TTF1, activate gene transcription.

DISCUSSION

In this study we examined how Notch influences secretory cell fate specification in airway progenitors, and the influence of local microenvironment in generating diversity among secretory precursors during development. We provide evidence that commitment to a secretory cell fate occurs much earlier than previously recognized and we identify expression of *Scgb3a2* and Notch activation as early events in a program of secretory cell differentiation. Our *in vitro* assays show that Notch activation alone has a minimal effect in *Scgb3a2* transactivation and that Notch signaling is highly effective when combined with Ttf1. This context-dependency is of biological significance since genetic studies have shown that Ttf1 is critical for the overall induction of respiratory cell fate, including secretory Clara cells(27, 28). We extended our *in silico* promoter analysis to other secretory cell-associated genes like *Upk3a* and *Ccsp* and found multiple Rbpjk and Ttf1 binding sites in the promoters of both these genes. Thus, the Notch effects described here are unlikely restricted to *Scgb3a2* and despite the presence of endogenous Ttf1, it may reflect a broader role for Notch in the regulation of secretory cell fate-associated genes. Although luciferase analysis supported a role for NICD and Ttf1 in induction of *Ccsp* *in vitro* (Suppl. Fig2), constitutive activation of Notch *in vivo* was unable to induce *Ccsp* expression in E14.5 lungs despite the expression of Ttf1. This further underscores the importance of the developmental context in the Notch regulation of these cell fate-associated genes.

Clara cells in the NEB microenvironment have been described as morphologically and functionally distinct from the Clara cells elsewhere in the adult airways. Ultrastructural studies show that features of the secretory cells in this microenvironment can be discerned already in the developing lung(5). Here we show that this subpopulation can be identified throughout lung development based on levels and distribution of the marker genes *Scgb3a2*, *Ccsp*, *Upk3a* and *Cyp2f2*. However, the reduced levels of *Cyp2f2* mRNA that distinguish the pNEB-associated subpopulation in development do not have the functional implications reported in the adult. Interestingly, *Cyp2f2* IHC using antibody dilutions that detected antigen in the adult airway revealed little to no protein expression in the airways prior to birth. This suggests that *Cyp2f2* protein levels may be subject to post-transcriptional control.

While all the secretory progenitors in contact with the pNEB are set apart from their counterparts as a function of the time and intensity of expression of the secretory markers described here, as a unit they represent a heterogeneous population of secretory cells. At E14.5, most but not all cells in contact with pNEBs express equally high levels of *Scgb3a2* and NICD. Also, after Naphthalene injury, only a subpopulation of surviving secretory cells (the so called variant Clara cell) express high levels of *Upk3a*. Together, the distinctive features of the secretory cells in the NEB microenvironment suggest that these cells have specific functions during development and in the adult lung.

Accumulated evidence, including our data, support the idea that the pNEB microenvironment is a niche for secretory progenitors. Candidate signals present in NE cells potentially involved in these interactions include the Dll family of Notch ligands, other currently uncharacterized Ascl1 targets. The precise identification of this signal is important but beyond the scope of this work. Interestingly, the spatial-temporal pattern of *Scgb3a2* we describe in murine airways, including its enrichment in clusters in the pNEB microenvironment is highly reminiscent of the CCSP pattern reported in developing airways of humans(29). Although

SCGB3A2 has been reported in human neonatal lungs, no information is available on its pattern at early developmental stages in humans (14).

A number of human conditions are associated with abnormal increase in NE bodies, including NE cell hyperplasia of infancy (NEHI), Diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia (DIPNECH) and Bronchopulmonary dysplasia (BPD) The aberrant expansion of neuroepithelial cells in these conditions is likely to have a profound impact in the local microenvironment, as shown by the increase in the NEB-associated clusters of CCSP-expressing cells in BPD lungs(29). Thus, further studies to better understand the mechanisms and consequences of the cellular interactions in this microenvironment have potentially high clinical significance.

MATERIALS AND METHODS

Mouse strains and models

Developmental and adult expression studies were performed on CD1 mice otherwise stated (Charles River). Generation and genotyping of Rbpjk conditional knockouts and Ascl1 knockouts mice have been described previously (8, 30). Constitutive activation of Notch signaling in the developing airways was induced by breeding Shh cre/+ males to Rosa-26 Notch1-ICD IRES GFP females (Jackson Laboratory); embryos expressing Notch1-ICD were identified by GFP expression. Naphthalene-injury experiments were performed on 2-4 month old FVB/n females (Charles River). In these experiments mice were injected intraperitoneally with corn oil (control) or 250 mg/Kg Naphthalene dissolved in corn oil(4). Animals were sacrificed 48 hours post-injection.

A detailed description of the reagents and methodologies (ISH, IHC, Real time PCR, EMSA, Site-directed mutagenesis, DNA transfections and Luciferase reporter assays) used in this work can be found in Supplemental Materials.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Activation of the Notch pathway in the developing airways precedes expression of the Clara cell marker Ccsp. (A) A cartoon showing that Notch activation in airway progenitors correlates with and is essential for the specification of Clara cells. (B-H) Developmental expression of cleaved Notch1 (NICD, red), Ccsp (green) and the ciliated cell marker Foxj1 (white). (B-C) Low levels of NICD were detected at E12.5 in extrapulmonary airways including trachea (Tr) and bronchi (arrows) but no signal was detected in distal (dl) airways. Note strong NICD staining in the vasculature (V). No Ccsp or Foxj1 was detected at this stage. (D-F) At E14.5 NICD levels increased in extrapulmonary (D, higher magnification in E) and proximal intrapulmonary airways (D, higher magnification in F), but no labeling was detected in distal airways (inset in D). Foxj1 was detected in scattered non-NICD-expressing cells (not represented here) but no Ccsp was detected. (G-H) By E16.5 expression of NICD, Ccsp and Foxj1 was detected from proximal to distal airways. At E16.5 (G) and E18.5 (H) NICD co-localized with Ccsp (arrows) but not with Foxj1. Scale bar=10 μ m.

Figure 2: *Scgb3a2* expression correlates with NICD and identifies a distinct subpopulation of secretory progenitors that develop in association with presumptive neuroepithelial bodies (pNEBs). (A-C, I) Timecourse of *Scgb3a2* expression revealed a pattern similar to that of NICD (Fig. 1). *Scgb3a2* was first detected in the presumptive trachea (Tr) at E12.5 (A) and subsequently in the intrapulmonary airways from E13.5-E14.5 (B-C, I). Clusters of cells with strong signal could be discerned at E13.5-E14.5 (B, C, D, arrows). Colocalization of *Scgb3a2* and was readily observed in these cell clusters expressing strong *Scgb3a2* and NICD (D, arrows). (E) Double *Scgb3a2* ISH/Ascl1 IHC revealed that the *Scgb3a2*-labelled clusters (E, right panel) were juxtaposed to Ascl1-expressing pNEBs. Inset in E shows that *Scgb3a2* expressing cells (blue) have a clear nucleus that is not labeled by anti-Ascl1 (brown). No Ascl1 was detected in the trachea (E, left panel). (F) Ascl1 clusters lacking *Scgb3a2* in surrounding cells were detected in more distal airways at E13.5 suggesting that Ascl1 expression precedes *Scgb3a2*. (G) High-resolution optical section showing that luminal *Scgb3a2*-expressing cells (ISH, red) could be distinguished from basal Ascl1-expressing cells (IHC, green). (H) Double labeling of NICD and Ascl1 confirmed that clusters of cells with strong NICD (and *Scgb3a2*) labeling are juxtaposed to pNEBs. (I-N) Analysis of *Scgb3a2* expression at later stages revealed that secretory progenitors associated with pNEBs are a distinct subpopulation. (I) *Scgb3a2* ISH at E18.5 showed widespread expression from trachea to the terminal bronchiole (TB). (J-M) NICD expression at E18.5 was widespread including cells apposed to pNEBs (J) but the pNEB-associated cells expressed low levels of Ccsp compared to their neighbors (K-M). (N-Q) Triple-labeling for *Scgb3a2* (red), Ccsp (green) (ISH) and CGRP (blue) (IHC) at E18.5 showed that cells apposed to pNEBs express *Scgb3a2* and low Ccsp (arrowhead) and some have *Scgb3a2* but negligible Ccsp (arrow). Elsewhere *Scgb3a2* and Ccsp signals are strong and colocalized (N, in yellow). Scale bar=10 μ m.

Figure 3: High levels of Uroplakin 3A (*Upk3a*) expression distinguishes secretory precursors in the pNEB microenvironment (A) Profiling of E18.5 control and Notch signaling-deficient (*Rbpj*^{cnul}) lungs identified known markers for secretory cells and implicated

Upk3a as a novel secretory marker; table shows differentially-expressed genes. (B) RT-PCR analysis validated the difference in *Upk3a* expression reported in (A). (C, D) ISH at E18.5 revealed that *Upk3a* was highly enriched in clusters of cells in the proximal airways (C, arrows) and expressed at low-levels in scattered cells in distal airways (C, bracket) in controls. No signal was detected in *Rbpj^{cnul}* airways. (E-H) Developmental analysis of *Upk3a* expression by RT-PCR and ISH. (E) RT-PCR analysis showed that *Upk3a* levels increase throughout development. (F-H) *Upk3a* transcripts were detected by ISH from E13.5 onwards in cell clusters (F,G, boxed areas shown at higher magnification) juxtaposed to *Ascl1*-expressing cells (F, I, insets). *Upk3a* expression was also detected in cells in the adult airways and these were frequently juxtaposed to CGRP-expressing NEBs (H). (I-J) *Upk3a* expression was detected in subsets of cells in Naphthalene-treated animals 48h post-injury. Secretory cells that survived Naphthalene-exposure (48h) were labeled with *Scgb3a2* (I). Double labeling for *Upk3a* (ISH) and CGRP (IHC, green) revealed that *Upk3a* expressing cells (arrow) constitute a subset of the Naphthalene-resistant cells (compare *Upk3a*-positive cells in J with *Scgb3a2*-positive cells in I).

Figure 4: Specification of clusters of secretory precursors in the pNEB microenvironment is dependent on *Ascl1*. (A-D) Early pattern of *Scgb3a2* expression was perturbed in lungs from *Ascl1* null mutants. Typical clusters of high *Scgb3a2* expression at E14.5 were detected in control (A) but not in mutant lungs (B). Note that the diffuse pattern of *Scgb3a2* expression in the trachea was intact in the mutants at this stage (B, inset). At later stages distribution of *Scgb3a2* in control (C) and mutant (D) lungs were comparable. (E-H) *Upk3a* expression was perturbed in *Ascl1* null lungs. Clusters of high *Upk3a* expression were detected in control at both E14.5 (E) and E18.5 (G) but not in mutant lungs at either time point (F,H, circled regions). Rare *Upk3a*-expressing cells (non-clustered) could still be seen in the E18.5 *Ascl1* null mutant (H, inset).

Figure 5: Notch-dependent regulation of secretory cell-associated genes. (A-E) Analysis of Notch gain or loss of function in E14.5 airways *in vivo* (A,B) Disruption of Notch signaling in *Rbpj^{cnul}* mutants disrupts expression of *Scgb3a2* and *Upk3a*. Comparable segments of the intrapulmonary airways in A, B, encircled by grey lines, evidence negligible expression of both markers. Residual low-level expression of *Scgb3a2* was detected in the extrapulmonary airways of mutants only after prolonged ISH exposure (A, arrow). Double *Scgb3a2* ISH/*Ascl1* IHC shows that specification of pNEBs was unaffected in *Rbpj^{cnul}* mutants but no *Scgb3a2* was detected in surrounding cells (A, inset, arrowhead). (C-E) *Shhcre* driven overexpression of NICD resulted in widespread expression of *Scgb3a2* and *Upk3a* but did not lead to the precocious expression of *Ccsp*. (F-H) *In vitro* analysis of the role of Notch signaling in the regulation of the *Scgb3a2* promoter. (F) Schematic showing presumptive *Rbpjk* binding sites (high affinity site: red arrow; low affinity site: grey arrow) in the *Scgb3a2* promoter 1 kb upstream to the transcription start site. Right panel: sequence of a -273 bp fragment of the *Scgb3a2* promoter showing putative *Rbpjk* (red) and TTF1 (green) binding sites (G) EMSA carried out with nuclear extracts from Cos-1 cells (expressing endogenous *Rbpjk*) and oligonucleotides containing the putative high affinity binding site (CTRL) or a mutant derivative (MUT, sequences shown below), and antibody supershift with an anti-*Rbp-jk* antibody, validated the high affinity binding site. (H) Luciferase assay examining the sufficiency of NICD and TTF1 in the transactivation of the *Scgb3a2* promoter. NICD expression alone did not significantly transactivate the *Scgb3a2*

promoter (H) but co-expression of NICD and TTF1 synergistically upregulated reporter expression. This synergistic upregulation was abolished when the high affinity Rbp-jk binding site was mutated (also see G).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank FengZhi Shao for technical assistance and Mike Kirber, Narmada Khare and the members of the Cardoso lab and the Lung Development Group at the Pulmonary Center, BUMC for helpful discussions. We also thank Raphael Kopan and Mitsuru Morimoto for thought-provoking discussion and detailed comments on the manuscript. This work was funded by NIH-NHLBI (PO1 HL47049 to W.V.C.) and a BUMC start-up grant (to A.G.).

BIBLIOGRAPHY

1. Rawlins EL, *et al.* (2008) Epithelial stem/progenitor cells in lung postnatal growth, maintenance, and repair. (Translated from eng) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73:291-295 (in eng).
2. Rawlins EL, *et al.* (2009) The role of Scgb1a1+ Clara cells in the long-term maintenance and repair of lung airway, but not alveolar, epithelium. (Translated from eng) *Cell Stem Cell* 4(6):525-534 (in eng).
3. Reynolds SD & Malkinson AM (2010) Clara cell: progenitor for the bronchiolar epithelium. (Translated from eng) *Int J Biochem Cell Biol* 42(1):1-4 (in eng).
4. Stripp BR, Maxson K, Mera R, & Singh G (1995) Plasticity of airway cell proliferation and gene expression after acute naphthalene injury. (Translated from eng) *Am J Physiol* 269(6 Pt 1):L791-799 (in eng).
5. Hung KS (1982) Development of neuroepithelial bodies in pre- and postnatal mouse lungs: scanning electron microscopic study. (Translated from eng) *Anat Rec* 203(2):285-291 (in eng).
6. Reynolds SD, Giangreco A, Power JH, & Stripp BR (2000) Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration. (Translated from eng) *Am J Pathol* 156(1):269-278 (in eng).
7. Morimoto M, *et al.* (2010) Canonical Notch signaling in the developing lung is required for determination of arterial smooth muscle cells and selection of Clara versus ciliated cell fate. (Translated from eng) *J Cell Sci* 123(Pt 2):213-224 (in eng).
8. Tsao PN, *et al.* (2009) Notch signaling controls the balance of ciliated and secretory cell fates in developing airways. (Translated from eng) *Development* 136(13):2297-2307 (in eng).
9. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, & Lake RJ (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. (Translated from eng) *Science* 284(5415):770-776 (in eng).
10. Lai EC (2004) Notch signaling: control of cell communication and cell fate. (Translated from eng) *Development* 131(5):965-973 (in eng).
11. Ilagan MX & Kopan R (2007) SnapShot: notch signaling pathway. (Translated from eng) *Cell* 128(6):1246 (in eng).
12. Guseh JS, *et al.* (2009) Notch signaling promotes airway mucous metaplasia and inhibits alveolar development. (Translated from eng) *Development* 136(10):1751-1759 (in eng).
13. Ito T, *et al.* (2000) Basic helix-loop-helix transcription factors regulate the neuroendocrine differentiation of fetal mouse pulmonary epithelium. (Translated from eng) *Development* 127(18):3913-3921 (in eng).
14. Reynolds SD, Reynolds PR, Pryhuber GS, Finder JD, & Stripp BR (2002) Secretoglobins SCGB3A1 and SCGB3A2 define secretory cell subsets in mouse and human airways. (Translated from eng) *Am J Respir Crit Care Med* 166(11):1498-1509 (in eng).
15. Post LC, Ternet M, & Hogan BL (2000) Notch/Delta expression in the developing mouse lung. (Translated from eng) *Mech Dev* 98(1-2):95-98 (in eng).
16. Tsao PN, *et al.* (2008) Gamma-secretase activation of notch signaling regulates the balance of proximal and distal fates in progenitor cells of the developing lung. (Translated from eng) *J Biol Chem* 283(43):29532-29544 (in eng).

17. Jain R, *et al.* (2010) Temporal relationship between primary and motile ciliogenesis in airway epithelial cells. (Translated from eng) *Am J Respir Cell Mol Biol* 43(6):731-739 (in eng).
18. Tomita T, *et al.* (2008) CAATT/enhancer-binding proteins alpha and delta interact with NKX2-1 to synergistically activate mouse secretoglobin 3A2 gene expression. (Translated from eng) *J Biol Chem* 283(37):25617-25627 (in eng).
19. Borges M, *et al.* (1997) An achaete-scute homologue essential for neuroendocrine differentiation in the lung. (Translated from eng) *Nature* 386(6627):852-855 (in eng).
20. Hu P, *et al.* (2000) Ablation of uroplakin III gene results in small urothelial plaques, urothelial leakage, and vesicoureteral reflux. (Translated from eng) *J Cell Biol* 151(5):961-972 (in eng).
21. Liang FX, *et al.* (2001) Organization of uroplakin subunits: transmembrane topology, pair formation and plaque composition. (Translated from eng) *Biochem J* 355(Pt 1):13-18 (in eng).
22. Schwanbeck R, Martini S, Bernoth K, & Just U (2011) The Notch signaling pathway: molecular basis of cell context dependency. (Translated from eng) *Eur J Cell Biol* 90(6-7):572-581 (in eng).
23. Ong CT, *et al.* (2006) Target selectivity of vertebrate notch proteins. Collaboration between discrete domains and CSL-binding site architecture determines activation probability. (Translated from eng) *J Biol Chem* 281(8):5106-5119 (in eng).
24. Morel V & Schweisguth F (2000) Repression by suppressor of hairless and activation by Notch are required to define a single row of single-minded expressing cells in the *Drosophila* embryo. (Translated from eng) *Genes Dev* 14(3):377-388 (in eng).
25. Lu FM & Lux SE (1996) Constitutively active human Notch1 binds to the transcription factor CBF1 and stimulates transcription through a promoter containing a CBF1-responsive element. (Translated from eng) *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(11):5663-5667 (in eng).
26. Neves A, English K, & Priess JR (2007) Notch-GATA synergy promotes endoderm-specific expression of ref-1 in *C. elegans*. (Translated from eng) *Development* 134(24):4459-4468 (in eng).
27. Kimura S, *et al.* (1996) The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. (Translated from eng) *Genes Dev* 10(1):60-69 (in eng).
28. Minoo P, Su G, Drum H, Bringas P, & Kimura S (1999) Defects in tracheoesophageal and lung morphogenesis in Nkx2.1(-/-) mouse embryos. (Translated from eng) *Dev Biol* 209(1):60-71 (in eng).
29. Khor A, Gray ME, Singh G, & Stahlman MT (1996) Ontogeny of Clara cell-specific protein and its mRNA: their association with neuroepithelial bodies in human fetal lung and in bronchopulmonary dysplasia. (Translated from eng) *J Histochem Cytochem* 44(12):1429-1438 (in eng).
30. Guillemot F, *et al.* (1993) Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. (Translated from eng) *Cell* 75(3):463-476 (in eng).

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

In situ Hybridization (ISH), Immunohistochemistry (IHC) and Imaging

Embryonic and adult lungs were fixed overnight in 4% paraformaldehyde in PBS at 4°C and processed for frozen sections as per established protocols T7-linked gene-specific primers were used for PCR and subsequent riboprobe synthesis (T7 linkers in boldface).

Scgb3a2	Forward: 5'AATTAACCCTCACTAAAGGGAGGTGACAGCGAGCAGAACT 3'
	Reverse: 5'TAATACGACTCACTATAGGGCACGTAGCAAAGGCTTCTCC 3'
Scgb1a1	Forward: 5'AATTAACCCTCACTAAAGGGAGGTCTGGGAGCATCTTCT 3'
	Reverse: 5'TAATACGACTCACTATAGGGTCAACCGAACATTGTCAGGA 3'
<i>Upk3a</i>	Forward: 5'AATTAACCCTCACTAAAGGGGTGGCTGGACTGTGAACCTC 3'
	Reverse: 5'TAATACGACTCACTATAGGGTTGCCACCCTGACTAGGTA 3'
Cyp2f2	Forward: 5'AATTAACCCTCACTAAAGGGGGAACCTTTGGAGGCATGAAA 3'
	Reverse: 5'TAATACGACTCACTATAGGGAACCTCTGAGGCGTCTTGAA 3'

Digoxigenin-UTP (Roche) or Biotin-UTP-labeled (Roche) riboprobes were synthesized as per instructions provided by the manufacturer (Maxiscript kit, Ambion). ISH was performed as described previously (16) with the following modifications in concentrations of labeling reagents: DIG-UTP labeled probes (0.2 ng/ml), alkaline phosphatase-conjugated anti-DIG antibody (Roche, 1:2500), peroxidase conjugated anti-DIG Fab fragment (Roche, 1:100-1:500), Streptavidin-conjugated Peroxidase (Perkin Elmer, 1:100) was utilized for the detection of Biotin-UTP. BM-Purple (Roche) was used as a chromogenic substrate and Alexa488-Tyramide (Invitrogen, 1:100), Cy3-Tyramide (Perkin Elmer, 1:500) or Alexa647-Tyramide (Invitrogen, 1:100) as fluorescent substrates for alkaline phosphatase and peroxidase respectively. Endogenous peroxidase activity was quenched with 0.02N HCl for 20 min. at RT (31) and this protocol was also utilized between successive tyramide labeling reactions. The following antibodies were used for IHC: rabbit anti-cleaved Notch1-ICD (Cell Signaling, 1:500), mouse anti-Ascl1 (Becton-Dickinson, 1:100), goat anti-CC10 (Santa Cruz, 1:1500), rabbit anti-CGRP (Sigma, 1:1500), mouse anti-Foxj1 (eBioscience, 1:300). Antigen-retrieval prior to immunolabeling was performed with Antigen Unmasking solution (Vector Laboratories) in a microwave oven. For visualization of labeled antibodies, ABC Kit with Peroxidase/DAB (Vector Laboratories), secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488, 568, 647 (Invitrogen) and tyramide-conjugated fluorochromes (see above) were used. Images were acquired on a Nikon Labophot-2 microscope equipped with a Nikon Digital Sight DS-Ri1 CCD-camera or on a Zeiss LSM710 metaconfocal laser-scanning microscope.

Real Time PCR, Microarray Hybridization and Analysis

Total RNA from lungs of various stages and genotypes was isolated using Trizol (Invitrogen) and reverse-transcribed using oligo-dT primers provided in the Superscript III kit (Invitrogen). The methods used for Quantitative Real Time PCR have been published previously(8). Briefly, the following primers were obtained from Applied Biosystems:*Upk3a* (mm00452321_m1, mm01301754), *Scgb3a2* (mm005044412_m1) and β -actin (control). PCR reactions were constituted with the Assays-on-Demand kit (Applied Biosystems), and the samples were

analyzed on an ABI 7000 instrument (Applied Biosystems). For microarray profiling total RNA was submitted for labeling and hybridization (Mouse Gene 1.0 ST Whole Genome Array, Affymetrix) to the Boston University Microarray Core facility.

Electrophoretic Mobility Shift Assays

EMSA were carried out as described previously(18). In brief, synthetic oligonucleotides were radiolabeled with [γ -³²P]ATP (PerkinElmer Life Sciences) and T4 polynucleotide kinase. Nuclear extract prepared from COS-1 cells (2 mg) was diluted with Binding buffer (0.5 mg/ ml poly(dI-dC), 10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM dithiothreitol, 80 mM KCl, 20% glycerol, 0.04 mg/ ml bovine serum albumin) and incubated 15 min at room temperature with radiolabeled probe in the presence or absence of cold competitor (x20 fold). For super-shift assays, 2 ml of antibody was added to the sample solution prior to the probe. For antibody supershift analysis the anti-Rbpjk antibody (2ZRBP1, Cosmo Bio(23)) was used. Sequences for probe and competitors were as follows:

5'GAACAGCTTTGTTTCTCACGAGAATGTGATG-3'(probe)

5'GAACAGCTTTGTTTGTCTCGAGAATGTGATG-3' (mutant competitor).

Samples were electrophoresed on a 5% poly- acrylamide gel using 0.5X TBE buffer. Gels were dried and exposed to a phosphorimager screen and signals detected with Storm 840 (Amersham).

Site-directed mutagenesis, DNA transfections and Luciferase reporter assays

Site-directed mutagenesis to alter the high affinity Rbpjk binding site in the Scgb3a2-luciferase construct (25) was undertaken using the Quikchange II kit (Agilent). Reporter assays involved transfecting COS-1 with the appropriate Scgb3a2-luciferase construct together with other vectors. In brief, a transfection mixture contained 20 ml of OPTI-MEM (Invitrogen), 1 ml of FuGENE 6 (Roche Applied Science), 120 ng of Scgb3a2-luciferase reporter construct, 4 ng of pRL-TK having the Renilla luciferase gene connected to the herpes simplex virus- thymidine kinase promoter as an internal control (Promega), and 90 ng each of pcDNA3.1-TTF1, or NICD mammalian expression vector. The TTF1 expression vectors used has been described previously (18). For Notch activation, a 2.3kb Human Notch1-ICD insert in pcDNA3.1 (>98% homology to Mouse Notch1-ICD, gift from Jon Aster) was used. The transfection mixture was added to a well, mixed briefly, and cells were incubated for 48 hours. For Luciferase reporter assays, cells were washed once with phosphate-buffered saline (PBS) and lysed with passive lysis buffer (Promega). Luciferase activity was determined using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) and a Veritas Microplate Luminometer (Promega).

SUPPLEMENTARY FIGURES: LEGENDS

Supplementary Figure 1. Pattern of *Cyp2f2* expression at early stages distinguishes the cells in the pNEB microenvironment (A-B) Transcripts of *Cyp2f2* were detected in the extrapulmonary airways from E13.5 onwards (B) in a pattern that overlapped with *Scgb3a2* (A). (C-E) ISH followed by IHC on serial sections from E14.5 lungs showing the relative distribution of *Scgb3a2*, *Upk3a* and *Cyp2f2* in the pNEB microenvironment. *Scgb3a2* (C) and *Upk3a* (D) are enriched in the pNEB microenvironment at this stage while *Cyp2f2* (E) is not.

Supplementary Figure 2. *In vitro* analysis of the role of Notch signaling in the regulation of the *Ccsp* promoter. (A) Schematic of the *Ccsp* promoter with presumptive Rbpjk (low affinity sites highlighted in grey) and TTF1 (green) binding sites 1 kb upstream to the transcription start site. (B) Luciferase assay examining the sufficiency of NICD and TTF1 in the transactivation of the -454bp fragment (see A) of the *Ccsp* promoter. Co-expression of NICD and TTF1 synergistically upregulated reporter expression.

FIGURE1, Guha et al

FIGURE 2, Guha et al

FIGURE 3 Guha et al

Scgb3a2

Upk3a

E14.5

E18.5

FIGURE 4 Guha et al

FIGURE 5 Guha et al

SUPPLEMENTARY FIGURE 1, Guha et al

A

B

SUPPLEMENTARY FIGURE 2, Guha et al