

# ***Resultados***

---

## 1. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TAP1 Y LMP2 POR EL IFN- $\gamma$

### 1.1. Inducción de la expresión de tap1 y Imp2 por el IFN- $\gamma$ en distintos tipos celulares

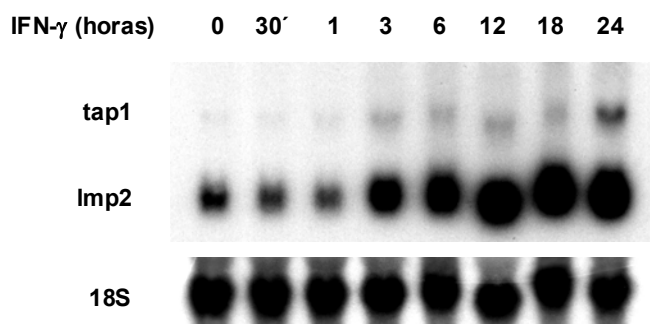
La mayoría de células del organismo expresan moléculas del MHC de clase I y receptores para la citocina IFN- $\gamma$ . Esta citocina induce la expresión de múltiples genes implicados en la activación y la regulación de la respuesta inmunitaria. Por ello, se planteó el estudio de la regulación de los genes tap1 y Imp2 por esta citocina.

Con el fin de confirmar la expresión de tap1 y Imp2 en distintas líneas celulares y estudiar su regulación por el IFN- $\gamma$ , se llevaron a cabo análisis de Northern Blot. Las células se incubaron con cantidades saturantes de IFN- $\gamma$  y se procedió a la determinación del ARNm de tap1 y Imp2 mediante el uso de sondas específicas que se prepararon según se describe en los apartados 1.10.1 y 1.10.2 de material y métodos. Como control de carga y transferencia utilizamos el gen ribosomal L32 cuya expresión no varía con el tratamiento de IFN- $\gamma$ . Los resultados demostraron que el IFN- $\gamma$  induce la expresión de tap1 y Imp2 en distintos tipos celulares murinos: fibroblastos (L929), macrófagos (WR19), linfocitos T (EL4) y linfocitos B (A20) (Figura 21). En el caso concreto de los fibroblastos L929, observamos que la inducción de tap1 y Imp2 puede detectarse a partir de 1 hora tras la estimulación con el IFN- $\gamma$ , e incrementa respecto al tiempo.



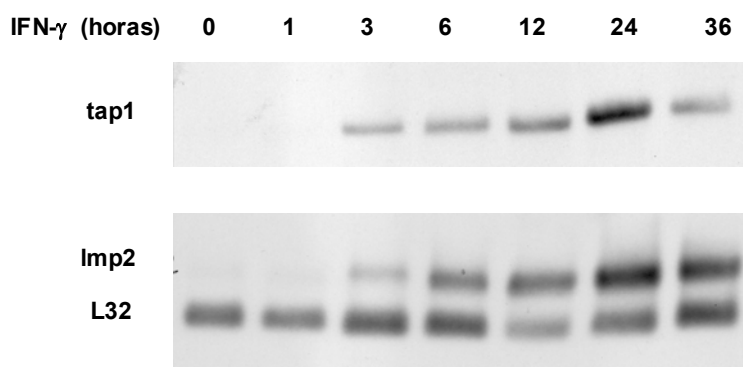
**Figura 21. Inducción de la expresión de tap1 y Imp2 por el IFN- $\gamma$  en distintas líneas celulares.** Se incubaron las células L929 (fibroblastos), EL4 (linfocitos T), WR19 (macrófagos) y A20 (linfocitos B) con IFN- $\gamma$  (300 U/ml) durante los tiempos indicados y se analizó la expresión de tap1 y Imp2 por Northern Blot utilizando 20  $\mu$ g de ARN total por carril. La expresión del gen ribosomal L32 fue analizada como control de carga y transferencia. Estos resultados son representativos de dos experimentos independientes.

De forma similar, la inducción de la expresión de *tap1* y *Imp2* por el IFN- $\gamma$  puede detectarse en macrófagos obtenidos a partir de cultivos primarios de la médula ósea de ratón de la cepa Balb/c, y diferenciados en presencia de M-CSF (Figura 22). A diferencia de los resultados obtenidos con los fibroblastos de la línea L929, en los macrófagos murinos se observa una expresión basal del gen de *Imp2*, y también una síntesis de ARN mensajero para este gen más elevada.

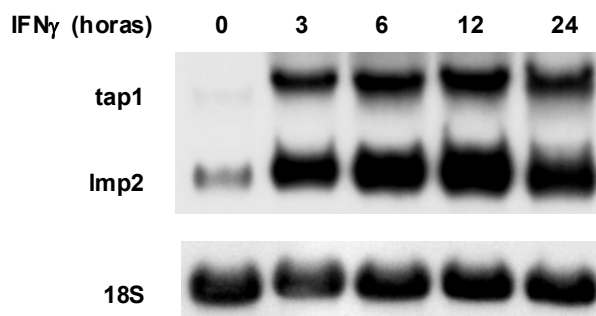


**Figura 22. Inducción de la expresión de *tap1* y *Imp2* por el IFN- $\gamma$  en macrófagos de médula ósea.** Se obtuvieron macrófagos a partir de la médula ósea de ratón de la cepa Balb/c y se incubaron con IFN- $\gamma$  (300 U/ml) durante los tiempos indicados. Se analizó la expresión de *tap1* y *Imp2* por Northern Blot utilizando 20  $\mu$ g de ARN total por carril. La expresión del gen ribosomal 18S fue analizada como control de carga y transferencia. Estos resultados son representativos de tres experimentos independientes.

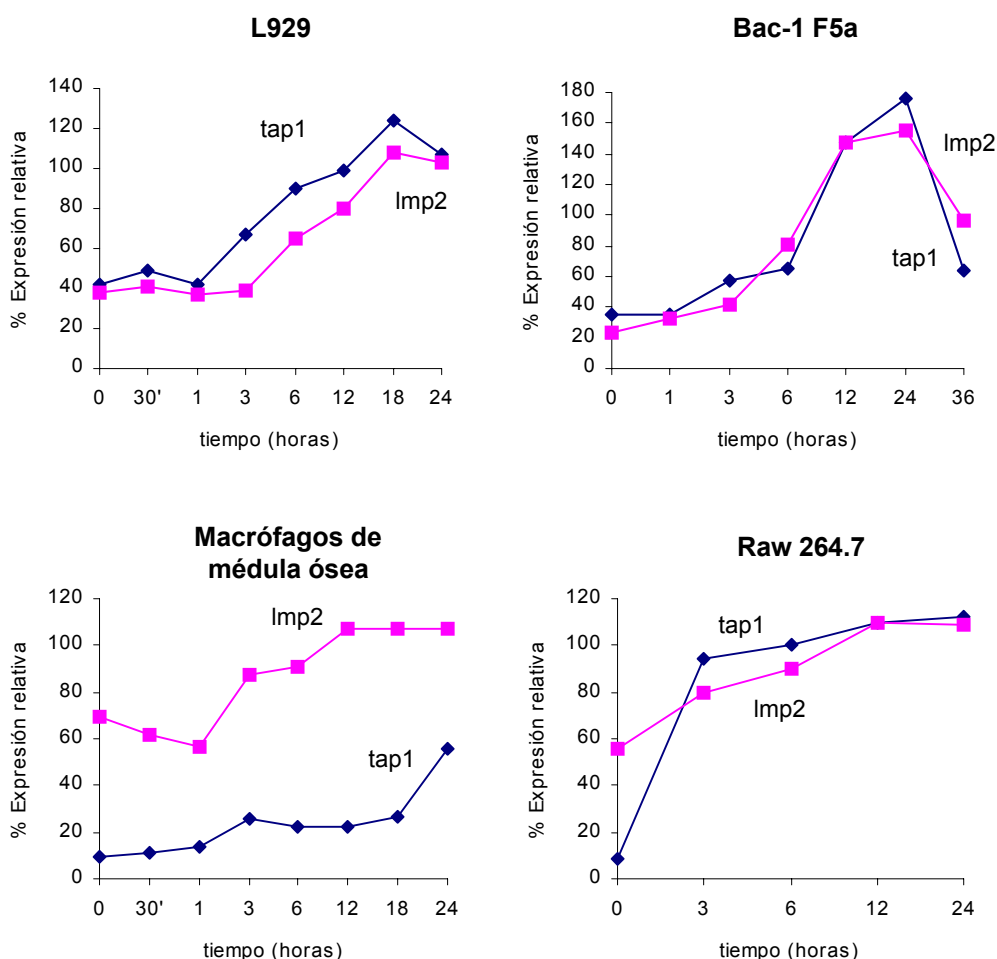
En las líneas celulares de macrófagos, como son la línea Bac-1 F5a, que es dependiente de M-CSF (Figura 23), y la línea celular macrofágica RAW 264.7 (Figura 24), también se observa una inducción en la expresión de los genes *tap1* y *Imp2* dependiente del IFN- $\gamma$ .



**Figura 23. Inducción de la expresión de *tap1* y *Imp2* por el IFN- $\gamma$  en macrófagos de la línea celular Bac-1 F5a.** Las células se incubaron en presencia de IFN- $\gamma$  (300 U/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 L32 fue analizada como control de carga y transferencia. Estos resultados son representativos de dos experimentos independientes.



**Figura 24. Inducción de la expresión de tap1 y Imp2 por el IFN- $\gamma$  en macrófagos de la línea celular Raw 264.7.** Las células se incubaron en presencia de IFN- $\gamma$  (300 U/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.



**Figura 25. Cuantificación de la expresión relativa de los mensajeros de tap1 y Imp2 en las líneas celulares indicadas.** 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 o 18S). Los resultados se expresan como porcentaje de este valor relativo.

Al cuantificar las cantidades relativas de ARNm para tap1 y Imp2 respecto al control de expresión basal (L32 o 18S) obtenidas en presencia de IFN- $\gamma$ , podemos observar como en

todas las líneas celulares estudiadas, el incremento de mensajero se detecta de forma clara aproximadamente a las 3 horas de estimulación, y alcanza un máximo que se sitúa entre las 12 y 24 horas de estimulación (Figura 25). En el caso de los macrófagos derivados de médula ósea y los macrófagos de la línea celular RAW 264.7 es importante señalar la presencia de niveles basales de mensajero para Imp2 en las células a tiempo 0 (Figuras 22 y 24). En cambio, los fibroblastos de la línea L929 y los macrófagos de la línea Bac-1 F5a no presentan niveles detectables de Imp2 previos a la estimulación, como se aprecia claramente en los ensayos de Northern Blot (Figuras 21 y 23). Otro hecho destacable, es que la inducción de tap1 y Imp2 muestra unos perfiles similares de expresión en todas las líneas celulares ensayadas a diferencia de lo observado en macrófagos de médula ósea. En cultivos primarios la inducción de la expresión de Imp2 es notablemente más elevada que la inducción de la expresión de tap1.

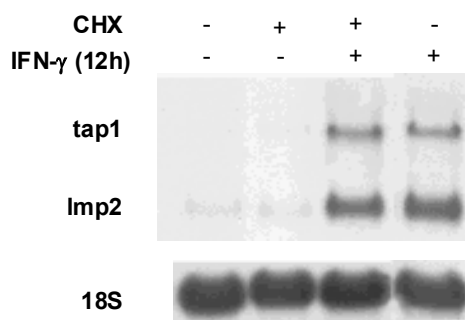
## **1.2. La inducción de tap1 y Imp2 por el IFN- $\gamma$ es independiente de la síntesis *de novo* de proteínas**

En todos los casos expuestos anteriormente, la expresión de ARNm para tap1 y Imp2 es detectable a partir de 1 a 3 horas de incubación con IFN- $\gamma$ . El hecho de tratarse de genes de inducción intermedia sugiere que su expresión requiera la presencia de factores proteicos que deban ser sintetizados *de novo* previamente.

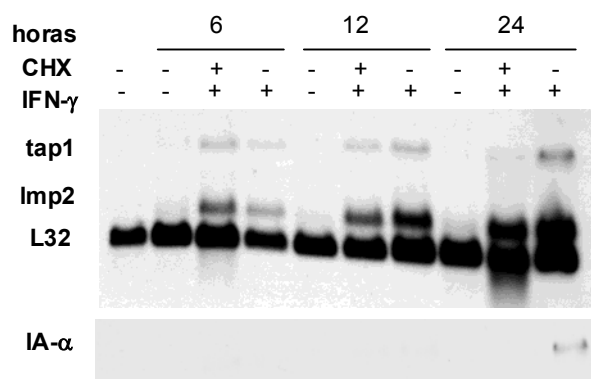
Con el fin de determinar si la inducción de tap1 y Imp2 en respuesta al IFN- $\gamma$  requería síntesis de nuevas proteínas, se llevaron a cabo experimentos en los cuáles las células fueron tratadas con cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica, previamente a la estimulación con IFN- $\gamma$ . La cantidad de cicloheximida utilizada reduce más del 90 % la incorporación de [ $H^3$ ] leucina al material precipitable por ácido tricloroacético (Celada y col., 1989).

Como se muestra en la figura 26, la preincubación de las células con cicloheximida no bloquea la inducción de tap1 y Imp2 en respuesta al IFN- $\gamma$ , tanto en macrófagos Raw 264.7 (carril 3 y 4 de la figura 26a) como en fibroblastos (carriles 6-7 y 9-10 de la figura 26b). Ello indica que la expresión de estos genes no precisa de la síntesis proteica. Dado que la inducción de tap1 y Imp2 no requiere de síntesis *de novo* de proteínas, los elementos que median la inducción de estos genes, en respuesta al IFN- $\gamma$ , deben estar presintetizados en la célula en el momento de recibir este estímulo. Como control del correcto funcionamiento de la cicloheximida se determinó la expresión del gen IA- $\alpha$  del MHC de clase II inducida por IFN- $\gamma$ . La expresión de este gen requiere de la síntesis previa de proteínas (Cullell-Young y col., 2001).

## (a) Macrófagos



## (b) Fibroblastos

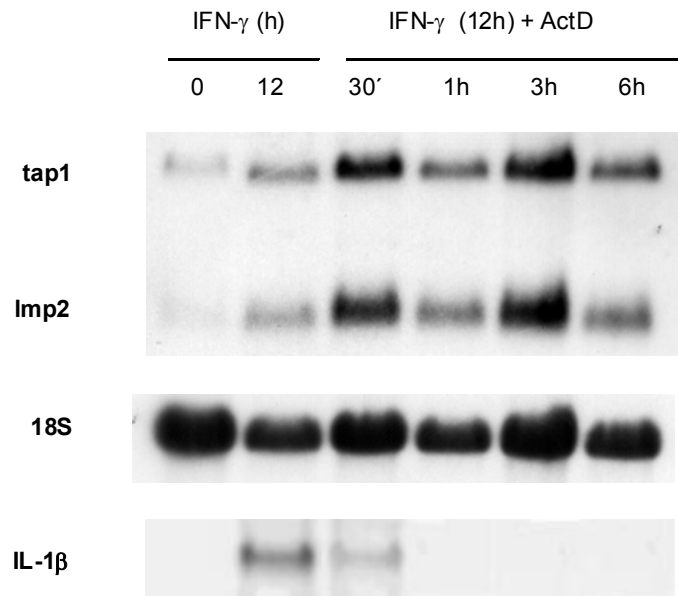


**Figura 26. La inducción de tap1 y Imp2 en respuesta al IFN- $\gamma$  no requiere la síntesis *de novo* de proteínas.** (a) Los macrófagos de la línea celular Raw 264.7 y (a) la línea celular L929 fueron tratados con 10  $\mu$ g/ml de cicloheximida (CHX) durante 30 minutos, y a continuación estimuladas con IFN- $\gamma$  (300 U/ml) durante 1 hora. Posteriormente se cambió el medio y se recuperaron las células a las horas indicadas en la figura. La expresión de tap1 y Imp2 fue analizada por Northern blot. Como control de carga y transferencia, se examinó la expresión del gen ribosomal L32 y 18S, como control del tratamiento con cicloheximida se examinó la expresión del gen IA- $\alpha$  del MHC de clase II. Estos resultados son representativos de dos experimentos independientes.

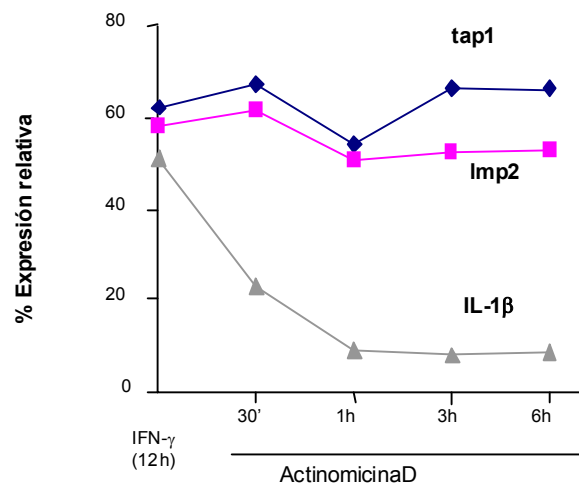
### 1.3. Estabilidad del ARNm de tap1 y Imp2

La estabilidad de los ARNm tiene gran importancia en la regulación de la expresión génica (Cullell-Young y col., 2001). En ocasiones, cambios en la estabilidad del ARNm pueden provocar la rápida desaparición del mensajero, evitándose la síntesis proteica. Por el contrario, los ARNm estables pueden representar un mantenimiento de la síntesis de proteínas aún cuando los mecanismos de transcripción se han inactivado.

(a)



(b)



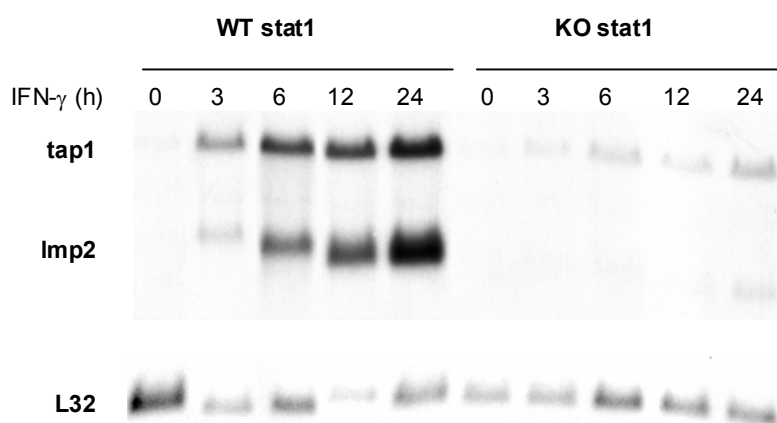
**Figura 27. Vida media del ARNm de tap1 y Imp2.** (a) Expresión de tap1 y Imp2 observada por Northern Blot. A partir de la línea celular L929 tratada con IFN- $\gamma$  durante 12 horas y posteriormente con actinomicina D a diferentes tiempos se extrajo ARN y se estudió los niveles de expresión de tap1 y de Imp2 por Northern Blot. Como control de carga de ARN en cada pocillo se determinó la cantidad del 18S ARN ribosómico y para controlar que la dosis de 5  $\mu$ g/ml de actinomicina D era suficiente para bloquear la transcripción, se determinó la vida media del gen de la citocina IL-1 $\beta$ . (b) Cuantificación de la expresión relativa de los mensajeros de tap1, Imp2 e IL-1 $\beta$ . Estos resultados son representativos de tres experimentos independientes.

En nuestro caso, quisimos determinar la estabilidad de los ARNm para tap1 y Imp2 inducidos por IFN- $\gamma$ . Para ello se utilizó actinomicina D que actúa bloqueando la

transcripción. Una concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$  de actinomicina D es suficiente para bloquear la síntesis de ARNm, según se determinó mediante un estudio de la incorporación de [ $^3\text{H}$ ]UTP (Celada y col., 1989). Tras la estimulación con IFN- $\gamma$  durante 12 horas, se añadió actinomicina D recuperándose las células al cabo de 30 minutos, 1, 3 y 6 horas. Como se observa en la figura 27, la vida media del ARNm tanto de *tap1* como de *Imp2* inducido por IFN- $\gamma$  es muy estable, ya que ni con un tratamiento de 6 horas de actinomicina D varían los niveles de estas moléculas. El control del bloqueo total de la transcripción por parte de la actinomicina D se realizó midiendo la expresión del gen de la citocina IL-1 $\beta$ , cuyo ARNm es muy inestable (Turner y col., 1989).

#### 1.4. La expresión de *tap1* y *Imp2* inducida por IFN- $\gamma$ es dependiente de STAT1 en fibroblastos y macrófagos de médula ósea

El sistema de transducción de señales de IFN- $\gamma$  se mide por la fosforilación de la proteína STAT1 que dimeriza y se transloca al núcleo (Bach y col., 1997). Sin embargo, se ha evidenciado que el IFN- $\gamma$  puede inducir la expresión de algunos genes en ausencia de STAT1 (Gil y col., 2001). Puesto que el IFN- $\gamma$  es capaz de inducir la expresión de los genes *tap1* y *Imp2*, se planteó la posibilidad de comprobar si la proteína STAT1 estaba implicada en la transducción de la señal que permite la inducción de la expresión de los genes *tap1* y *Imp2*. Para ello, se determinó la expresión de los genes *tap1* y *Imp2* mediante la técnica de Northern Blot en fibroblastos procedentes de ratones a los que se había eliminado la expresión del gen *stat1* (ratones *knock out* para *stat1*) (Figura 28).

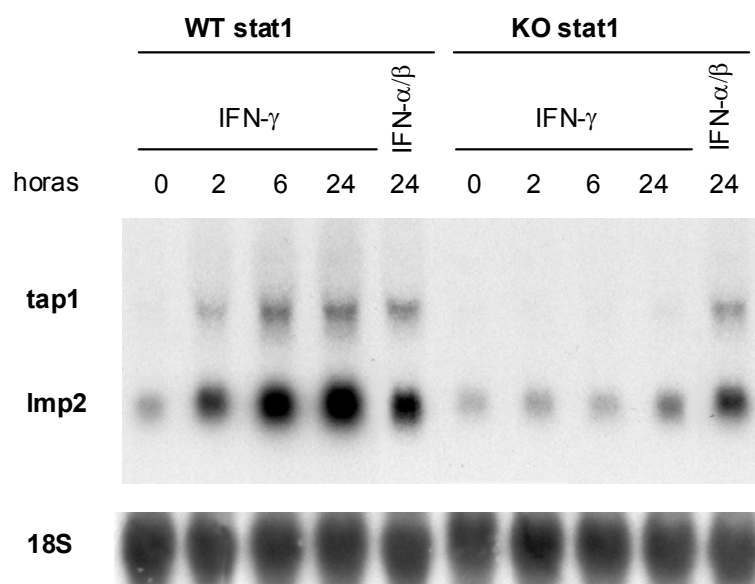


**Figura 28. La expresión de *tap1* y *Imp2* inducidos por el IFN- $\gamma$  está mediada por STAT1.** La determinación de la expresión de *tap1* y *Imp2* inducida por IFN- $\gamma$  a los tiempos indicados se realizó por Northern blot en fibroblastos control (WT) y en fibroblastos procedentes de un ratón al que se había eliminado el gen de *stat1* (KO). Se utilizó como control de la cantidad de ARN en cada pocillo la sonda L32. Estos resultados son representativos de dos experimentos independientes.



Se utilizó una línea de fibroblastos obtenida de ratones de la cepa C57/BL6 (ratones control) y de ratones de esta misma cepa a los que se había eliminado el gen que codifica la proteína STAT1 mediante recombinación homóloga (ratones *knock out stat1*) (Meraz y col, 1996). En ambos casos, se determinó la expresión de *tap1* y *Imp2* inducida por IFN- $\gamma$  a diferentes tiempos. Como hemos visto previamente en los fibroblastos derivados de los ratones control el IFN- $\gamma$  induce la expresión de *tap1* y *Imp2* (Figura 28). Sin embargo, no se detecta la expresión de *tap1* y *Imp2* inducida por IFN- $\gamma$  en fibroblastos *knock out* para el gen de *stat1*. Esto demuestra la necesidad del factor STAT1 en la transducción de la señal del IFN- $\gamma$  para la inducción de la expresión de los genes *tap1* y *Imp2*.

El mismo experimento se llevó a cabo utilizando macrófagos obtenidos de médula ósea de ratones control y ratones *knock out* de *stat1*. En esta ocasión, las células fueron activadas con IFN- $\alpha/\beta$  (interferones de tipo I) o bien con IFN- $\gamma$  (interferón de tipo II). De nuevo, observamos la necesidad de la proteína STAT1 en la inducción de la expresión de *tap1* y *Imp2*, ya que en las células *knock out* esta expresión no es inducible por el IFN- $\gamma$ . Sin embargo, la inducción de *tap1* y *Imp2* no depende de STAT1 cuando las células son estimuladas mediante los interferones de tipo I (Figura 29).



**Figura 29. Expresión de *tap1* y *Imp2* inducidos por IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha/\beta$  en macrófagos de médula ósea de ratones WTstat1 (*wild type stat1*) y de KO stat1 (*knock out stat1*).** La determinación de la expresión de *tap1* y *Imp2* inducida por IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha/\beta$  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.

## 1.5. Análisis de las secuencias nucleotídicas implicadas en la inducción de tap1 y Imp2 por IFN- $\gamma$

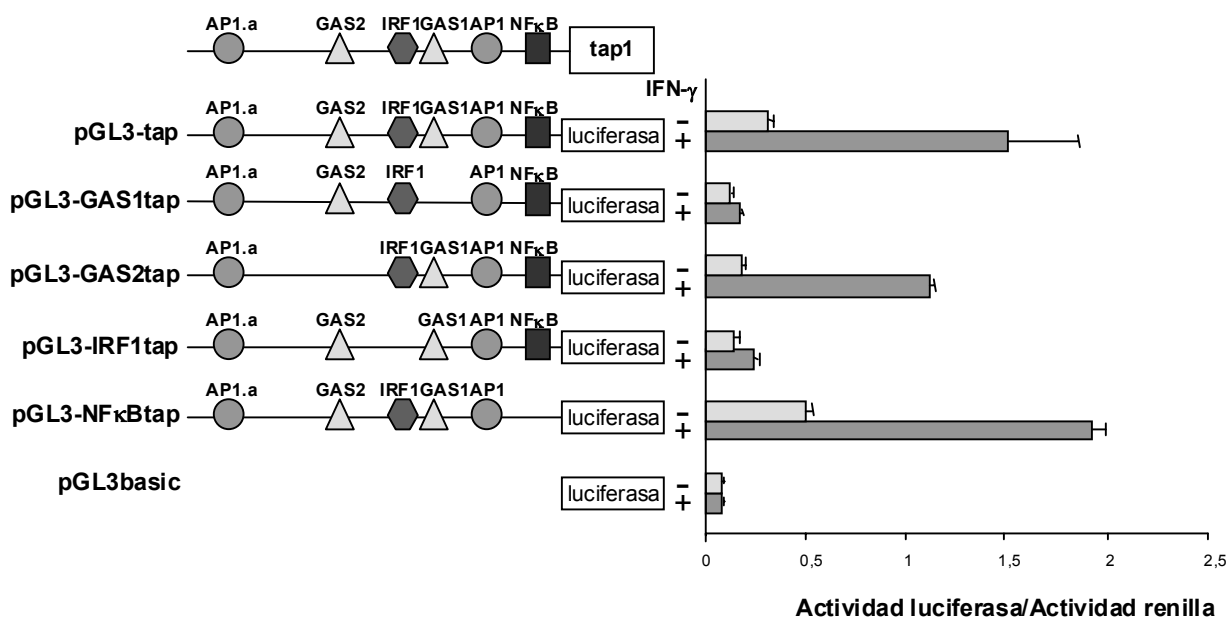
El estudio de la expresión de los genes murinos tap1 y Imp2 se abordó a partir de la secuencia nucleotídica publicada por Kishi y colaboradores en 1993. A partir de ADN genómico se obtuvo un fragmento de 1010 pb que fue clonado en el vector pGL3basic (apartado 1.11.1 de material y métodos). Posteriormente, a partir de este vector y a consecuencia de la publicación de un nuevo inicio de traducción para tap1 ubicado en la región promotora previamente descrita (Marusina y col., 1997), se amplificó el fragmento de 571 pb correspondiente al promotor bidireccional de tap1 y Imp2. A la vez, se realizó una búsqueda de posibles secuencias nucleotídicas implicadas en la regulación de tap1 y Imp2 a través de bases de datos de secuencias de ADN (<http://genomatix.gsf.de/cgi-bin/matinspector/matinspector.pl>) y bases de datos sobre regulación de la transcripción (<http://transfac.gbf.de/TRANSFAC>). Esta búsqueda mostró la existencia de diversas secuencias de ADN susceptibles de unir factores proteicos que podrían regular la expresión de los genes tap1 y Imp2 (véase la figura 19 de material y métodos).

Una vez observada la capacidad del IFN- $\gamma$  para inducir la expresión de los genes tap1 y Imp2, y establecida la necesidad del factor STAT1 en la transducción de esta señal, pasamos a analizar cuales eran las secuencias de ADN, presentes en el promotor de tap1 y Imp2, que pudieran estar implicadas en la regulación de su expresión inducida por el IFN- $\gamma$ . El análisis de la secuencia del promotor mostró una serie de áreas susceptibles de la unión de factores de transcripción relacionados con el IFN- $\gamma$  como son las cajas GAS e IRF-1. A partir del constructo original que contenía el promotor de estos genes, se obtuvieron distintas construcciones con mutaciones en las distintas cajas susceptibles de estar implicadas en la regulación (véase la figura 20 de material y métodos). Estos constructos controlan la expresión de la proteína luciferasa (gen indicador) y se cotransfectaron conjuntamente con un vector que presenta el promotor BOS de expresión constitutiva seguido del gen de la proteína renilla (apartado 1.11.5 de material y métodos), que actúa como control de la transfección.

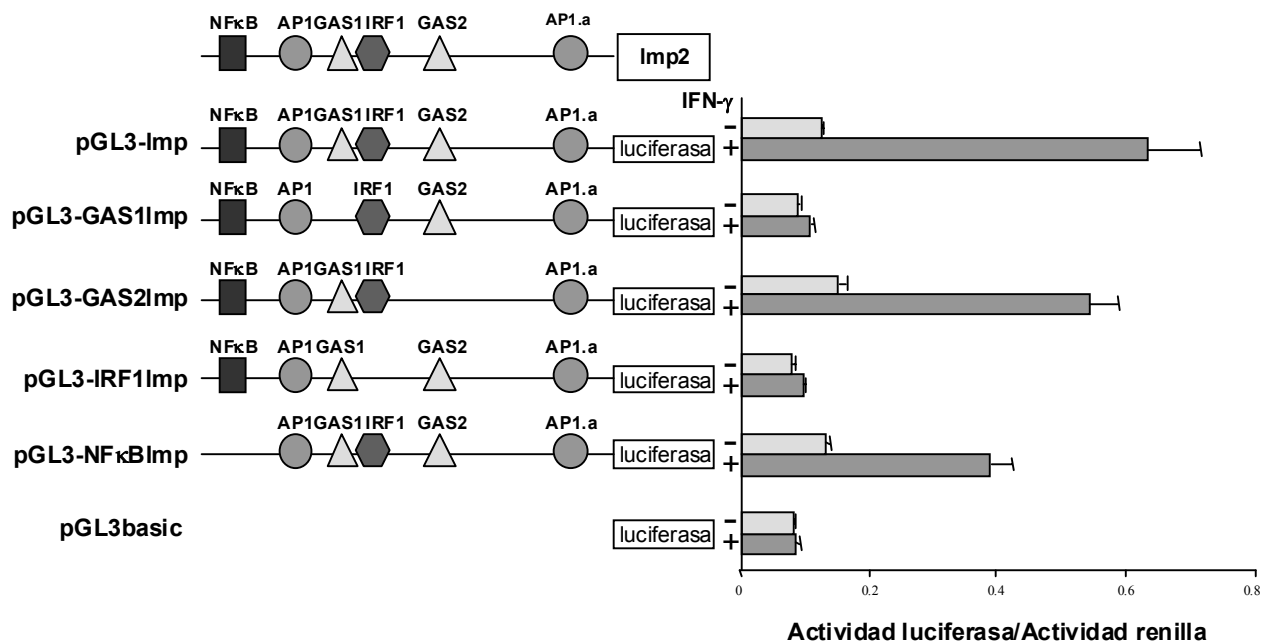
Cada uno de los constructos se transfectó en macrófagos de la línea celular Raw 264.7. En la figura 30, se puede observar que el constructo con la secuencia promotora completa para el gen tap1 (vector pGL3-tap1) induce la expresión de la luciferasa en presencia de IFN- $\gamma$  de 4.7 veces respecto la inducción basal. Sin embargo, cuando se utilizaron los constructos que presentan la caja GAS1 (vector pGL3-GAS1tap) o la caja IRF-1 (vector pGL3-IRF1tap) mutadas, no se observa inducción de la luciferasa en presencia de IFN- $\gamma$ . Por tanto, las cajas GAS1 e IRF-1 son esenciales para la correcta inducción de tap1 tras la estimulación por el IFN- $\gamma$ . Por otra parte, la mutación de las cajas GAS2 (vector pGL3-GAS2tap) y NF $\kappa$ B (vector

pGL3-NF $\kappa$ Btap) no altera el patrón de expresión del gen de la luciferasa en presencia de IFN- $\gamma$  produciéndose un aumento de 5.5 veces con la caja GAS2 mutada y de 4.1 veces con la caja NF $\kappa$ B mutada (Figura 30).

Los resultados obtenidos en el caso de *Imp2* son muy parecidos. Se detectó una inducción de la expresión de la luciferasa en presencia de IFN- $\gamma$  de 4.4 veces respecto la inducción basal. De nuevo, las cajas IRF-1 (vector pGL3-IRF1*Imp*) y GAS1 (vector pGL3-GAS1*Imp*) se muestran como esenciales para la expresión de este gen. Asimismo para el gen *Imp2*, la mutación de las cajas GAS2 (vector pGL3-GAS2*Imp*) y NF $\kappa$ B (vector pGL3-NF $\kappa$ B*Imp*), tampoco modifican el nivel de expresión del gen indicador, produciéndose un aumento de 3.3 veces con la caja GAS2 mutada y de 2.9 veces con la caja NF $\kappa$ B mutada (Figura 31). Estos resultados se correlacionan con la implicación de STAT1 $\alpha$  en la inducción por IFN- $\gamma$  de *tap1* y *Imp2*, ya que se ha observado que el dímero STAT1 $\alpha$ -STAT1 $\alpha$  (GAF) se une a las secuencias nucleotídicas que forman la caja GAS (Decker y col., 1997). A su vez la presencia de la caja GAS en el promotor del gen IRF-1 es necesaria para la inducción por IFN- $\gamma$  de este gen (Rein y col., 1994).

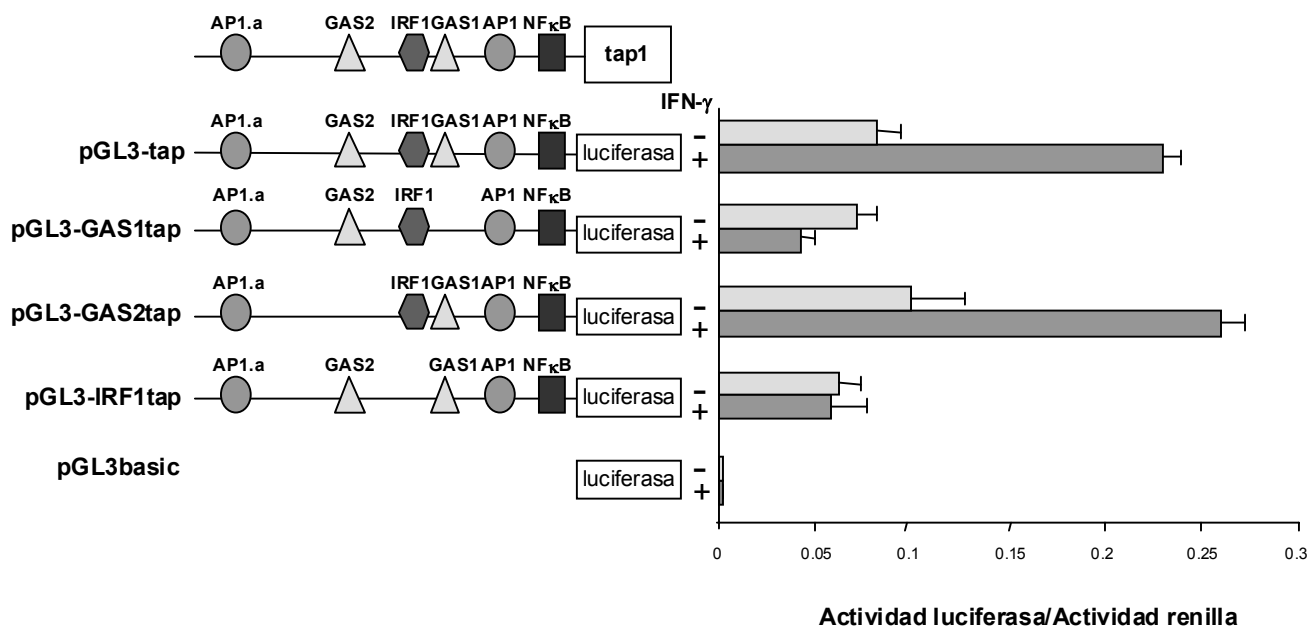


**Figura 30. Determinación funcional de la actividad promotora de *tap1* inducida por el IFN- $\gamma$  en macrófagos.** Se transfectó la línea celular Raw 264.7 con los constructos indicados en la figura y a las 12 horas post-transfección se activó con IFN- $\gamma$  (300 U/ml) durante 24 horas. Posteriormente se analizó la actividad luciferasa. Cada punto se ha realizado por triplicado representándose la media y la desviación estándar. Este ensayo es representativo de tres experimentos independientes.

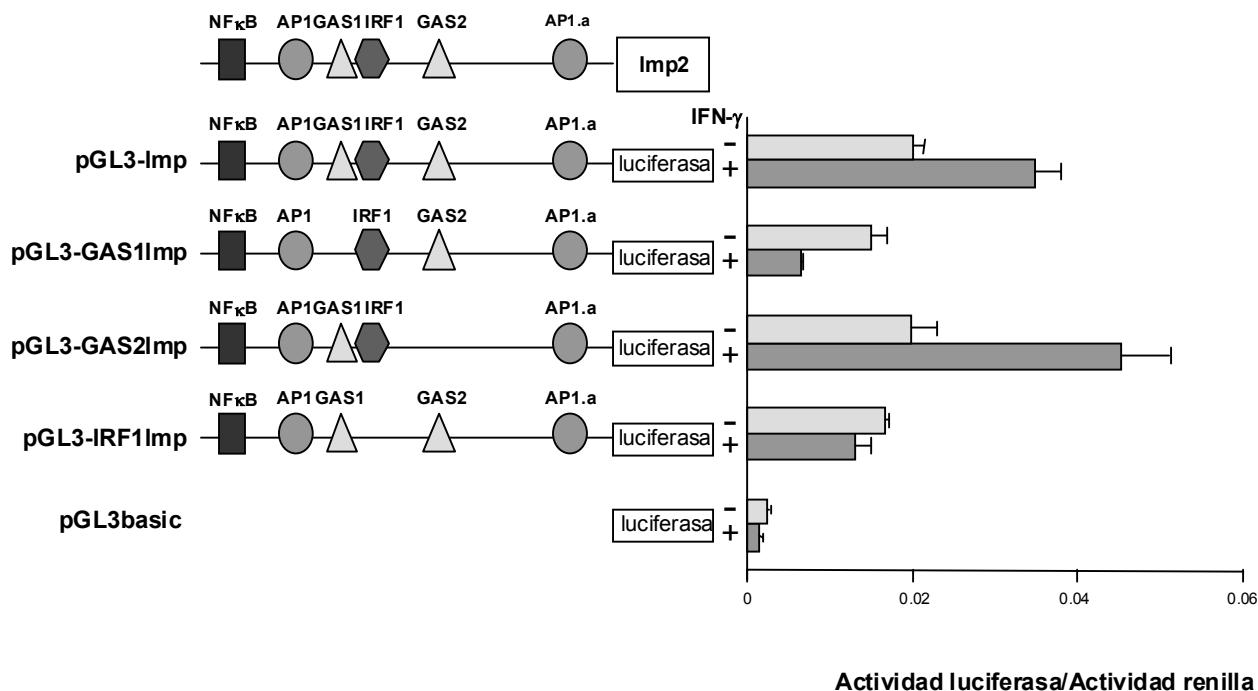


**Figura 31. Determinación funcional de la actividad promotora de Imp2 inducida por el IFN- $\gamma$  en macrófagos.** Se transfectó la línea celular Raw 264.7 con los constructos indicados en la figura y a las 12 horas post-transfección se activó con IFN- $\gamma$  (300 U/ml) durante 24 horas. Posteriormente se analizó la actividad luciferasa. Cada punto se ha realizado por triplicado representándose la media y la desviación estándar. Este ensayo es representativo de tres experimentos independientes.

Experimentos similares se llevaron a cabo utilizando la línea celular de fibroblastos L929. Con ello se pretendía observar si distintos tipos celulares mostraban diferencias a nivel de las secuencias reguladoras implicadas en la regulación de estos genes, o si existían cajas específicas importantes en cada tipo celular. Los resultados obtenidos en los fibroblastos demostraron de nuevo la implicación ya observada de las cajas GAS1 e IRF-1 en la expresión del gen indicador, siendo pues importantes para la correcta expresión de los genes tap1 y Imp2 (Figuras 33 y 34). En presencia de IFN- $\gamma$  se produce un aumento de la expresión de los genes tap1 (vector pGL3tap) y Imp2 (vector pGL3Imp) de 3.5 y 2 veces respectivamente. La mutación de las cajas GAS1 (vectores pGL3GAS1tap y pGL3GAS1Imp) e IRF-1 (vectores pGL3IRF1tap y pGL3IRF1Imp) bloquean la inducción por el IFN- $\gamma$ . La mutación de la caja GAS2 (vectores pGL3GAS2tap y pGL3GAS2Imp) no produce ninguna modificación en la inducción dependiente de IFN- $\gamma$ .



**Figura 32. Determinación funcional de la actividad promotora de tap1 inducida por el IFN- $\gamma$  en fibroblastos.** La línea celular L929 se transfectó con los constructos indicados y a las 12 horas se activó con IFN- $\gamma$  (300 U/ml) durante 24 horas. Posteriormente se analizó la actividad luciferasa. Cada punto se ha realizado por triplicado representándose la media y la desviación estándar. Este ensayo es representativo de tres experimentos independientes.



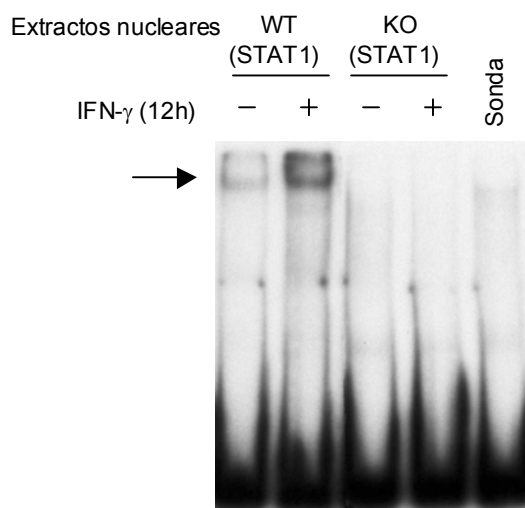
**Figura 33. Determinación funcional de la actividad promotora de Imp2 inducida por el IFN- $\gamma$  en fibroblastos.** La línea celular L929 se transfectó con los constructos indicados y a las 12 horas se activó con IFN- $\gamma$  (300 U/ml) durante 24 horas. Posteriormente se analizó la actividad luciferasa. Cada punto se ha realizado por triplicado representándose la media y la desviación estándar. Este ensayo es representativo de tres experimentos independientes.

## 1.6. El factor STAT1 se une al promotor de *tap1* y *Imp2*.

La transducción de la señal del IFN- $\gamma$  mediante el factor proteico STAT1 requiere la unión de este factor al ADN. En concreto, STAT1 se une al ADN en secuencias nucleotídicas que conforman la caja GAS. La caja GAS típica presenta la secuencia palindrómica TTCN<sub>2-4</sub>GAA. Pero también se ha observado la presencia de secuencias GAS atípicas como la del promotor de GBP-1 (*Guanylate-Binding protein-1*) (TTANNNTAA) y también se han encontrado promotores que contienen varias cajas GAS, cuya función sería la de potenciar la transcripción (Decker y col., 1997).

Para verificar la unión de STAT1 al promotor de los genes *tap1* y *Imp2*, se realizó un experimento de retardo en gel. Se obtuvieron extractos nucleares de fibroblastos de ratón WT y KO para STAT1, y se incubaron en presencia de una sonda de ADN radiomarcada de 470 pb correspondiente al promotor de *tap1-imp2*, que incluye las cajas GAS e IRF-1.

Tras realizarse la electroforesis, observamos una banda de retardo en los geles que contenían extractos nucleares de los ratones WT que aumenta tras el tratamiento con el IFN- $\gamma$ . Sin embargo, en el caso de los ratones KO, no se observa ninguna banda de retardo (Figura 34). Ello indica la unión de la proteína STAT1 al promotor de *tap1-imp2*.



**Figura 34. STAT1 se une al promotor de *tap1-imp2*.** Se obtuvieron extractos nucleares de fibroblastos *wild type* y *knock out* para STAT1 activados o no con IFN- $\gamma$  y se realizó un ensayo de retardo en gel utilizando como sonda marcada el promotor *tap1-imp2*. Este ensayo es representativo de tres experimentos independientes.

## 2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TAP1 Y LMP2 POR EL LPS

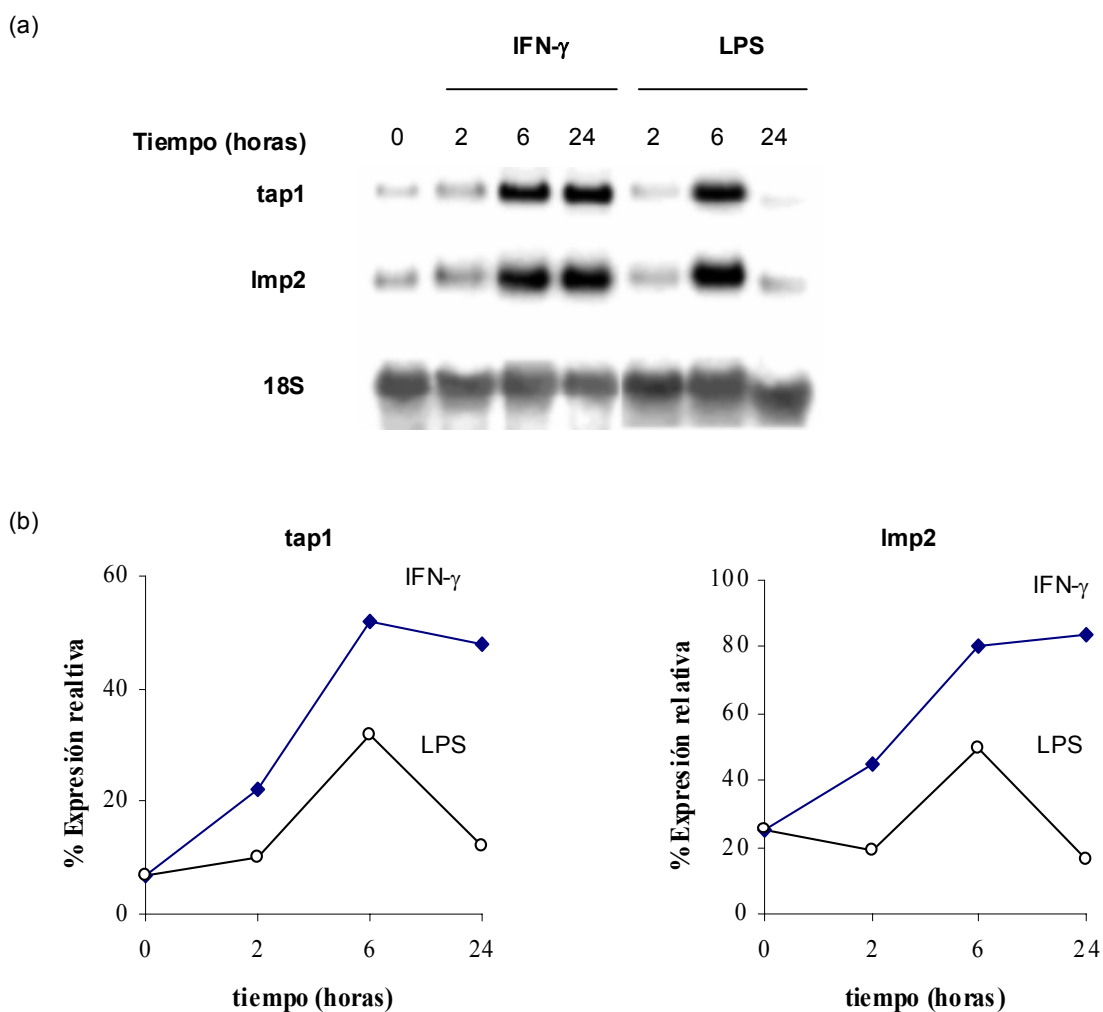
### 2.1. Inducción de la expresión de tap1 y Imp2 por el LPS

El LPS constituye, junto con el IFN- $\gamma$ , uno de los agentes más potentes en la activación de la respuesta inmunitaria. El LPS induce, en los macrófagos, la síntesis de numerosos productos, desde citocinas a especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Aunque los mecanismos de activación y respuesta al LPS no están completamente definidos, sí existen secuencias de ADN que pueden actuar como reguladores de la respuesta al LPS. Entre ellas destacan las cajas AP-1 y NF $\kappa$ B, presentes en el promotor de tap1 y Imp2. Por ello, nos interesó determinar si el LPS actúa también como el IFN- $\gamma$ , como un agente inductor de la expresión de los genes tap1 y Imp2. De forma similar a los experimentos realizados con el IFN- $\gamma$ , se determinó la capacidad del LPS para inducir la expresión de estos genes mediante la técnica de Northern Blot. En los macrófagos de la línea celular RAW 264.7, incubados en presencia de LPS a una concentración suficiente para saturar la unión del LPS a su receptor de alta afinidad CD14 (100 ng/ml) (Perera y col., 1997), se observa una inducción clara de la expresión de tap1 y Imp2 (Figura 35). Esta expresión parece alcanzar un máximo a las 6 horas de incubación en presencia del LPS, que luego decae. Sin embargo, y al contrario de los resultados obtenidos con IFN- $\gamma$ , el LPS no es capaz de inducir la expresión de tap1 y Imp2 en los fibroblastos de la línea celular L929. Incluso en presencia de un rango de concentraciones de LPS mayores que las utilizadas en macrófagos (de 5 a 15  $\mu$ g/ml) no fue posible determinar incremento alguno de la expresión de tap1 y Imp2 en fibroblastos (Figura 35).



**Figura 35. El LPS induce la expresión de tap1 y Imp2 en macrófagos, pero no en fibroblastos.** Se incubaron las distintas líneas celulares en presencia de diferentes concentraciones de LPS durante los tiempos indicados. Posteriormente se analizó la expresión de tap1 y Imp2 por Northern Blot utilizando 20  $\mu$ g de ARN total por carril. La expresión del gen ribosomal 18S fue analizada como control de carga y transferencia. Estos resultados son representativos de tres experimentos independientes.

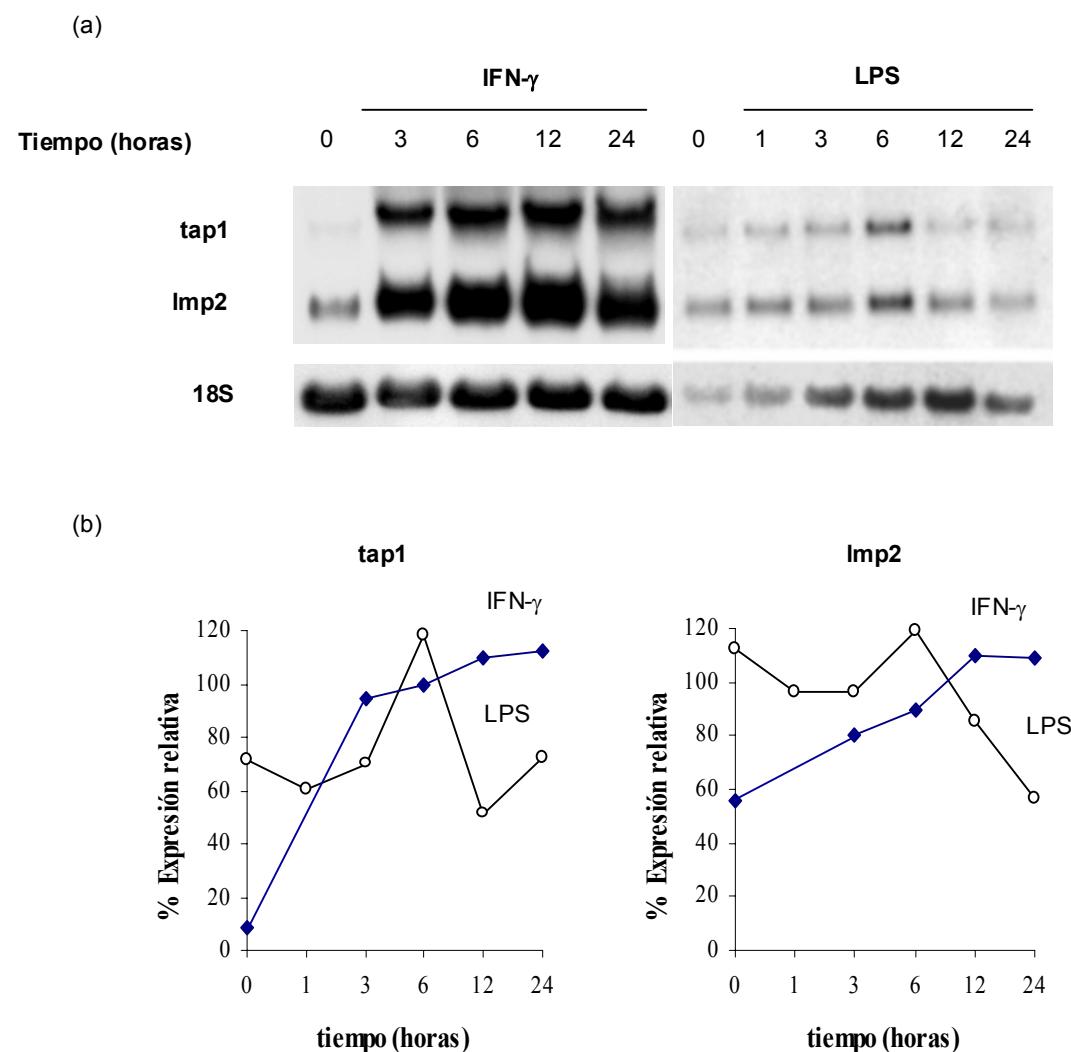
Una vez establecida la capacidad del LPS para inducir los genes *tap1* y *Imp2* en los macrófagos, pensamos en comparar el patrón de inducción obtenido en presencia de LPS con el obtenido utilizando  $\text{IFN-}\gamma$  como agente inductor. Para ello, se llevaron a cabo experimentos de cinética de la expresión. Los resultados obtenidos en macrófagos derivados de médula ósea y en la línea celular RAW 264.7 mostraron que, en presencia de LPS, no se observa inducción de la expresión de *tap1* y *Imp2* hasta las 6 horas (Figuras 35 y 36). Este mismo tiempo marca el máximo de expresión para estos genes, decayendo la señal de ARNm posteriormente a niveles basales dentro de las 12 primeras horas de estimulación.



**Figura 36. (a) La expresión de los genes *tap1* y *Imp2* muestra una cinética distinta para el  $\text{IFN-}\gamma$  y el LPS en macrófagos de médula ósea.** Las células se incubaron en presencia de LPS (100 ng/ml) o  $\text{IFN-}\gamma$  (300 U/ml) durante los tiempos indicados. Se analizó la expresión de *tap1* y *Imp2* mediante Northern Blot utilizando 20  $\mu\text{g}$  de ARN total por carril. La expresión del gen 18S fue analizada como control de carga y transferencia. **(b) Cuantificación de la expresión relativa de los mensajeros de *tap1* y *Imp2* en macrófagos de médula ósea.** 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 (18S). Los resultados se expresan como porcentaje de este valor relativo. Estos resultados son representativos de dos experimentos independientes.



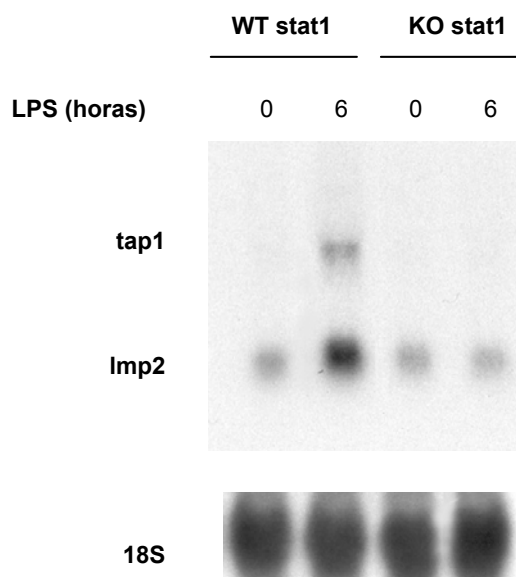
En los macrófagos de médula ósea y en las células RAW 264.7, el IFN- $\gamma$  induce la expresión de tap1 y Imp2 dentro de las tres primeras horas de estimulación, y ésta se mantiene al menos durante 24 horas (Figuras 36 y 37). Así, determinamos que el LPS induce la expresión de tap1 y Imp2 en un espacio de tiempo determinado en los macrófagos, diferente al obtenido con el IFN- $\gamma$  (Figura 37). Además se vió que el LPS es un inductor menos potente que el IFN- $\gamma$  en macrófagos de línea celular. Este resultado permitió además, determinar cual es el tiempo óptimo de expresión para realizar los ensayos de transfección que se describen más adelante.



**Figura 37. (a) La expresión de los genes tap1 y Imp2 muestra una cinética distinta para el IFN- $\gamma$  y el LPS en la línea celular Raw 264.7.** Las células se incubaron en presencia de LPS (100 ng/ml) o IFN- $\gamma$  (300 U/ml) durante los tiempos indicados. Se analizó la expresión de tap1 y Imp2 mediante Northern Blot utilizando 20  $\mu$ g de ARN total por carril. La expresión del gen 18S fue analizada como control de carga y transferencia. **(b) Cuantificación de la expresión relativa de los mensajeros de tap1 y Imp2 en Raw 264.7.** 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 (18S). Los resultados se expresan como porcentaje de este valor relativo. Estos resultados son representativos de dos experimentos independientes.

## 2.2. La expresión de *tap1* y *Imp2* inducida por el LPS es dependiente de STAT1 en macrófagos de médula ósea

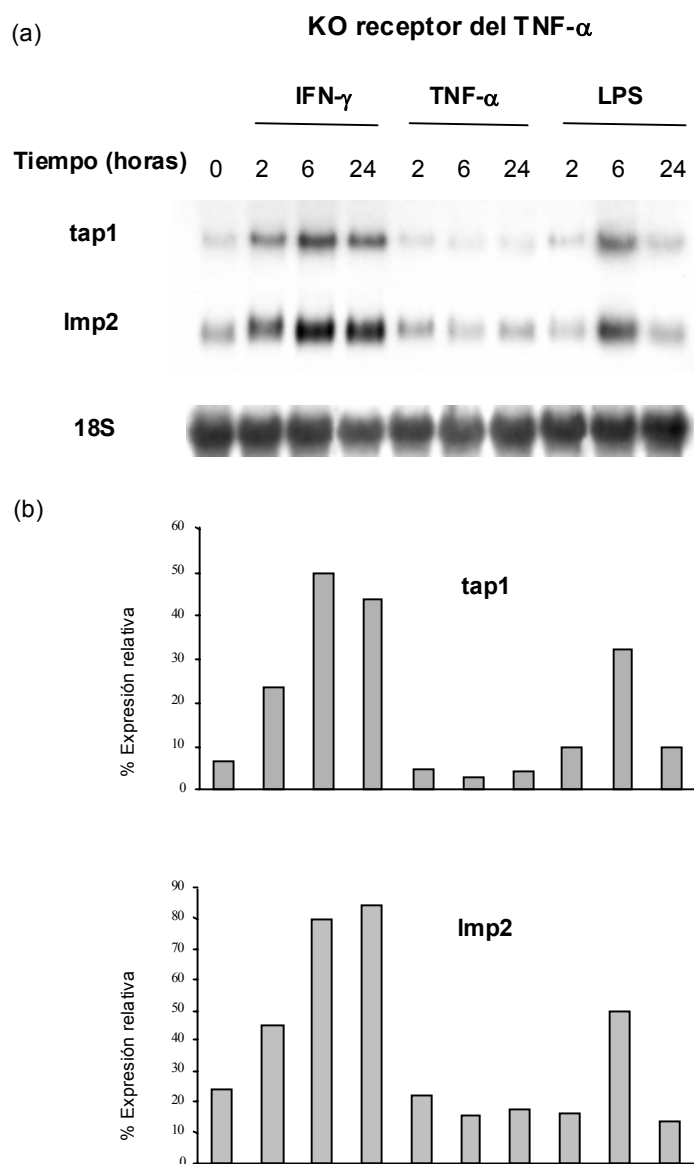
A fin de determinar si, como ocurre con el IFN- $\gamma$ , el factor STAT1 estaba implicado en la transducción de la señal de LPS que induce la expresión de *tap1* y *Imp2*, se valoró la expresión de estos genes mediante la técnica de Northern Blot en macrófagos derivados de médula ósea de ratones KO para *stat1* y de la cepa salvaje. Según puede apreciarse en la figura 38, existe un aumento en la expresión de los genes *tap1* y *Imp2* en los ratones de la cepa salvaje, mientras que en los ratones KO para *stat1* la expresión de estos genes está inhibida. Ello indica que, como ocurre con el IFN- $\gamma$ , la transducción de la señal de LPS por la vía de STAT1 es importante para la inducción de estos genes.



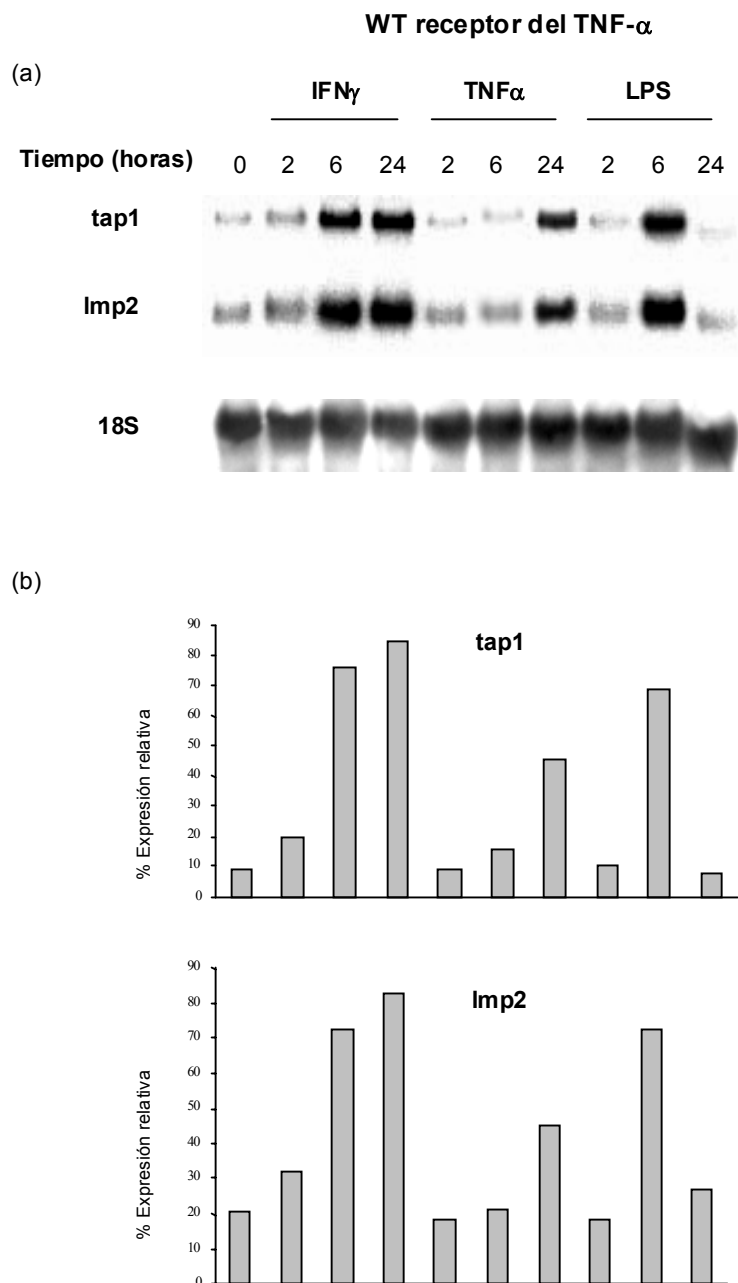
**Figura 38. Expresión de *tap1* y *Imp2* inducidos por LPS en macrófagos de médula ósea de ratones control (*wild type stat1*) y de KO *stat1* (*knock out stat1*).** La determinación de la expresión de *tap1* y *Imp2* inducida por LPS a los tiempos indicados se realizó por Northern blot, utilizando 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.

Ya que el LPS en los macrófagos induce la síntesis de varias citocinas como el TNF- $\alpha$  quisimos demostrar si la implicación de STAT1 en la inducción de la expresión de *tap1* y *Imp2* por LPS era debida a la inducción de la síntesis de TNF- $\alpha$  y si era esta citocina la que estaba implicada de forma autocrina en la inducción de *tap1* y *Imp2*. Para ello utilizamos macrófagos de médula ósea de WT y KO del receptor del TNF- $\alpha$ . Por ensayos de Northern Blot analizamos la expresión de *tap1* y *Imp2* en macrófagos KO para el receptor del TNF- $\alpha$  observando que la inducción de la expresión de *tap1* y *Imp2* por LPS no depende de la

presencia del receptor del TNF- $\alpha$ . Ello indica que la inducción de tap1 y Imp2 por LPS no es debida a la síntesis del TNF- $\alpha$  inducida por LPS (Figura 39). Como control se utilizaron los macrófagos WT para el receptor del TNF- $\alpha$  (Figura 40).



**Figura 39. (a) La inducción de la expresión de tap1 y Imp2 por LPS no es debida a la inducción de la síntesis del TNF- $\alpha$  por el LPS.** Se utilizaron macrófagos de médula ósea de ratones KO para el receptor del TNF- $\alpha$  y se estimularon con IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y LPS durante los tiempos indicados. La determinación de la expresión de tap1 y Imp2 se realizó mediante 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. **(b) Cuantificación de la expresión relativa de los mensajeros de tap1 y Imp2 en macrófagos de médula ósea de ratones KO para el receptor del TNF- $\alpha$ .** 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 (18S). Estos resultados son representativos de dos experimentos independientes.



**Figura 40. (a) La inducción de la expresión de tap1 y Imp2 por LPS no es debida a la inducción de la síntesis del TNF- $\alpha$  por el LPS.** Se utilizaron macrófagos de médula ósea de ratones WT para el receptor del TNF- $\alpha$  y se estimularon con IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y LPS durante los tiempos indicados. La determinación de la expresión de tap1 y Imp2 se realizó mediante 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. **(b) Cuantificación de la expresión relativa de los mensajeros de tap1 y Imp2 en macrófagos de médula ósea de ratones control.** 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 (18S). Estos resultados son representativos de dos experimentos independientes.