

## ***Discusión***

---

## DISCUSIÓN

El procesamiento y la presentación de antígenos es un mecanismo clave en el desarrollo de la respuesta inmunitaria. Las células presentadoras de antígeno contienen los elementos necesarios para llevar a cabo los procesos de degradación, transporte y carga de los péptidos antigénicos en las moléculas de histocompatibilidad, que posteriormente serán exportadas a la membrana celular. A ese nivel tiene lugar el reconocimiento de los péptidos antigénicos por parte de los clones de linfocitos T específicos.

Clásicamente se han definido las moléculas de histocompatibilidad de clase I como las encargadas de presentar péptidos antigénicos de origen endógeno a los linfocitos T CD8+. Así, una célula infectada por un virus puede presentar los antígenos víricos en su superficie mediante las moléculas del MHC de clase I, ser reconocida por los linfocitos T específicos y ser eliminada. Sin embargo, sólo unas pocas células expresan las moléculas de histocompatibilidad de clase II que están encargadas de presentar péptidos antigénicos de origen exógeno a los linfocitos T CD4+, cuya función es modular a través de las citocinas la respuesta inmunitaria.

En el presente trabajo, se ha estudiado la regulación de los genes *tap1* y *Imp2*. Estos genes codifican proteínas cuyas funciones son vitales para la presentación antigénica de proteínas endógenas a través del MHC de clase I. La proteína *Imp2* forma parte de un complejo multiproteico conocido como proteosoma, cuya función es la degradación de proteínas citosólicas dando lugar a la formación de péptidos (Rock y col., 1994). La proteína *tap1*, por su parte, forma parte del complejo proteico que permite el transporte de los péptidos generados en el citosol hasta el retículo endoplasmático, para su posterior carga en las moléculas de histocompatibilidad de clase I (Lankat-Buttgereit y Tampé, 1999). Ambas proteínas son codificadas por genes que comparten una misma región promotora (Kishi y col., 1993).

En el presente estudio, se ha analizado el efecto de diferentes tipos de estímulos como el IFN- $\gamma$ , el LPS y el TNF- $\alpha$  en la expresión de *tap1* y *Imp2*, todos ellos reconocidos activadores de la respuesta inmunitaria. También se ha analizado la respuesta a otros factores como el TGF- $\beta$  y la dexametasona, que son inhibidores de la inducción mediada por el IFN- $\gamma$ . Por último se ha determinado la expresión de ambos genes en situaciones de estrés.

Los resultados obtenidos confirman que la inducción de la expresión de los genes murinos *tap1* y *Imp2* mediada por el IFN- $\gamma$  tiene lugar en células de diferentes

linajes, incluyendo los linfocitos B, los linfocitos T, los fibroblastos, así como en varias líneas celulares de macrófagos y en cultivos primarios de macrófagos derivados de la médula ósea. Los resultados obtenidos han demostrado que la inducción de *tap1* y *Imp2* tiene lugar tras una hora de activación con el IFN- $\gamma$ . Esta inducción se hace muy evidente a las tres horas y sigue incrementando sus niveles hasta las 12-24 horas, decayendo posteriormente. Por otra parte, se ha descrito que la inducción de *tap1* y *Imp2* por el IFN- $\gamma$  genera dos transcritos de ARNm de 2.3 Kb para *tap1* y de 900 pb para *Imp2* (Boehm y col., 1997).

El análisis de otros estímulos inductores de la expresión de *tap1* y *Imp2* demostró patrones de expresión diferentes del obtenido con el IFN- $\gamma$ . El LPS induce la expresión de *tap1* y *Imp2* a las seis horas de activación. Esta inducción es muy breve, ya que a las doce horas se detectan nuevamente niveles basales de *tap1* y ligeramente inferiores de *Imp2*. Los fibroblastos, por su parte, no responden al estímulo del LPS para la inducción de estos genes. Sin embargo, sí se ha descrito la inducción mediada por el LPS de otros genes en los fibroblastos, como el receptor para IL-10 (Weber-Nordt y col., 1994). Es posible que la presencia de determinados factores o vías de transducción de la señal producida por el LPS permitan la activación de algunos genes concretos en determinados tipos celulares.

Por otra parte, observamos que el TNF- $\alpha$  también es capaz de inducir la expresión de *tap1* y de *Imp2* en macrófagos. Esta inducción es muy tardía, ya que empieza a observarse a las 24 horas de activación. En la línea celular humana de fibroblastos HeLa, el TNF- $\alpha$  incrementa la expresión de *tap1* y *Imp2* mediante la unión del factor de transcripción NF $\kappa$ B al promotor (Wright y col., 1995). Por el contrario, en células neuronales se ha observado que el TNF- $\alpha$  no incrementa la expresión de *tap1* (Neumann y col., 1997).

Otro de los estímulos que pudiera influir en la expresión de *tap1* y *Imp2*, así como en la de otros genes, son las situaciones de estrés. *In vitro*, una situación de estrés puede ser inducida por la eliminación del suero en el medio de cultivo. En nuestros experimentos, observamos una inducción de la expresión de los genes *tap1* y *Imp2* en macrófagos derivados de médula ósea mantenidos en medio de cultivo en ausencia de suero. Esta inducción tiene lugar aproximadamente a las 24 horas de cultivo. Este patrón de inducción es muy semejante al observado tras la activación con el TNF- $\alpha$ . En condiciones de cultivo mínimo, los macrófagos secretan, entre otros, TNF- $\alpha$ . Esta citocina podría actuar de forma autocrina para inducir la expresión de *tap1* y *Imp2* en los macrófagos sometidos a situaciones de estrés *in vitro*. Sin embargo, existen otras explicaciones. Se ha observado que las situaciones de estrés en cultivo inducen

rápida la fosforilación del factor STAT1 en la serina 727 siguiendo una vía de activación distinta de la inducida por el IFN- $\gamma$  (Kovarik y col., 1999). Otro de los factores que inducen tap1 y tendrían relevancia en una situación de estrés es la proteína p53. Se ha descrito que p53 y agentes que dañan al ADN inducen la expresión de tap1 a través de un elemento de respuesta a la proteína p53, incrementando así el transporte de péptidos presentados en la superficie por las moléculas de clase I (Zhu y col., 1999).

Las distintas cinéticas en la expresión de tap1 y Imp2 por el IFN- $\gamma$  sugieren que se utilizan distintas vías en la transducción de las señales. Así se ha descrito que el IFN- $\gamma$  utiliza la vía JAK-STAT (Bach y col., 1997) mientras que el LPS utiliza la vía de activación de las MAP quinasas (Ulevitch y Tobias, 1995). En ciertos casos, como ocurre con la apoptosis, se ha podido demostrar que el efecto del LPS está mediado por la producción autocrina del TNF- $\alpha$  (Xaus y col., 2000). Sin embargo, este no es nuestro caso ya que el LPS induce la expresión de tap1 y Imp2 en solo 6 horas mientras que el TNF- $\alpha$  requiere 24 horas. Además, hemos observado que en ratones *knock out* para el receptor del TNF- $\alpha$  la expresión de tap1 y Imp2 por el LPS no está inhibida.

Nuestros resultados muestran un patrón de expresión diferente para las proteínas tap1 y Imp2 que son inducidas por los diferentes estímulos, según se trate de macrófagos o de fibroblastos. Se ha descrito que células de la misma estirpe pero con diferente grado de maduración, concretamente la línea celular de macrófagos murinos WEHI y la línea RAW 264.7, muestran un comportamiento distinto en respuesta al IFN- $\gamma$  (McDowell y col., 1995). En nuestro caso, gran parte del trabajo experimental descrito en este estudio se ha llevado a cabo utilizando células de la línea macrofágica RAW 264.7 ya que, tanto en los macrófagos derivados de la médula ósea como en los de la línea celular mencionada, se observa una expresión basal del ARNm para el gen Imp2 muy elevada, a diferencia de lo que ocurre en otras líneas celulares de macrófagos como por ejemplo Bac-1 F5a o WR19 y en los fibroblastos L929, que no muestran una expresión basal de Imp2.

El proteosoma, del cual la proteína Imp2 forma parte, está implicado en la degradación continua de proteínas en el citosol. Muchos de los péptidos que se generan tienen una vida media muy corta y no se acumulan en la célula. Por el contrario, la gran mayoría de péptidos son finalmente hidrolizados por una cadena de aminopeptidasas y son reutilizados en la maquinaria celular (Glickman, 2000). Sin embargo, en presencia de un estímulo inflamatorio, es la maquinaria de presentación antigénica la que cobra importancia. En estos casos existen linfocitos CD4 estimulados que van a secretar IFN- $\gamma$  y otras citocinas que inducirán la expresión de los genes tap1 y Imp2. Como

consecuencia habrá una mayor presentación antigénica a través del MHC de clase I que llevará a una amplificación de la respuesta inmunitaria.

La expresión diferencial de *tap1* y *Imp2* puede reflejar los diferentes papeles que desempeñan las dos proteínas en el mantenimiento de la inmunovigilancia y durante la respuesta inmunitaria. Se ha observado que en ausencia de *Imp2* la eficiencia de presentación de ciertos antígenos se encuentra reducida (Van Kaer y col., 1994). Sin embargo, la expresión inducida del *Imp2* por el IFN- $\gamma$  incrementa la cantidad de péptidos antigénicos que una vez transportados al retículo endoplasmático por el transportador TAP, pueden unirse a las moléculas de clase I.

Los resultados obtenidos han demostrado que la inducción de *tap1* y *Imp2* tiene lugar tras una hora de activación con IFN- $\gamma$ . Al tratarse de genes de inducción rápida, quisimos comprobar que esta inducción era independiente de síntesis proteica. Utilizando cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica, se comprobó que el patrón de inducción de *tap1* y *Imp2* estimulado por el IFN- $\gamma$  no mostraba ningún cambio significativo respecto al control, confirmando que la síntesis proteica no era necesaria en la inducción de estos genes. Según se desprende de los resultados de nuestro trabajo, los transcritos de ARN son altamente estables, ya que sus niveles no decaen de forma rápida en presencia de actinomicina D, que actúa bloqueando la transcripción. La elevada estabilidad de los ARNm indica que el IFN- $\gamma$  no modifica la vida media del ARN, sino que actúa a nivel de la transcripción de los dos genes (Cullell-Young y col., 2001). Nuestros resultados apoyan los ensayos de *run-on* en los que se ha visto que el IFN- $\gamma$  es capaz de inducir la expresión de *tap1* en células humanas (Cramer y Klemsz, 1997).

Puesto que no se requería síntesis proteica para la inducción de *tap1* y *Imp2* por el IFN- $\gamma$ , nos planteamos la implicación de STAT1 en esta inducción. El IFN- $\gamma$  ejerce mayoritariamente sus efectos mediante la transducción de la señal a través de este factor no requiriéndose síntesis *de novo* (Meraz y col., 1996). Utilizando ratones de la cepa C57BL/6 *knock out* para *stat1* pudimos determinar la implicación de este factor de transcripción en la inducción de *tap1* y *Imp2* por el IFN- $\gamma$ . La inhibición de la inducción de ambos genes en ratones *knock out* para *stat1* es completa, indicando que sin la existencia de STAT1 en las células no es posible la inducción de ninguno de los dos genes.

En nuestros estudios también determinamos que la inducción de *tap1* y *Imp2* por el IFN- $\alpha/\beta$  no es dependiente de STAT1. Aunque las señales clásicas de transducción conocidas para el IFN- $\alpha/\beta$  requieren la unión de diversos factores (STAT1, STAT2 y p48) y su posterior unión a las secuencias ISRE, observamos

sorprendentemente que para la inducción de los genes *tap1* y *Imp2* el factor de transcripción STAT1 no estaba implicado en la transducción de la señal del IFN- $\alpha/\beta$ . Nuestros resultados son contradictorios con los llevados a cabo en la línea celular humana de fibrosarcoma 2FTGH (control) y en su derivada U3A (deficiente para STAT1) donde se ha establecido que STAT1 es necesario para la inducción de *tap1* por el IFN- $\alpha/\beta$  (Min y col., 1998). Hasta la fecha, han sido descritos distintos factores de transcripción que se activan en respuesta al IFN- $\alpha$ . El ISGF-3 es un complejo formado por STAT1, STAT2 y p48 (Schindler, 1999). El factor AAF (*IFN-alpha activation factor*) (Decker y col., 1991) que no presenta ninguna diferencia con el factor GAF (STAT1 $\alpha$ -STAT1 $\alpha$ ) pero que a diferencia de éste no se une a la secuencia GAS del promotor del gen GBP (*guanylate-binding protein*) (Shuai y col., 1992). Por último, también se ha demostrado la activación de STAT1, mediante la unión a la región GAS (Min y col., 1998). Es posible que en los distintos tipos celulares, como los fibroblastos y los macrófagos, la señal de transducción del IFN- $\alpha/\beta$  siga vías distintas. Así se puede pensar que exista una vía de transducción de la señal del IFN- $\alpha/\beta$  específica en células presentadoras de antígeno aún por determinar. Por otra parte, tampoco podemos descartar diferencias a este nivel entre células humanas y células de ratón.

De igual forma, pudimos observar que el factor de transcripción STAT1 está implicado en la vía de activación de *tap1* y *Imp2* por el LPS. El lipopolisacárido activa NF $\kappa$ B y también el factor STAT1 (Mackman, 2000), aunque la vía de activación de STAT1 mediada por el LPS no está claramente determinada. Se ha descrito en la línea monocítica humana THP-1 que el LPS puede activar directamente a un factor similar a STAT (Tsukada y col., 1996). Existen tres vías para la activación génica mediadas por el LPS. Primero, puede ser que la inducción de la expresión génica por el LPS sea independiente de la activación de STAT1. Segundo, que el LPS pueda directamente activar una o más moléculas de STAT, aunque la señal no involucre directamente la vía JAK/STAT (Gao y col., 1998). Finalmente, el LPS puede activar la expresión génica de múltiples citocinas como el TNF- $\alpha$  y los IFNs de tipo I ( $\alpha$  y  $\beta$ ) (Ohmori y Hamilton, 2001). En la inducción de la expresión de *tap1* y *Imp2* mediada por el LPS es necesaria la activación de STAT1. Esta activación no se debe a la producción de IFN- $\alpha/\beta$ , ya que la inducción de *tap1* y *Imp2* por esta citocina es independiente de STAT1. También podemos descartar, como hemos mencionado con anterioridad, la implicación del TNF- $\alpha$ . Así, podemos concluir que la inducción de *tap1* y *Imp2* por el LPS sigue una vía de activación de STAT1 aún por determinar. Se ha observado que STAT1 combina señales derivadas del IFN- $\gamma$  y del LPS durante la activación de los macrófagos. El LPS produce una rápida fosforilación de STAT1 en la Ser 727. Cuando los macrófagos son tratados secuencial o simultáneamente con el LPS y el IFN- $\gamma$ , el conjunto de moléculas fosforiladas de STAT1 en Tyr 701 y Ser 727 se ve fuertemente incrementado indicando

un punto de convergencia en la respuesta de los macrófagos a los estímulos inmunológicos (Kovarik y col., 1998).

El IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  también cooperan para inducir la expresión de algunos genes durante la inflamación. Este sinergismo se debe a los factores de transcripción STAT1 y NF $\kappa$ B (Ohmori y col., 1997). En nuestros estudios determinamos que la inducción de tap1 y Imp2 por el TNF- $\alpha$  es dependiente de STAT1 ya que no se observa dicha inducción en los ratones *knock out* para este gen. Pensamos que STAT1 podría estar implicado en la inducción de IRF-1 a través de las secuencias GAS presentes en su región promotora. Curiosamente se ha observado en fibroblastos humanos que STAT1 bloquea la activación de NF $\kappa$ B a través de su asociación con el receptor del TNF- $\alpha$  (TNFR1) (Wang y col., 2000). Sin embargo, como discutimos más adelante, nuestros resultados demuestran que tanto IRF-1 como NF $\kappa$ B son necesarios para la inducción de tap1 y Imp2 por el TNF- $\alpha$ . Es posible que la vía de activación de tap1 y Imp2 dependiente de STAT1 por el TNF- $\alpha$  sea distinta en los macrófagos y en los fibroblastos y que la activación de STAT1 en células presentadoras de antígeno no implique la inhibición de NF $\kappa$ B. De esta forma quedaría aún por determinar la vía que seguiría la inducción de tap1 y Imp2 por el TNF- $\alpha$  a través de STAT1.

Las diferencias observadas en cuanto al patrón de expresión de tap1 y Imp2 inducida por diferentes estímulos motivaba un estudio más exhaustivo de las secuencias reguladoras presentes en el promotor compartido por estos genes. La región promotora de los genes tap1 y Imp2 en el ratón está definida por los 569 pb comprendidos entre el codón de inicio de la traducción de tap1 y el codón de inicio de la traducción de Imp2 (Marusina y col., 1997). Dentro de esta región promotora, hemos determinado la presencia de diversas secuencias nucleotídicas susceptibles de unión de distintos factores de transcripción. Existen dos cajas GAS localizadas en las posiciones 163-172 y 239-247, una caja IRF1 en la posición 177-187, una caja NF $\kappa$ B en la posición 109-119 y dos posibles cajas AP1 en las posiciones 145-150 y 410-415, todas ellas en la dirección de Imp2. En una serie de estudios previos llevados a cabo en los fibroblastos humanos (células HeLa), se ha demostrado que el gen tap1 está regulado por un promotor bidireccional de 593 pb que a su vez regula también la transcripción de Imp2. Además, se ha observado que las secuencias reguladoras de los genes tap no contienen motivos TATA en sus regiones 5' pero sí elementos ricos en GC (posibles cajas Sp1). Estos elementos se encuentran localizados a 128 nucleótidos por delante del inicio de transcripción para tap1 y a 79 nucleótidos para tap2 (Wright y col., 1995). Mediante experimentos de mutagénesis dirigida en estas regiones, se ha demostrado una reducción de hasta 3 veces en la actividad basal del promotor de tap1 (Wright y col., 1995). Existen otros ejemplos de promotores compartidos como son el promotor

bidireccional del gen PARP-2 (*poly ADP-ribose polymerase 2*) y el gen ARNasa P ARN. A pesar de compartir el promotor, estos genes se expresan de forma diferencial dependiendo del tipo celular (Amé y col., 2001). También se han observado promotores bidireccionales en el virus de Epstein-Barr (Takacs y col., 2001) y en algunos genes que codifican para diferentes proteínas de la colagenasa de tipo IV (Segal y col., 2001).

Mediante experimentos de mutagénesis dirigida se introdujeron deleciones en las diversas cajas reguladoras de *tap1* y *Imp2*. Así, pudimos observar como las deleciones introducidas independientemente en las cajas GAS e IRF-1 inhiben completamente la inducción de ambos genes por el IFN- $\gamma$ . Ello podría indicar que ambos factores de transcripción, STAT1 que se une a la caja GAS, e IRF-1 son necesarios para la inducción de los genes *tap1* y *Imp2* por el IFN- $\gamma$ . Tampoco podemos descartar un efecto cooperativo establecido entre los factores de transcripción STAT1 e IRF-1 en la inducción de *tap1* y *Imp2* por el IFN- $\gamma$  debido a la proximidad física de sus secuencias de unión, ya que éstas se sitúan una junto a la otra en el promotor (Figura 51). Este efecto cooperativo entre estos factores de transcripción ya se ha descrito con anterioridad para la expresión constitutiva de *Imp2*. En la línea celular humana de fibrosarcoma 2fTGH, se ha observado que el factor de transcripción STAT1 no fosforilado e IRF-1 se unían al promotor para activar la transcripción del gen *Imp2* (Chatterjee-Kishore y col., 2000). Mediante experimentos de geles de retardo pudimos observar que efectivamente STAT1 se une al promotor de *tap1* y *Imp2* en células inducidas con el IFN- $\gamma$ . En cambio, no es posible detectar una banda de retardo cuando se utilizan extractos obtenidos a partir de las células que carecen de STAT1.

Por otra parte, observamos en los ensayos de transfección que sólo la caja GAS estaba implicada en la inducción de *tap1* y *Imp2* por el LPS (Figura 51). En un estudio publicado recientemente se ha demostrado que la mutación de la caja GAS del promotor de *tap1* inhibe la inducción sinérgica de este gen mediada por el IFN- $\gamma$  y el LPS en macrófagos humanos de la línea celular THP-1 (Cramer y col., 2000). En dicho trabajo se observa que la mutación de la caja GAS no modifica los niveles de expresión de la luciferasa analizados a las 24 horas tras la activación con el LPS respecto del vector control. Nuestros resultados demuestran claramente que la inducción del ARNm de *tap1* por el LPS alcanza un máximo a las 6 horas, no detectándose expresión a las 24 horas. Ello implica una disminución de la actividad del promotor debida al LPS entre las 6 y las 12 horas de activación de la que se desconoce el mecanismo. Por lo tanto es posible que la inducción de la luciferasa regulada por el promotor de *tap1* y mediada por el LPS no sea detectable a las 24 horas y sin embargo si que es detectable a las 6 horas de activación. Ello confirma el efecto activador del LPS independientemente de la activación por el IFN- $\gamma$ .

Por último, pudimos determinar que las secuencias nucleotídicas implicadas en la inducción de *tap1* y *Imp2* por el  $\text{TNF-}\alpha$  eran las cajas IRF-1 y  $\text{NF}\kappa\text{B}$  (Figura 51). El  $\text{TNF-}\alpha$  activa el factor de transcripción  $\text{NF}\kappa\text{B}$  mediante la activación de la quinasa I $\kappa$ B que fosforila a dicho factor. Esta activación permite la traslocación al núcleo del factor  $\text{NF}\kappa\text{B}$  y su posterior unión al ADN (Wajant y Scheurich, 2001). Por otra parte el  $\text{TNF-}\alpha$  induce rápidamente la transcripción de IRF-1 a través de los elementos  $\kappa\text{B}$  presentes en su promotor (Pine, 1997). Podríamos pensar que para la inducción de la expresión de *tap1* y *Imp2* por el  $\text{TNF-}\alpha$  fuera necesario que se diera a la vez la unión al ADN del factor IRF-1, activado por el  $\text{TNF-}\alpha$  a través de los elementos  $\kappa\text{B}$ , y del factor  $\text{NF}\kappa\text{B}$ .

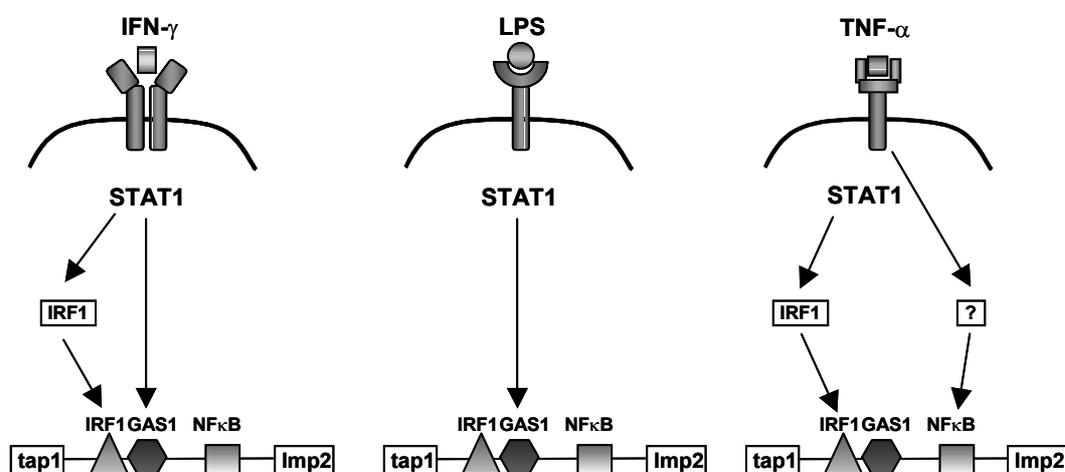


Figura 51. Posibles mecanismos de activación de la expresión de los genes *tap1* y *Imp2* inducidos por IFN- $\gamma$ , LPS y TNF- $\alpha$ .

Durante el análisis de las posibles secuencias reguladoras presentes en el promotor de *tap1* y *Imp2*, definimos la existencia de varias cajas PU, una de ellas situada en la caja GAS del promotor. PU.1 es un factor de transcripción específico de la estirpe mielo-monocítica y está implicado en la proliferación y diferenciación de los macrófagos (Lloberas y col., 1999). También se ha descrito un papel inhibitorio del factor PU.1 en la expresión de algunos genes implicados en la presentación de antígenos en el ratón, como por ejemplo el gen I-A $\beta$  del MHC de clase II (Borràs y col., 1995). Nuestros resultados demuestran que la expresión de PU.1 en los fibroblastos murinos, mediante la transfección de un vector de expresión que codifica para esta proteína, inhibe la expresión de los genes *tap1* y *Imp2* inducida por IFN- $\gamma$ . Como se ha descrito con anterioridad, es posible que, debido a la localización de la caja PU.1 en el promotor de *tap1* y *Imp2*, el factor de transcripción PU.1 impida un correcto funcionamiento de la

maquinaria de la transcripción, afectando de esta manera la producción de los ARNm para tap1 y Imp2.

Existen otros estímulos que ejercen también efectos inhibidores en la expresión de tap1 y Imp2. Por ejemplo, el TGF- $\beta$  y el IFN- $\gamma$  tienen efectos opuestos en diversas funciones celulares pero la base de este efecto antagonista es aún desconocida. Se ha visto que el TGF- $\beta$  es una citocina inmunoreguladora que inhibe la expresión del MHC de clase II inducida por el IFN- $\gamma$  en varios tipos celulares (Piskurich y col., 1998). Recientemente se ha observado que la inhibición de la expresión del CIITA (*class II transactivator*) mediada por el TGF- $\beta$  ocurre a nivel transcripcional, y que la actividad tanto constitutiva como inducida por el IFN- $\gamma$  del promotor de tipo IV del CIITA es inhibida por el TGF- $\beta$ . Sin embargo, el TGF- $\beta$  no afecta a las señales de activación del CIITA mediadas por el IFN- $\gamma$  como son la inducción de STAT1 por esta citocina, la unión de STAT1 al ADN y/o la inducción de IRF-1. La eliminación de la inhibición del TGF- $\beta$  en la expresión del CIITA en astrocitos deficientes en la proteína smad 3 demostraba que esta proteína era esencial en la inhibición de la expresión del CIITA por el TGF- $\beta$  y por lo tanto en la inhibición de la expresión del MHC de clase II mediada por el TGF- $\beta$  (Dong y col., 2001). Cuando realizamos estudios con el TGF- $\beta$  observamos que se inhibía la inducción de tap1 y Imp2 producida por el IFN- $\gamma$ . Así, el TGF- $\beta$  actuaría también como un inhibidor de la presentación de antígeno mediada por el MHC de clase I. En nuestros estudios también observamos que el TGF- $\beta$  inhibía la expresión basal, no inducida, de tap1 y Imp2. Se han descrito una serie de genes que son inhibidos por el TGF- $\beta$  a través de un factor inhibidor que se une a la secuencia nucleotídica GNNTTGGtGA (Ker y col., 1990). En nuestro caso no hemos observado la presencia de esta secuencia en la región promotora de tap1 y Imp2, si bien no podemos descartar que este factor inhibidor inducible por TGF- $\beta$  se una al ADN mediante otras secuencias de reconocimiento.

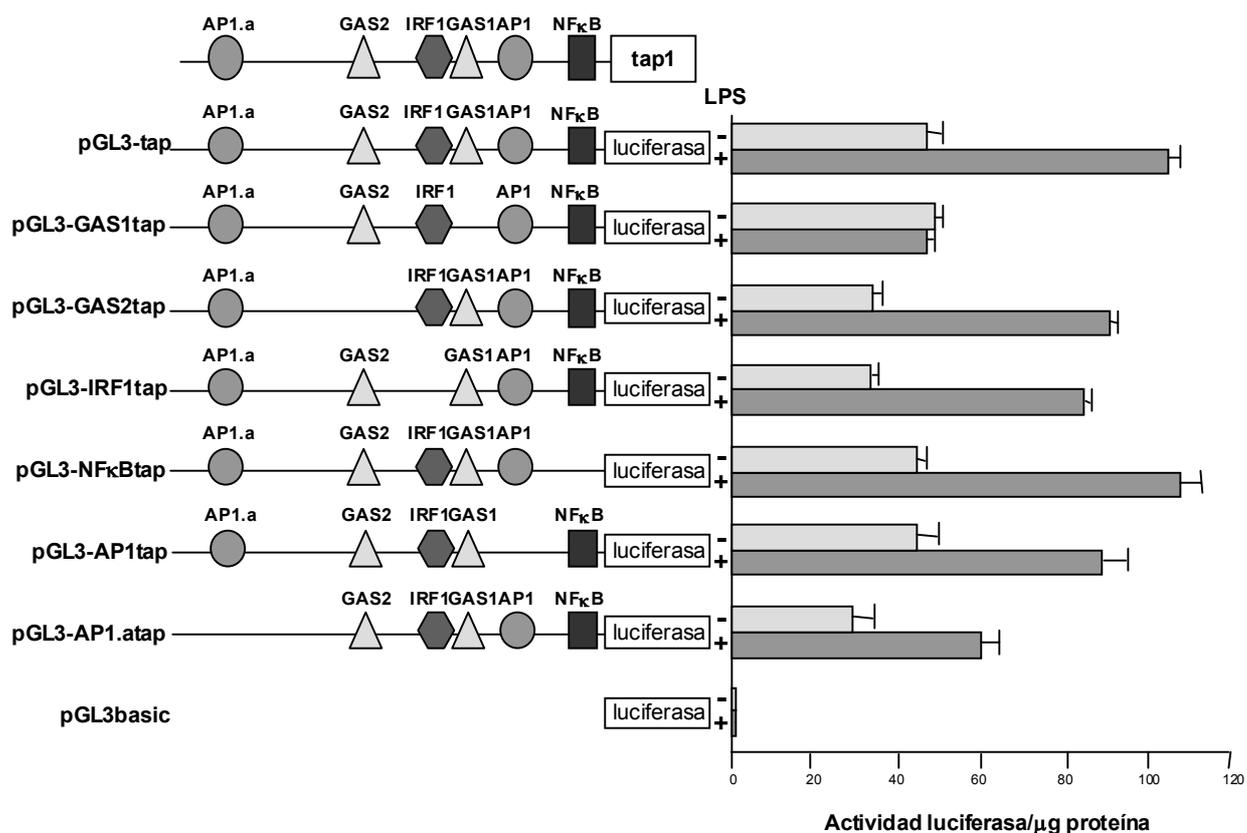
Otros de los factores reguladores de la respuesta inmunitaria son los glucocorticoides. En los estudios realizados en macrófagos para determinar el efecto de los glucocorticoides, observamos que la dexametasona inhibía la expresión de tap1 y Imp2 inducida por el IFN- $\gamma$ . Se ha descrito que el receptor de los glucocorticoides bloquea la unión al ADN de un factor de transcripción de un gen del MHC de clase II, inhibiendo así la inducción de dicho gen (Celada y col., 1993). El receptor de los glucocorticoides actúa a la vez como factor de transcripción y como modulador de otros factores de transcripción. Se ha observado que existen interacciones proteína-proteína entre los glucocorticoides con otros factores de transcripción como jun, fos, NF $\kappa$ B, etc... (Reichardt y col., 2001). También se ha observado que la dexametasona induce la producción de citocinas de tipo 2, entre ellas la IL-4 y la IL-10 a través de la inhibición de

citocinas de tipo 1 como el IFN- $\gamma$  (Agarwal y Marshall, 2001). Todo ello se correlaciona también con la disminución de la expresión observada de tap1 y tap2 mediada por la IL-10 (Salazar-Onfray y col., 1997).

En resumen, en este trabajo hemos podido determinar la regulación de los genes tap1 y Imp2 implicados en la presentación antigénica a través de las moléculas del MHC de clase I. Existen citocinas que son capaces de inducir mientras que otras inhiben la expresión de tap1 y Imp2. Las vías de señalización comparten elementos comunes como STAT1, así como regiones implicadas en la regulación génica que están directamente relacionadas con los procesos de señalización. Todo ello nos muestra la complejidad de la maquinaria celular y las diferencias existentes entre los distintos tipos celulares.

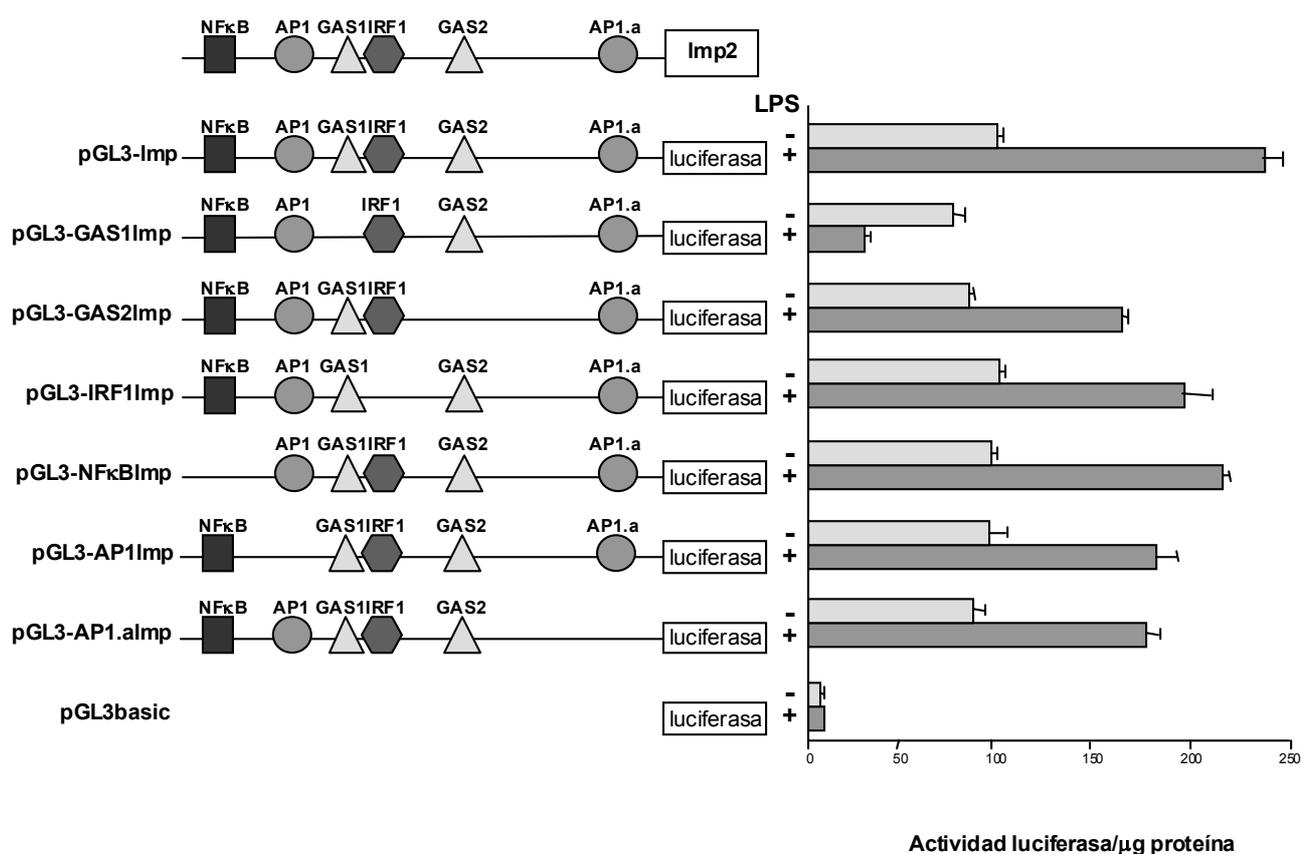
### 2.3. Análisis de las secuencias nucleotídicas implicadas en la inducción de tap1 y Imp2 por el LPS

Así pues, el LPS induce la expresión de los genes *tap1* y *Imp2*, aunque siguiendo una cinética de inducción diferente a la obtenida con el IFN- $\gamma$ . Asimismo observamos que, como ocurre con el IFN- $\gamma$ , la vía de transducción de la señal por LPS es también dependiente de STAT1. A continuación, analizamos, mediante experimentos de transfección, cuáles son las secuencias de ADN presentes en el promotor de *tap1* y *Imp2* que pueden estar implicadas en la regulación de su expresión inducida por el LPS. Las transfecciones fueron realizadas en células RAW 264.7 y se utilizaron los mismos constructos analizados en el caso del IFN- $\gamma$ . Una vez analizada la expresión del gen indicador (luciferasa), y corregida según la cantidad de proteína presente en cada muestra, pudimos observar como la caja que contiene la secuencia de reconocimiento GAS1 (vector pGL3GAS1) es esencial para la expresión del gen de la luciferasa tras la activación con el LPS, y por tanto de los genes *tap1* y *Imp2*. Sin embargo, y a diferencia de los resultados obtenidos con el IFN- $\gamma$ , la mutación de la secuencia de reconocimiento IRF-1 (vector pGL3IRF1) no altera de forma significativa la expresión del gen indicador.



**Figura 41. Determinación funcional de la actividad promotora de *tap1* inducida por el LPS en macrófagos.** Se transfectó la línea celular Raw 264.7 con los constructos indicados en la figura y a las 12 horas post-transfección se activó con LPS (100 ng/ml) durante 6 horas. Posteriormente se analizó la actividad luciferasa y la determinación de proteína. Cada punto se ha realizado por triplicado representándose la media y la desviación estándar. Este ensayo es representativo de tres experimentos independientes

Otras mutaciones que, *a priori*, podrían afectar a la expresión génica inducida por el LPS, como las que alteran las cajas AP-1 (vectores pGL3AP1 y pGL3AP1.a) y NFκB (vector pGL3NFκB), no impiden o inhiben la expresión de este gen. Así pues, GAS1 parece ser la única secuencia de reconocimiento implicada en la regulación de *tap1* y *Imp2* en respuesta al LPS (Figuras 41 y 42).

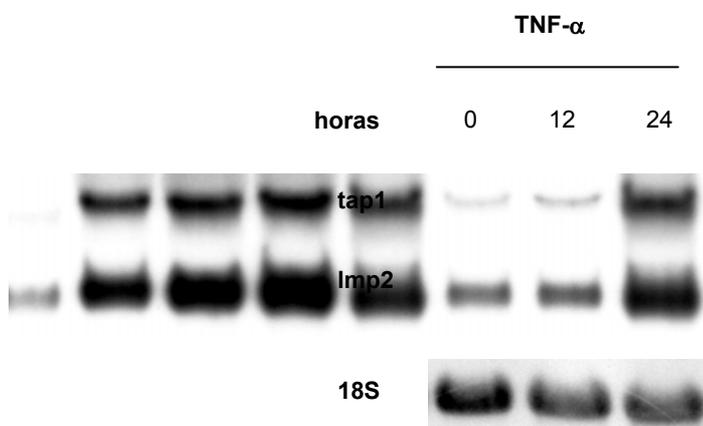


**Figura 42. Determinación funcional de la actividad promotora de *Imp2* inducida por el LPS en macrófagos.** Se transfeció la línea celular Raw 264.7 con los constructos indicados en la figura y a las 12 horas post-transfección se activó con LPS (100 ng/ml) durante 6 horas. Posteriormente se analizó la actividad luciferasa y la determinación de proteína. Cada punto se ha realizado por triplicado representándose la media y la desviación estándar. Este ensayo es representativo de tres experimentos independientes

### 3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TAP1 Y LMP2 POR EL TNF- $\alpha$

#### 3.1. Inducción de la expresión de tap1 y Imp2 por el TNF- $\alpha$

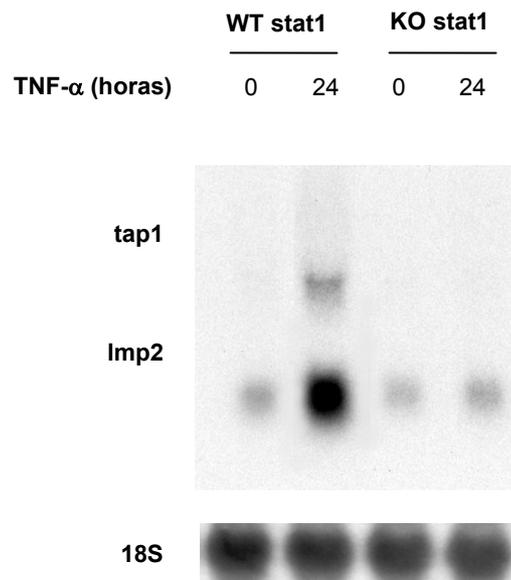
Hasta la fecha ha sido descrito un numeroso grupo de genes que son regulados por el TNF- $\alpha$ , entre los que se encuentran genes que codifican para citocinas, factores de crecimiento, receptores, moléculas de adhesión celular, factores de transcripción, y muchos otros (Liu y Han, 2001). La inducción de algunos de estos genes en respuesta al TNF- $\alpha$  se debe a la activación de factores de transcripción como AP-1 y más específicamente NF $\kappa$ B. Al determinarse la presencia de una secuencia nucleotídica diana para NF $\kappa$ B en el promotor compartido por los genes tap1 y Imp2, decidimos analizar la implicación de la citocina TNF- $\alpha$  en la regulación de la expresión génica de tap1 y Imp2. Utilizando técnicas similares a las descritas en los anteriores apartados, se activaron macrófagos de la línea celular RAW 264.7 con TNF- $\alpha$  a una concentración de 10 ng/ml y se determinó la expresión de tap1 y Imp2. Según puede apreciarse en la figura 43, ambos genes experimentan un incremento en su expresión a las 24 horas de la activación en presencia de esta citocina. Este patrón de expresión es similar al obtenido con el IFN- $\gamma$ , aunque ligeramente desplazado en el tiempo y muy diferente al patrón obtenido cuando el agente estimulante es el LPS.



**Figura 43. Cinética de inducción de la expresión de tap1 y Imp2 por el TNF- $\alpha$  en células RAW 264.7.** Las células se incubaron en presencia de TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) durante los tiempos indicados. Se analizó la expresión de tap1 y Imp2 por Northern Blot utilizando 20  $\mu$ g de ARN total por carril. La expresión del gen 18S fue analizada como control de carga y transferencia. Estos resultados son representativos de dos experimentos independientes.

### 3.2. La expresión de *tap1* y *Imp2* inducida por el TNF- $\alpha$ es dependiente de STAT1 en macrófagos de médula ósea

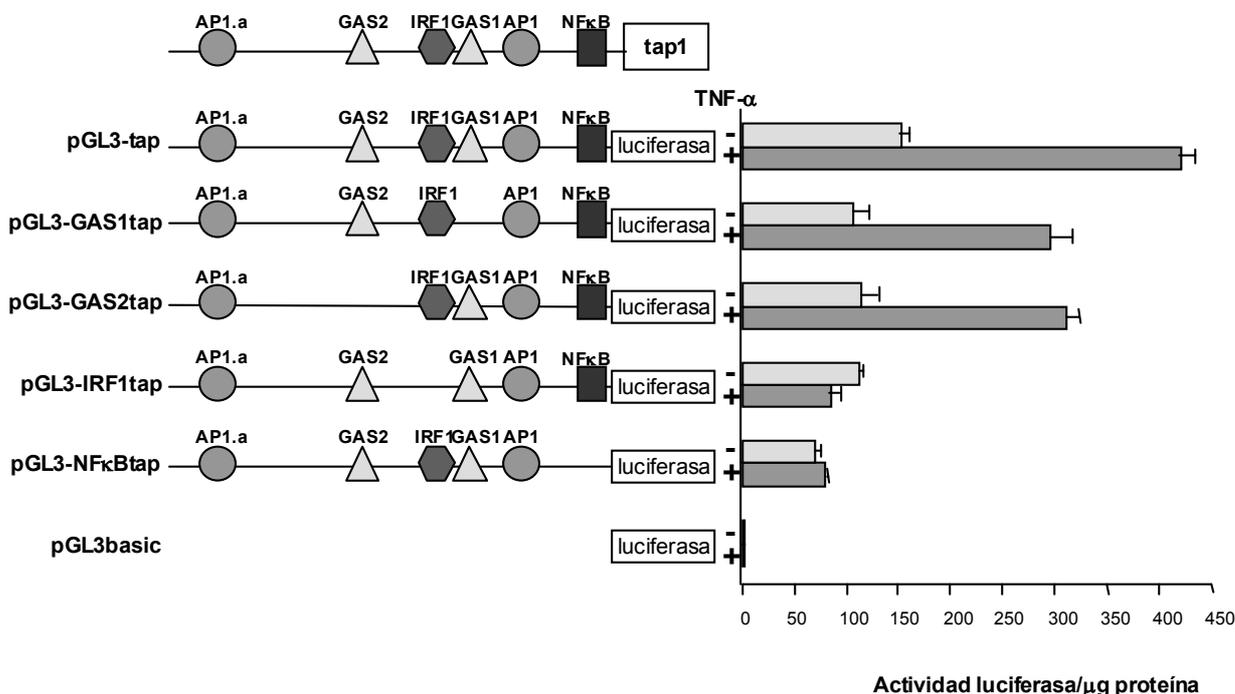
Como hemos visto, el IFN- $\gamma$ , el LPS y el TNF- $\alpha$  son capaces de inducir la expresión de los genes *tap1* y *Imp2*. Además, los dos primeros requieren de la participación del factor STAT1 según se desprende de los experimentos con células de ratones KO para *stat1*. Estos experimentos se llevaron a cabo esta vez en presencia de TNF- $\alpha$ , para verificar si STAT1 podía también estar relacionado con la expresión de los genes *tap1* y *Imp2* inducida por el TNF- $\alpha$ . Se utilizaron macrófagos derivados de médula ósea de ratones KO para *stat1* y se estimularon con TNF- $\alpha$ . A las 24 horas de estimulación, observamos como los genes *tap1* y *Imp2* no se expresan en los macrófagos KO para *stat1*, contrariamente a la expresión normal detectada en las células de la cepa salvaje. Así, determinamos que el factor STAT1 es imprescindible para la expresión de los genes *tap1* y *Imp2* inducida no sólo por el IFN- $\gamma$ , sino también por el LPS y el TNF- $\alpha$  (Figura 44).



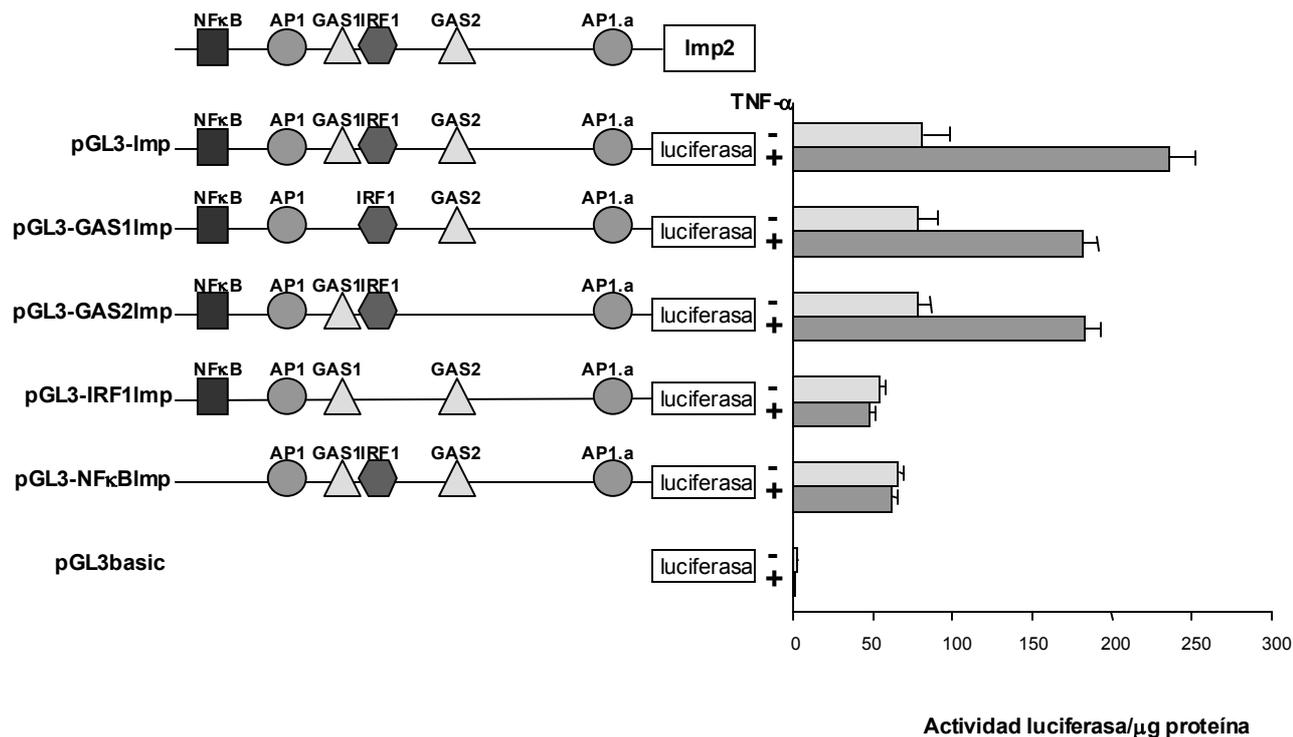
**Figura 44. Expresión de *tap1* y *Imp2* inducidos por el TNF- $\alpha$  en macrófagos de médula ósea de ratones WT*stat1* (*wild type stat1*) y de KO *stat1* (*knock out stat1*).** La determinación de la expresión de *tap1* y *Imp2* inducida por el TNF- $\alpha$  a los tiempos indicados se realizó por Northern blot, utilizando 20  $\mu$ g de ARN total por carril. Se utilizó como control de la cantidad de ARN en cada pocillo la sonda 18S. Estos resultados son representativos de dos experimentos independientes.

### 3.3. Análisis de las secuencias nucleotídicas implicadas en la inducción de *tap1* y *Imp2* por el TNF- $\alpha$

Como ocurría con el IFN- $\gamma$  y el LPS, el TNF- $\alpha$  es también capaz de inducir la expresión de los genes *tap1* y *Imp2*, aunque cada patrón de expresión presenta rasgos diferentes, que se ponen de manifiesto en las distintas cinéticas de expresión. De nuevo observamos que la presencia del factor STAT1 es un requisito indispensable para la correcta expresión de estos genes, en cualquiera de los tres sistemas de activación utilizados. A continuación, siguiendo los modelos anteriores, analizamos las secuencias de ADN presentes en el promotor de *tap1* y *Imp2* que pueden estar implicadas en la regulación de la expresión de *tap1* y *Imp2* inducida por el TNF- $\alpha$ . Los experimentos de transfección fueron realizados en células RAW 264.7 y se utilizaron los mismos constructos analizados en el caso del IFN- $\gamma$  y el LPS. En este caso, los experimentos de transfección mostraron que las cajas implicadas en la regulación de la expresión de *tap1* y *Imp2* por el TNF- $\alpha$  son NF $\kappa$ B e IRF-1 (Figuras 45 y 46). La mutación de las secuencias de reconocimiento para IRF-1 o NF $\kappa$ B inhibe completamente la expresión del gen indicador obteniéndose una señal no superior al control basal no activado.



**Figura 45. Determinación funcional de la actividad promotora de *tap1* inducida por el TNF- $\alpha$  en macrófagos.** Se transfectó la línea celular Raw 264.7 con los constructos indicados en la figura y a las 12 horas post-transfección se activó con TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) durante 24 horas. Posteriormente se analizó la actividad luciferasa y la determinación de proteína. Cada punto se ha realizado por triplicado representándose la media y la desviación estándar. Este ensayo es representativo de tres experimentos independientes.



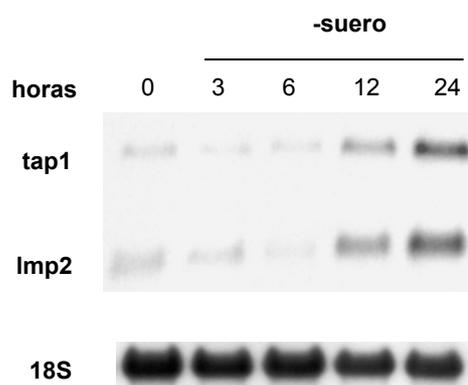
**Figura 46. Determinación funcional de la actividad promotora de *Imp2* inducida por el TNF- $\alpha$  en macrófagos.** Se transfeció la línea celular Raw 264.7 con los constructos indicados en la figura y a las 12 horas post-transfección se activó con TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) durante 24 horas. Posteriormente se analizó la actividad luciferasa y la determinación de proteína. Cada punto se ha realizado por triplicado representándose la media y la desviación estándar. Este ensayo es representativo de tres experimentos independientes.

#### 4. OTROS ESTÍMULOS Y FACTORES QUE REGULAN LA EXPRESIÓN DE TAP1 Y LMP2

Además de las señales de activación, que se representan en nuestro trabajo por el IFN- $\gamma$ , el LPS y el TNF- $\alpha$ , existen otros estímulos que pueden inducir distintos efectos en la expresión de los genes *tap1* y *Imp2*. En este apartado se describen diferentes mecanismos de activación y de inhibición de la expresión de estos genes. En este estudio determinamos los mecanismos activadores de ambos genes en las células sometidas a situaciones de estrés y también pudimos observar los mecanismos de inhibición de la transcripción de ambos genes mediada por diferentes factores.

#### 4.1. Efectos del estrés sobre la expresión de tap1 y Imp2

En situaciones de estrés, las células pueden responder de múltiples maneras. Un modo fácil y común de inducir estrés en un cultivo celular se consigue eliminando el aporte de suero. En el modelo utilizado en el presente estudio, se cultivaron macrófagos de médula ósea con todos los nutrientes necesarios y, en el momento en que el cultivo había alcanzado una confluencia próxima del 70 %, se cambió el medio eliminando exclusivamente el suero fetal bovino. Posteriormente, las células se analizaron a distintos tiempos de incubación y se procesaron para la extracción del ARN y posterior determinación de la expresión de tap1 y Imp2 por Northern Blot. Como se puede observar en la figura 47, la inducción de la expresión de tap1 y Imp2 es detectable a partir de las 12 horas de cultivo sin suero, obteniéndose un aumento a las 24 horas (Figura 47).

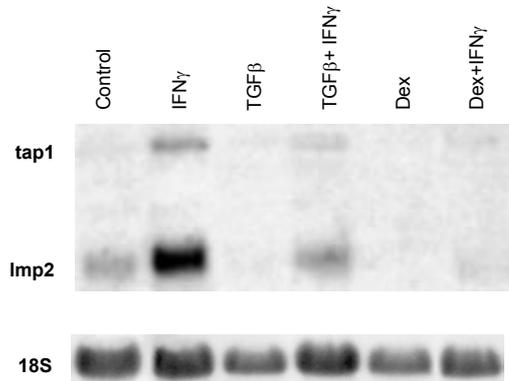


**Figura 47. Inducción de la expresión de tap1 y Imp2 en situaciones de estrés.** Se cultivaron macrófagos de médula ósea con medio sin suero fetal bovino, recuperándose las células a las horas indicadas. Se analizó la expresión de tap1 y Imp2 por Northern Blot utilizando 20 µg de ARN total por carril. La expresión del gen ribosomal 18S fue analizada como control de carga y de transferencia. Estos resultados son representativos de dos experimentos independientes.

#### 4.2. Efectos del TGF-β y la dexametasona sobre la expresión de tap1 y Imp2 inducida por IFN-γ

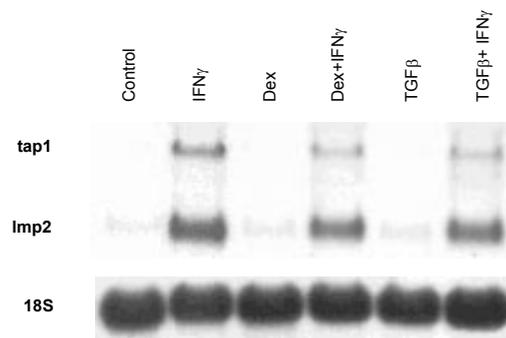
El TGF-β es una citocina que regula el crecimiento y diferenciación de varios tipos celulares y tiene actividades inmunosupresoras y proinflamatorias. En la regulación de la respuesta inmunitaria, una de las funciones mejor conocidas del TGF-β es la de inhibir la expresión de genes del MHC de clase II en una gran variedad de tipos celulares. Estos genes son inducidos por el IFN-γ igual que tap1 y Imp2. Nuestros estudios se centraron en la

implicación de esta citocina en la regulación de estos genes. Para ello, se cultivaron macrófagos incubados en presencia de TGF- $\beta$  y/o IFN- $\gamma$ .



**Figura 48. Inhibición de la expresión inducida por IFN- $\gamma$  de tap1 y Imp2 mediada por TGF- $\beta$  y dexametasona.** Se preincubaron los macrófagos de médula ósea de ratones Balb/c con TGF- $\beta$  10 ng/ml o dexametasona  $10^{-6}$  M durante media hora. Posteriormente se activaron con IFN- $\gamma$  300 U/ml durante 12 horas. Se realizó el análisis de la expresión de tap1 y Imp2 por Northern Blot utilizando 20  $\mu$ g de ARN total por carril. Como control de carga y de transferencia se utilizó el gen ribosomal 18S. Estos resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Como podemos observar en la figura 48, el TGF- $\beta$  no sólo no induce la expresión de tap1 sino que además inhibe completamente la expresión basal de Imp2 que se observa en todos los cultivos de macrófagos a tiempo 0. De forma similar, una incubación con TGF- $\beta$  durante media hora previa a la estimulación con el IFN- $\gamma$  resulta en una inhibición significativa de la expresión de tap1 y de Imp2 en estas células, reduciéndose la expresión de estos genes respecto al control de activación.



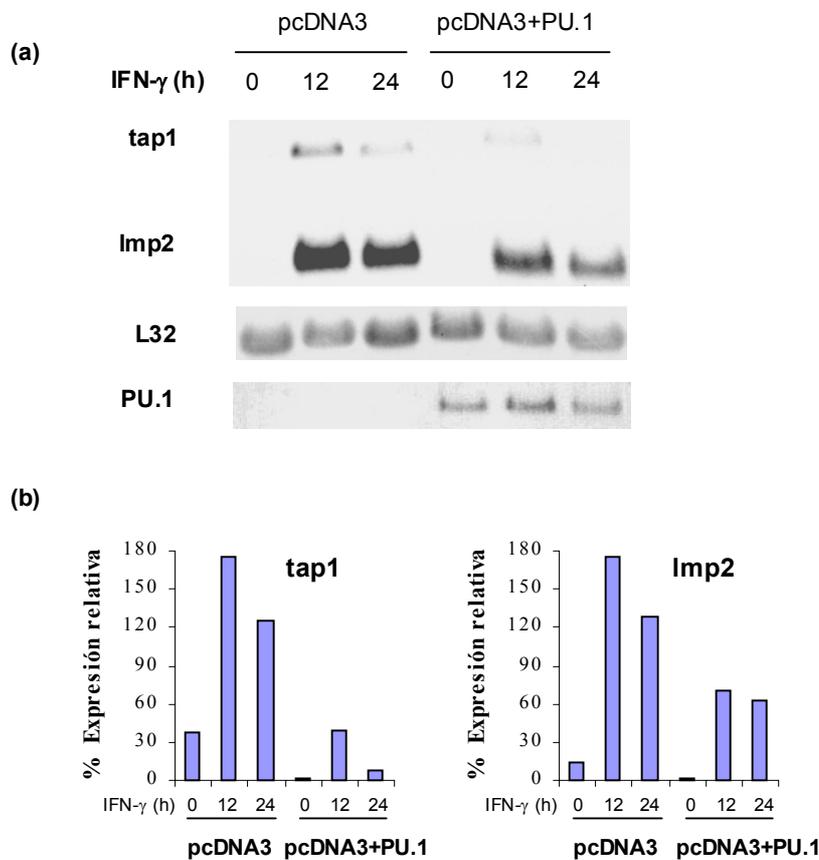
**Figura 49. Inhibición de la expresión inducida por IFN- $\gamma$  de tap1 y Imp2 mediada por TGF- $\beta$  y dexametasona.** Se preincubó la línea celular de macrófagos RAW 264.7 con TGF- $\beta$  10 ng/ml o dexametasona  $10^{-6}$  M durante media hora. Posteriormente se activaron con IFN- $\gamma$  300 U/ml durante 12 horas. Se realizó el análisis de la expresión de tap1 y Imp2 por Northern Blot utilizando 20  $\mu$ g de ARN total por carril. Como control de carga y de transferencia se utilizó el gen ribosomal 18S. Estos resultados son representativos de tres experimentos independientes.

La dexametasona es un glucocorticoide y como tal funciona como supresor del sistema inmunitario (Agarwal y Marshall, 2001). Una de las dianas afectadas por los glucocorticoides es la expresión de los genes del MHC de clase II (Celada y col., 1993). Por ello, valoramos la implicación de la dexametasona en la expresión de *tap1* y *Imp2*. Como podemos observar en la figura 48, la dexametasona inhibe completamente la inducción de *tap1* y *Imp2* por IFN- $\gamma$  en macrófagos de médula ósea. En este experimento se incubó durante media hora el cultivo celular de macrófagos con dexametasona  $10^{-6}$  M y posteriormente se activó con IFN- $\gamma$  durante 12 horas. Los análisis de la expresión de *tap1* y *Imp2* se realizaron por Northern Blot.

Para determinar si seguían el mismo patrón de expresión que los macrófagos de médula ósea realizamos el mismo experimento en macrófagos de línea celular (RAW 264.7, ya que muchas veces el comportamiento de las líneas celulares difiere mucho de las células no transformadas. Como se observa en la figura 49, el TGF- $\beta$  y la dexametasona actúan en la línea celular RAW 264.7 inhibiendo la expresión de *tap1* y *Imp2* inducida por IFN- $\gamma$ . Esta inhibición es menos notable que la observada en los macrófagos de médula ósea (Figura 48).

#### **4.3. Efectos del factor de transcripción PU.1 sobre la expresión de *tap1* y *Imp2* inducida por IFN- $\gamma$**

En la secuencia nucleotídica del promotor *tap1-imp2* observamos la presencia de cajas de unión al factor de transcripción PU.1. El factor de transcripción PU.1 pertenece a la familia *ets* y es un factor de transcripción específico de macrófagos y linfocitos B que en algunos casos actúa como activador mientras que en otros lo hace como represor (Valledor y col., 1998) (Lloberas y col., 2000). Todas las proteínas de la familia *ets* exhiben una secuencia en común a la que se ha dado el nombre de dominio *ets* (Nye y col., 1992; MacLeod y col., 1992). La secuencia fundamental reconocida por los miembros de la familia *ets* la forman los nucleótidos 5' GGAA 3'. Para determinar la implicación del factor PU.1 en la regulación de *tap1* y *Imp2*, se transfectó de forma estable una línea celular murina de fibroblastos (L929) que carecen de la expresión de PU.1. Los fibroblastos transfectados con el vector vacío son capaces de expresar *tap1* y *Imp2* inducidos por el IFN- $\gamma$ . Por el contrario, los fibroblastos con el vector que codifica PU.1 muestran una gran represión de la expresión de *tap1* y *Imp2* inducida por el IFN- $\gamma$ . Como control se observó que los fibroblastos transfectados con PU.1, como cabía de esperar, expresaban el ARNm de PU.1, mientras que los transfectados con el vector vacío no lo hacían. Como podemos observar en la figura 50, PU.1 inhibe la expresión de *tap1* y *Imp2* inducida por IFN- $\gamma$  en la línea celular L929.



**Figura 50. (a) Inhibición de la expresión inducida por IFN- $\gamma$  de tap1 y Imp2 mediada por el factor de transcripción PU.1.** Se transfectó de forma estable la línea celular de fibroblastos L929 con un vector que contiene el gen de PU.1 (véase material y métodos) o con un vector control. Posteriormente se activaron con IFN- $\gamma$  300 U/ml durante 12 y 24 horas. Se realizó el análisis de la expresión de tap1 y Imp2 por Northern Blot utilizando 20  $\mu$ g de ARN total por carril. Como control de transfección se analizó la expresión de PU.1 y como control de carga y de transferencia se utilizó el gen ribosomal 18S. **(b) Cuantificación de la expresión relativa de los mensajeros de tap1 y Imp2 en la línea celular de fibroblastos L929.** Los valores de densidad óptica de los ARNm obtenidos en cada tiempo en los ensayos de Northern Blot, se relativizaron según el valor del control de referencia (L32). Los resultados se expresan como porcentaje de este valor relativo.

***Conclusiones***

---

Las conclusiones que se derivan de los resultados obtenidos en el presente trabajo son las siguientes:

1. Existen mecanismos diferentes para la inducción de tap1 y Imp2 según el tipo de factor inductor y el tipo celular. El IFN- $\gamma$  induce una activación rápida y mantenida, e independiente de la síntesis proteica. El LPS, por su parte, induce una activación más tardía y muy breve en comparación al anterior. Finalmente, el TNF- $\alpha$  induce una activación muy tardía de los genes tap1 y Imp2, similar a la que encontramos en condiciones de estrés inducidas en cultivo. El LPS induce la expresión de tap1 y Imp2 en macrófagos pero no en fibroblastos. Así, la expresión inducida de tap1 y Imp2 depende no sólo del estímulo sino también del tipo celular que recibe la estimulación.
2. El factor STAT1 desempeña un papel fundamental en las señales de activación de la expresión de tap1 y Imp2 inducida por el IFN- $\gamma$ , el LPS y el TNF- $\alpha$ . Sin embargo, la expresión de tap1 y Imp2 inducida por el IFN- $\alpha/\beta$  es independiente de STAT1 en macrófagos de ratón.
3. Las cajas reguladoras GAS e IRF-1 son esenciales en la inducción de la expresión de tap1 y Imp2 mediada por el IFN $\gamma$ . En cambio, solo la caja GAS está implicada en la inducción de ambos genes por el LPS. Finalmente, las cajas IRF-1 y NF $\kappa$ B son esenciales en el caso de la activación mediada por el TNF- $\alpha$ .
4. Los estímulos inhibidores TGF- $\beta$  y los glucocorticoides, inhiben la expresión de los genes tap1 y Imp2 inducida por el IFN- $\gamma$ .

# ***Bibliografía***

---

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 1994. Cells and tissues of the immune system. *Cellular and Molecular Immunology*. W.B. Saunders CO., Philadelphia.
- Agarwal SK, Marshall GD Jr. 2001. Dexamethasone promotes type 2 cytokine production primarily through inhibition of type 1 cytokines. *J. Interferon Cytokine Res.*, 21: 147-155.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 1994. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc. New York.
- Aliprantis AO, Diez-Roux G, Mulder LCF, Zylchinsky A, Lang RA. 1996. Do macrophages kill through apoptosis? *Immunol. Today*, 17: 573-576.
- Amé J-C, Schreiber V, Fraulob V, Dollé P, de Murcia G, Niedergang CP. 2001. A bidirectional promoter connects the Poly (ADN-ribose) polymerase 2 (PARP-2) gene to the gene for RNase P RNA. *J. Biol. Chem.*, 276: 11092-11099.
- Androlewicz MJ, Cresswell P. 1994. Human transporters associated with antigen processing possess a promiscuous peptide-binding site. *Immunity*, 1: 7-14.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. 1997. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons Inc. New York.
- Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. 1997. The IFN $\gamma$  receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.*, 15: 563-591.
- Baeuerle PA, Baltimore D. 1996. NF- $\kappa$ B: ten years after. *Cell*, 87: 13-20.
- Bairoch A. 1993. The prosite dictionary of sites and patterns in proteins, its current status. *Nucleic Acid Res.*, 21: 3097-3103.
- Baker SJ, Reddy EP. 1996. Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene*, 12: 1-9.
- Baldwin AS Jr. 1996. The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.*, 14: 649-683.
- Baumeister W, Walz J, Zuhl F, Seemuller E. 1998. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*, 92: 367-380.
- Belich MP, Glynn RJ, Senger G, Sheer D, Trowsdale J. 1994. Proteasome components with reciprocal expression to that of the MHC-encoded LMP proteins. *Curr. Biol.*, 4: 769-76.
- Benacerraf B, McDevitt HO. 1972. Histocompatibility-linked immune response genes. *Science*, 175: 273-279.
- Bhattacharya S, Eckner R, Grossman S, Oldread E, Arany Z, D'Andrea A, Livingston DM. 1996. Cooperation of Stat2 and p300/CBP in signalling induced by interferon-alpha. *Nature*, 383: 344-347.

- Bitzer M, von Gersdorff G, Liang D, Dominguez-Rosales A, Beg AA, Rojkind M, Boottinger EP. 2000. A mechanism of suppression of TGF- $\beta$ /SMAD signaling by NF- $\kappa$ B/RelA. *Genes & Dev.*, 14: 187-197.
- Bluyssen HAR, Muzaffar R, Vlietstra RJ, Van der Made ACJ, Leung S, Stark GR, Kerr IM, Trapman J, Levy DE. 1995. Combinatorial association and abundance of components of interferon-stimulated gene factor 3 dictate the selectivity of interferon responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 5645-5649.
- Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. 1997. Cellular responses to interferon- $\gamma$ . *Annu. Rev. Immunol.*, 15: 749-795.
- Borràs FE, Lloberas J, Maki RA, Celada A. 1995. Repression of I-A $\beta$  gene expression by the transcription factor PU.1. *J. Biol. Chem.*, 270: 24385-24391.
- Bovolenta C, Driggers PH, Marks MS, Medin JA, Politis AD, Vogel SN, Levy DE, Sakaguchi K, Appella E, Coligan JE, Ozato K. 1994. Molecular interactions between interferon consensus sequence binding protein and members of the interferon regulatory factor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 5046-5050.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Brown MG, Driscoll J, Monaco JJ. 1993. MHC-linked low-molecular mass polypeptide subunits define distinct subsets of proteasomes. Implications for divergent function among distinct proteasome subsets. *J. Immunol.*, 151: 1193-1204.
- Browning JL, Ngam-ek A, Lawton P, DeMarinis J, Tizard R, Chow EP, Hession C, O'Brine-Greco B, Foley SF, Ware CF. 1993. Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell*; 72: 847-856.
- Brutkiewicz RR, Bennink JR, Yewdell JW, Bendelac A. 1995. TAP-independent, beta 2-microglobulin dependent surface expression of functional mouse CD1.1. *J. Exp. Med.*, 182: 1913-1919.
- Campbell RD, Trowsdale J. 1993. The map of the human MHC. *Immunol. Today*, 14: 349-352.
- Carey M, Smale ST. 2000. Transcriptional regulation in eukaryotes. Concepts, strategies and techniques. Cold Spring Harbor Laboratory press. New York.
- Celada A, Gray PW, Rinderknecht E, Schreiber RD. 1984. Evidence for a gamma-interferon receptor that regulates macrophage tumoricidal activity. *J. Exp. Med.*, 160: 55-74.

- Celada A, Allen R, Esparza I, Gray PW, Schreiber RD. 1985. Demonstration and partial characterization of the interferon-gamma receptor on human mononuclear phagocytes. *J. Clin. Invest.*, 76: 2196-2205.
- Celada A, Schreiber SR. 1987. Internalization and degradation of receptor-bound interferon gamma by murine macrophages. Demonstration of receptor recycling. *J. Immunol.*, 139: 147-153.
- Celada A, Klemsz MJ, Maki RA. 1989. Interferon- $\gamma$  activates multiple pathways to regulate the expression of the genes for major histocompatibility class II I-A $\beta$ , tumor necrosis factor and complement component C3 in mouse macrophages. *Eur. J. Immunol.*, 19: 1103-1109.
- Celada A, Maki RA. 1992. Transforming growth factor- $\beta$  enhances the M-CSF and GM-CSF-stimulated proliferation of macrophages. *J. Immunol.*, 148: 1102-1105.
- Celada A, McKercher S, Maki RA. 1993. Repression of Major Histocompatibility Complex IA expression by glucocorticoids: the glucocorticoid receptor inhibits the DNA binding of the X box DNA binding protein. *J. Exp. Med.*, 177: 691-698.
- Celada A. 1994. Estructuras del Sistema Inmunitario. *Inmunología básica*. Ed. Labor S.A. Barcelona.
- Chan SH, Kobayashi M, Santoli D, Perussia B, Trinchieri G. 1992. Mechanisms of IFN-gamma induction by natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12): Role of transcription and mRNA stability in synergistic interaction between NKSF and IL-2. *J. Immunol.*, 148: 92-98.
- Chatterjee-Kishore M, Wright K, Ting JP-Y, Stark GR. 2000. How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *Embo J.*, 19; 15: 4111-4122.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162: 156-159.
- Counce S, Smith P, Barth R, Snell GD. 1956. Strong and weak histocompatibility gene differences in mice and their role in the rejection of homografts of tumor and skin. *Ann. Surg.*, 144: 198-204.
- Cramer LA, Klemsz MJ. 1997. Altered kinetics of Tap-1 gene expression in macrophages following stimulation with both IFN- $\gamma$  and LPS. *Cell. Immunol.*, 178: 53-61.
- Cramer LA, Nelson SL, Klemsz MJ. 2000. Synergistic induction of the Tap-1 gene by IFN- $\gamma$  and lipopolysaccharide in macrophages is regulated by stat1. *J. Immunol.* 165: 3190-3197.
- Cresswell P, Bangia N, Dick T, Diedrich G. 1999. The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol. Rev.*, 172: 21-28.

- Cullell-Young M, Barrachina M, López-López C, Goñalons E, Lloberas J, Soler C, Celada A. 2001. From transcription to cell surface expression, the induction of MHC class II I-A $\alpha$  by interferon- $\gamma$  in macrophages is regulated at different levels. *Immunogenetics* 53: 136-144.
- Darnay BG, Aggarwal BB. 1997. Early events in TNF signaling: a story of associations and dissociations. *J. Leukoc. Biol.*, 61: 559–566.
- Decker T, Kovarik P, Meinke A. 1997. GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *J. Interferon Cytokine Res.*, 17: 121-134.
- Decker T, Lew DJ, Darnell JE Jr. 1991. Two distinct alpha-interferon-dependent signal transduction pathways may contribute to activation of transcription of the guanylate-binding protein gene. *Mol Cell. Biol.*, 10: 5147-5153.
- Dennis PA, Rifkin DB. 1991. Cellular activation of latent transforming growth factor- $\beta$  requires binding to the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor type II receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 580–584.
- Derynck R, Zhang Y, Feng XH. 1998. Smads: Transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell*, 95: 737-740.
- Dick TP, Ruppert T, Groettrup M, Kloetzel PM, Kuehn L, Koszinowski UH, Stevanovic S, Schild H, Ramensee H-G. 1996. Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell*, 86: 253-62.
- DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. 1997. A cytokine-responsive I $\kappa$ B kinase that activates the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Nature*, 388: 548–554.
- Dong Y, Tang L, Letterio JJ, Benveniste EN. 2001. The smad3 protein is involved in TGF-beta inhibition of class II transactivator and class II MHC expression. *J. Immunol.*, 167 (1): 311-319.
- Dudov KP, Perry RP. 1984. The gene family encoding the mouse ribosomal protein L32 contains a uniquely expressed intron-containing gene and an unmutated processed gene. *Cell*, 37: 457-468.
- Durbin JE, Hackenmiller R, Simon MC, Levy DE. 1996. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell*, 85: 443-450.
- Dynlacht BD, Hoey T, Tjian R. 1991. Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell*, 66: 563-576.
- Elliot T, Willis A, Cerundolo V, Townsend A. 1995. Processing of major histocompatibility class-I restricted antigens in the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Med.*, 181: 1481-91.

- Farrar MA, Schreiber RD. 1993. The molecular cell biology of interferon- $\gamma$  and its receptor. *Ann. Rev. Immunol.*, 11: 571-611
- Feinberg AP, Vogelstein B. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, 132: 6-13.
- Fortunel NO, Hatzfeld A, Hatzfeld. 2000. Transforming growth factor- $\beta$ : pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood*, 96; 6: 2022-2036.
- Fujita T, Reis LF, Watanabe N, Kimura Y, Taniguchi T, Vilcek J. 1989. Induction of the transcription factor IRF-1 and interferon- $\beta$  mRNAs by cytokines and activators of second-messenger pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 9936-9940.
- Gao PQ, Sims SH, Chang DC, Deisseroth AB. 1993. Interferon- $\gamma$  priming effects in the activation and deactivation of ISGF3 in K562 cells. *J. Biol. Chem.*, 268: 12380-12387.
- Gao JJ, Filla MB, Fultz MJ, Vogel SN, Russell SW, Murphy WJ. 1998. Autocrine/paracrine IFN $\alpha\beta$  mediates the lipopolysaccharide-induced activation of transcription factor stat1 $\alpha$  in mouse macrophages: pivotal role of stat1 $\alpha$  in the induction of the inducible nitric oxide synthase gene. *J. Immunol.*, 161: 4803-4810.
- Gil MP, Bohn E, O'Guin AK, Ramana CV, Levine B, Stark GR, Virgin HW, Schreiber RD. 2001. Biologic consequences of stat1-independent IFN signaling. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 98: 6680-6685.
- Gleizes PE, Munger JS, Nunes I, Harpel JG, Mazziari R, Noguera I, Rifkin DB. 1997. El TGF- $\beta$  latency: biological significance and mechanisms of activation. *Stem Cells*, 15: 190-197.
- Glickman MH. 2000. Getting in and out of the proteasome. *Sem. Cell & Dev. Biol.*, 11: 149-158.
- Goes N, Sims T, Urmson J, Vincent D, Ramassar V, Halloran PF. 1995. Disturbed MHC regulation in the IFN $\gamma$  knockout mice. *J. Immunol.*, 155: 4559-4566
- Gray CW, Slaughter CA, DeMartino GN. 1994. PA28 activator protein forms regulatory caps on proteasome stacked rings. *J. Mol. Biol.*, 236:7-15.
- Hahn S, Buratowski S, Sharp PA, Guarente L. 1989. Isolation of the gene encoding the yeast TATA binding protein TFIID: A gene identical to the SPT15 suppressor of Ty element insertions. *Cell*, 58: 1173-1181.
- Hamilton TA, Adams DO. 1987. Molecular mechanisms of signal transduction in macrophages. *Immunol Today*, 8: 151-158.
- Hammond C, Helenius A. 1995. Quality control in the secretory pathway. *Curr. Biol.*, 7: 523-29.

- Hampsey M. 1998. Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 465-503.
- Harada H, Fujita T, Miyamoto M, Kimura Y, Maruyama M, Furia A, Miyata T, Taniguchi T. 1989. Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. *Cell*, 58: 729-739.
- Heim MH, Kerr IM, Stark GR, Darnell JE Jr. 1995. Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway. *Science*, 267: 1347-1349.
- Hershko A, Ciechanover A. 1998. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, 67: 425-479.
- Hill A, Ploegh H. 1995. Getting the inside out: the transporter associated with antigen processing (TAP) and the presentation of viral antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 341-343.
- Hirsch C, Ploegh HL. 2000. Intracellular targeting of the proteasome. *Trends Cell Biol.*, 10(7): 268-272.
- Hochstrasser M. 1997. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.*, 30: 405-39.
- Hoey T, Schindler U. 1998. STAT structure and function in signaling. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 8: 582-587.
- Horikoshi M, Wang CK, Fujii H, Cromlish JA, Weil PA, Roeder RG. 1989. Cloning and structure of the yeast gene encoding a general transcription initiation factor TFIID that binds to the TATA box. *Nature*, 341: 299-303.
- Ihle JN, Kerr IM. 1995. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet.*, 11: 69-74.
- International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409 (6822): 860-921.
- Jayawardena-Wolf J, Bendelac A. 2001. CD1 and lipid antigens: intracellular pathways for antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.*, 13 (1): 109-13.
- Karlsson L, Surh CD, Sprent J, Peterson PA. 1991. A novel class II MHC molecule with unusual tissue distribution. *Nature*, 351: 485-488.
- Kaufman JF, Auffray C, Korman AJ, Shackelford DA, Strominger J. 1984. The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex. *Cell*, 36: 1-13.
- Kerr LD, Miller DB, Matrisian. 1990. TGF- $\beta$ 1 inhibition of transin/stromelysin gene expression is mediated through a fos binding sequence. *Cell*, 61: 267.
- Kishi F, Suminami Y, Monaco J.J. 1993. Genomic organization of the mouse Imp-2 gene and characteristic structure of its promoter. *Gene*, 133: 243-248.

- Klemsz MJ, McKercher SR, Celada A, Van Beveren C, Maki RA. 1990. The macrophage and B cell transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. *Cell*, 61: 113-124.
- Koopmann J-O, Hämmerling GJ, Momburg F. 1997. Generation, intracellular transport and loading of peptides associated with MHC class I molecules. *Curr. Opin Immunol.*, 9: 80-88.
- Kovarik P, Soiber D, Novy M, Decker T. 1998. Stat1 combines signals derived from IFN- $\gamma$  and LPS receptors during macrophage activation. *Embo Journal*, 17, 13: 3660-3668.
- Kovarik P, Soiber D, Eyers PA, Menghini R, Neininger A, Gaestel M, Cohen P, Decker T. 1999. Stress-induced phosphorylation of STAT1 at Ser727 requires p38 mitogen-activated protein kinase whereas IFN- $\gamma$  uses a different signaling pathway. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 96: 13956-13961.
- Lankat-Buttgereit B, Tampé R. 1999. The transporter associated with antigen processing TAP: structure and function. *FEBS Letters*, 464: 108-112.
- Lemon B, Tjian R. 2000. Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes & Dev.*, 14: 2551-2569.
- Lloberas J, Soler C, Celada A. 1999. The key role of PU.1/Spi-1 in B cells, myeloid cells and macrophages. *Immunol Today*, 20: 184-189.
- Lokeshwar BL y Lin HS. 1988. Development and characterization of monoclonal antibodies to murine macrophage-colony stimulating factor. *J. Immunol.*, 141:483-488.
- Liu ZG, Han J. 2001. Cellular responses to tumor necrosis factor. *Curr. Issues Mol. Biol.* 3: 79-90.
- Mackman N. 2000. Lipopolysaccharide induction of gene expression in human monocytic cells. *Immunol. Res.*, 21: 247-251
- MacLeod K, Leprince D, Stehelin D. 1992. The ets gene family. *TIBS* 17: 251-256.
- Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV, Wallach D. 1997. MAP3K-related kinase involved in NF- $\kappa$ B induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature*, 385: 540-544.
- Martinez CK, Monaco JJ. 1991. Homology of proteasome subunits to a major histocompatibility complex-linked LMP gene. *Nature*, 353: 664-67.
- Marusina K, Iyer M, Monaco JJ. 1997. Allelic variation in the mouse Tap-1 and Tap-2 transporter. *J. Immunol.*, 158 (11): 5251-5256.
- Massagué J. 1990. The transforming growth factor- $\beta$  family. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 6: 597-674.
- Massagué J, Chen Y-G. 2000. Controlling TGF- $\beta$  Signaling. *Genes & Dev.*, 14: 627-644.

- McDowell MA, Lucas DM, Nicolet CM, Paulnock DM. 1995. Differential utilization of IFN- $\gamma$ -responsive elements in two maturationally distinct macrophage cell lines. *J. Immunol*, 155: 4933-4938.
- Melian A, Beckman EM, Porcelli SA, Brenner MB. 1996. Antigen presentation by CD1 and MHC-encoded class I-like molecules. *Curr. Opin. Immunol.*, 8: 82-88.
- Meraz MA, White JM, Sheehan KC, Bach EA, Rodig SJ, Dighe AS, Kaplan DH, Riley JK, Greenlund AC, Campbell D, Carver-Moore K, DuBois RN, Clark R, Aguet M, Schreiber RD. 1996. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell*, 84: 431-442.
- Merlin T, Sing A, Nilsen PJ, Galanos C, Freudenberg MA. 2001. Inherited IL-12 unresponsiveness contributes to the high LPS resistance of the LPS(d) C57BL/10Sdr mouse. *J. Immunol.*, 166: 566-573.
- Min W, Pober JS, Johnson DR. 1998. Interferon Induction of TAP1. The phosphatase SHP-1 regulates crossover between the IFN- $\alpha/\beta$  and the IFN- $\gamma$  signal-transduction pathways. *Circ. Res.*, 83: 815-823.
- Mizushima S, Nagata S. 1990. pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res.*, 17: 5322.
- Monaco JJ. 1992a. Genes in the MHC that may affect antigen processing. *Curr. Opin. Immunol.*, 4: 70-73.
- Monaco JJ. 1992b. A molecular model of MHC class I restricted antigen processing. *Immunol. Today*, 13: 173-79.
- Mond JJ, Sarma C, Ohara J, Finkelman FD. 1986. Interferon- $\gamma$  suppresses B cell stimulatory factor (BSF-1) induction of class II determinants on B cells. *J. Immunol.*, 137: 3534-3537.
- Mossman TR, Coffman RL. 1991. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.*, 7: 145-173.
- Myer VE, Young RA. 1998. RNA polymerase II holoenzymes and subcomplexes. *J. Biol. Chem.*, 273: 27757-27760.
- Nandi D, Jiang H, Monaco JJ. 1996. Identification of MECL-1 (LMP10) as the third IFN-gamma-inducible proteasome subunit. *J. Immunol.*, 156: 2361-64.
- Nathan CF. 1987. Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.*, 79: 319-326.
- Neumann H, Schmidt H, Cavalié A, Jenne D, Wekerle H. 1997. Major Histocompatibility Complex (MHC) class I gene expression in single neurons of the central system:

- differential regulation by Interferon (IFN)- $\gamma$  and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ . *J.Exp.Med.*, 185: 305-316.
- Nye JA, Petersen JM, Gunther CV, Jonsen MD, Graves BJ. 1992. Interaction of murine ets-1 with GGA-binding sites establishes the ETS domain as a new DNA-binding motif. *Genes & Dev.* 6: 975-990.
- Ohmori Y, Schreiber RD, Hamilton TA. 1997. Synergy between Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  in transcriptional activation is mediated by cooperation between signal transducer and activator of transcription 1 and nuclear factor  $\kappa$ B. *J.Biol.Chem.*, 272: 14899-14907.
- Ohmori Y, Hamilton TA. 2001. Requirement for stat1 in LPS-induced gene expression in macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, 69: 598-604.
- Orphanides G, Lagrange T, Reinberg D. 1996. The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes & Dev.*, 10: 2657-2683.
- Ortiz-Navarrete V, Seeling A, Gernold M, Frentzel S, Kloetzel PM, Hammerling GJ. 1991. Subunit of the '20S' proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex. *Nature*, 353: 662-64.
- Pamer E and Cresswell P. 1998. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.*, 16: 323-58
- Paul A, Pendreigh RH, Plevin R. 1995. Protein kinase C and tyrosine kinase pathways regulate lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase activity in RAW 264.7 murine macrophages. *Br. J. Pharmacol.*, 114: 482-488.
- Paul, William E. 1998. *Fundamental Immunology*. Fourth Edition. Ed. Lippincott Williams & Wilkins.
- Perera PY, Vogel SN, Detore GR, Alaziot A, Goyert S. 1997. CD14-dependent and CD14-independent signaling pathways in murine macrophages from normal and CD14 knockout mice stimulated with lipopolysaccharide and taxol. *J. Immunol.* 158: 4422-4429.
- Perussia, B. 1991. Lymphokine-activated killer cells, natural killer cells and cytokines. *Curr. Opin. Immunol.*, 3: 49-55.
- Pine R. 1997. Convergence of TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  signalling pathways through synergistic induction of IRF-1/ISGF-2 is mediated by a composite GAS/ $\kappa$ B promoter element. *Nucleic Acid. Res.*, 25: 4346-4354.
- Piskurich JF, Wang Y, Linhoff MW, Leigh CW, Ting JP-Y. 1998. Identification of distinct regions of 5' flanking DNA that mediate constitutive, IFN- $\gamma$ , STAT1, and TGF- $\beta$ -regulated expression of the class II transactivator gene. *J.Immunol.*, 160: 233-240.

- Powis SJ, Townsend AR, Deverson EV, Bastin J, Butcher GW, Howard JC. 1991. Restoration of antigen presentation to the mutant cell line RMA-S by an MHC-linked transporter. *Nature*, 354: 528-531.
- Regnier CH, Song HY, Gao X, Goeddel DV, Cao Z, Rothe M. 1997. Identification and characterization of an I $\kappa$ B kinase. *Cell*, 90: 373–383.
- Reichardt HM, Tuckermann JP, Gottlicher M, Vujic M, Weih F, Angel P, Herrlich P, Schutz G. 2001. Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. *Embo J.*, 20 (24): 7168-7173.
- Rein T, Muller M, Zorbas H. 1994. In vivo footprinting of the IRF-1 promoter: inducible occupation of a GAS element next to a persistent structural alteration of the DNA. *Nucleic Acids Res.*, 22: 3033-3037.
- Robinson, MJ, Cobb MH. 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9: 180-186.
- Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL. 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented by MHC class I molecules. *Cell*, 78: 761-71.
- Rothe J, Lesslauer W, Lotscher H, Lang Y, Koebel P, Kontgen F, Althage A, Zinkernagel R, Steinmetz M, Bluethmann H. 1993. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature*, 364 (6440): 798-802.
- Rothe M, Wong SC, Henzel WJ, Goeddel DV. 1994. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*, 78: 681–692.
- Sadasivan B, Lehner PJ, Ortmann B, Spies T, Cresswell P. 1996. Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity*, 5: 103-14.
- Salazar-Onfray F, Charo J, Petersson M, Frelund S, Noffz G, Qin Z, Blankenstein T, Ljunggren H-G, Kiessling R. 1997. Down-regulation of the expression and function of the transporter associated with antigen processing in murine tumor cell lines expressing IL-10. *J. Immunol.*, 159: 3195-3202.
- De la Salle H, Houssaint E, Peyrat MA, Arnold D, Salamero J, Pinezon D, Stevanovic S, Bausinger H, Fricker D, Gomard E, Biddison W, Lehner P, UytdeHaag F, Sasportes M, Donato L, Rammensee HG, Cazenave JP, Hanau D, Tongio MM, Bonneville M. 1997. Human peptide transporter deficiency: importance of HLA-B in the presentation of TAP-independent EBV antigens. *J. Immunol.*, 158: 4555-4593.

- Schindler C, Fu X-Y, Improta T, Aebersold R, Darnell JE. 1992. Proteins of transcription factor ISGF-3: One gene encodes the 91- and 84-kDa ISGF-3 proteins that are activated by interferon alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 7836-7839.
- Schindler C. 1999. Cytokines and JAK-STAT Signaling. *Exp. Cell Res.*, 253: 7-14.
- Schindler C, Darnell JAJ. 1995. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu. Rev. Biochem.*, 64: 621-651.
- Schaefer TS, Sanders LK, Nathans D. 1995. Cooperative activity of Jun and Stat3 beta, a short form of Stat3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 9097-9101.
- Schletter J, Heine H, Ulmer AJ, Rietschel ET, 1995. Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch. Microbiol.*, 164: 383-389.
- Schreiber RD, Hicks LJ, Celada A, Buchmeier NA, Gray PW. 1985. Monoclonal antibodies to murine gamma-interferon which differentially modulate macrophage activation and antiviral activity. *J. Immunol.*, 134: 1609-1618.
- Schwartz RH. 1985. T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. *Annu. Rev. Immunol.*, 3: 237-261.
- Segal Y, Zhuang L, Rondeau E, Sraer JD, Zhou J. 2001. Regulation of the paired type IV collagen genes COL4A5 and COL4A6. Role of the proximal promoter region. *J. Biol. Chem.*, 276: 11791-11797.
- Seliger B, Hohne A, Jung D, Kallfelz M, Knuth A, Jaeger E, Bernhard H, Momburg F, Tampé R, Huber C. 1997. Expression and function of the peptide transporters in escape variants of human renal cell carcinomas. *Exp. Hematol.*, 25: 608-614.
- Shapira L, Takashiba S, Champagne C, Amar S, Van Dyke TE. 1994. Involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinase in lipopolysaccharide-induced TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production by human monocytes. *J. Immunol.*, 153: 1818-1824.
- Sheaff RJ, Singer JD, Swanger J, Smitherman M, Roberts JM, Clurman BE. 2000. Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination. *Mol Cell*, 5(2): 403-410.
- Shuai K, Schindler C, Prezioso V, Darnell J Jr. 1992. Activation by IFN- $\gamma$ : tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA. *Science*, 258: 1808-1812.
- Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D. 1992. Targeted disruption of mouse TGF- $\beta$ 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*, 359: 693-699.
- Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. 1994. Structure, regulation and function of NF $\kappa$ B. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, 10: 405-455.

- Sims SH, Cha Y, Romine MF, Gao PQ, Gottlieb K, Deisseroth AB. 1993. A novel interferon-inducible domain: structural and functional analysis of the human interferon regulatory factor 1 gene promoter. *Mol. Cell. Biol.*, 13: 690-702.
- Snapper CM, Paul WE. 1987. Interferon-gamma and B cells stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science*, 236: 944-947.
- Spies T, DeMars R. 1991. Restored expression of major histocompatibility class I molecules by gene transfer of a putative peptide transporter. *Nature*, 351: 323-324.
- Sweet M, Hume DA. 1996. Endotoxin signal transduction in macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, 60: 8-26.
- Takacs M, Salamon D, Myohanen S, Li H, Segesdi J, Ujvari D, Uhli J, Niller HH, Wolf H, Berencsi G, Minarovits J. 2001. Epigenetics of latent Epstein-Barr virus genomes: high resolution methylation of the bidirectional promoter region of latent membrane protein 1 and 2B genes. *Biol Chem.*, 382: 699-705.
- Tanese N, Pugh BF, Tjian R. 1991. Coactivators for a proline-rich activator purified from the multisubunit human TFIID complex. *Genes & Dev.*, 5: 2212-2224.
- Torczyński RM, Bollon AP, Fuke M. 1983. The complete nucleotide sequence of the rat 18S ribosomal RNA gene and comparison with the respective yeast and frog genes. *Nucleic Acids Res.*, 11: 1879-4890.
- Tsujimoto M, Yip YK, Vilcek J. 1986. Interferon- $\gamma$  enhances expression of cellular receptors for tumor necrosis factor. *J. Immunol.*, 136: 2441-2444.
- Tsukada J, Waterman WR, Koyama Y, Webb AC, Auron PE. 1996. A novel Stat-like factor mediates lipopolysaccharide, Interleukin 1 (IL-1), and IL-6 signaling and recognizes a gamma interferon activation site-like element in the IL1b gene. *Mol. Cell. Biol.*, 16: 2183-2194.
- Turner M, Chantry D, Buchan G, Barrett K, Feldmann M. 1989. Regulation of expression of human IL-1 alpha and IL-1 beta genes. *J. Immunol.* 143: 3556-3561.
- Ulevitch RJ, Tobias PS. 1995. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol.*, 13: 437-457.
- Ulloa L, Doody J, Massagué J. 1999. Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature*, 397: 710-713.
- Vallador AF, Borràs FE, Cullell-Young M, Celada A. 1998. Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. *J. Leukoc. Biol.*, 63: 405-417.
- Van Kaer L, Ashton-Rickardt PG, Ploegh HL, Tonegawa S. 1992. Tap1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> T cells. *Cell*, 71(7): 1205-1214.

- Van Kaer L, Ashton-Rickardt PG, Eichelberger M, Gaczynska M, Nagashima M, Rock KL, Goldberg AL, Doherty PC, Tonegawa S. 1994. Altered peptidase and viral-specific T cell response in LMP2 mutant mice. *Immunity*, 1: 533-541.
- Verma R, Deshaies RJ. 2000. A proteasome howdunit: the case of the missing signal. *Cell*, 101: 341-344.
- Vilcek J, Lee TH. 1991. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J. Biol. Chem.*, 266: 7313-7316.
- Wajant H, Scheurich P. 2001. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling. *IJBCB*, 33: 19-32.
- Walker JE, Saraste M, Gay NJ. 1982. E. coli F1-ATPase interacts with a membrane protein component of a proton channel. *Nature*, 298: 867-869.
- Wallach D. 1997. Cell death induction by TNF: a matter of self control. *TIBS*, 22: 107-109.
- Wang Y, Wu TR, Cai S, Welte T, Chin YE. 2000. Stat1 as a component of tumor necrosis factor alpha receptor1-TRADD signaling complex to inhibit NF- $\kappa$ B activation. *Mol. Cell. Biol.*, 20 (13): 4504-4512.
- Ward AC, Touw I, Yoshimura. 2000. The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood*, 95: 19-29.
- Weber-Nordt RM, Meraz MA, Schreiber RD. 1994. Lipopolysaccharide-dependent induction of IL-10 receptor expression on murine fibroblasts. *J. Immunol.* 153: 3734-3744.
- Weinstein SL, Gold MR, DeFranco AL. 1991. Bacterial lipopolysaccharide stimulates protein tyrosine phosphorylation in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 4148-4152.
- White PC, New MI, Dupont B. 1984. HLA-linked congenital adrenal hyperplasia results from a defective gene encoding a cytochrome P-450 specific for steroid 21-hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81: 7505-7509.
- Wong GHW, Clark-Lewis I, McKimm-Breschkin JL, Harris AW, Schrader JW. 1983. Interferon-gamma induces enhanced expression of Ia and H-2 antigens on B lymphoid, macrophage and myeloid cell lines. *J. Immunol.*, 131: 788-795.
- Wright KL, White LC, Kelly A, Beck S, Trowsdale J, Ting JP-Y. 1995. Coordinate regulation of the human TAP1 and LMP2 genes from a shared bidirectional promoter. *J. Exp. Med.*, 181: 1459-1471.
- Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Lloberas J, Lopez-Soriano F, Argiles JM, Bogdan C, Celada A. 2000. LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF-alpha. *Blood*, 95: 823-831.

- Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A. 2000. Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annu. Rev. Immunol.*, 18: 143-164.
- York IA, Goldberg AL, Mo XY, Rock KL. 1999. Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation. *Immunol. Rev.*, 172: 49-66.
- Zhang Z, Jones S, Hagood JS, Fuentes NL, Fuller GM. 1997. STAT3 acts as a coactivator of glucocorticoid receptor signaling. *J. Biol. Chem.*, 272: 30607-30610.
- Zhang JJ, Zhao Y, Chait BT, Lathem WW, Ritzi M, Knippers R and Darnell JE Jr. 1998. Ser-727-dependent recruitment of MCM5 by Stat1a in IFN- $\gamma$ -induced transcriptional activation. *Embo J.*, 17: 6963-6971.
- Zhu K, Wang J, Zhu J, Jiang J, Shou J, Chen X. 1999. p53 induces TAP1 and enhances the transport of MHC class I peptides. *Oncogene*, 18: 7740-7747.