

Université de Montréal

**Mécanismes moléculaires et impacts pathophysiologiques de la régulation de
l'expression de la cyclooxygénase-2 par les cytokines proinflammatoires
interleukine-1 β et interleukine-17 dans les synoviocytes et les chondrocytes
humains**

Par

Wissam Faour

**Programme de Biologie Moléculaire
Faculté des Études Supérieures**

**Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade
de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en Biologie Moléculaire**

**© Wissam Faour, Octobre 2003
Université de Montréal**



QH
506
U54
2004
v.003

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.



Faculté des Études Supérieures

Cette thèse intitulée:

Mécanismes moléculaires et impacts pathophysiologiques de la régulation de l'expression de la cyclooxygénase-2 par les cytokines proinflammatoires interleukine-1 β et interleukine-17 dans les synoviocytes et les chondrocytes humains

Présentée par:

Wissam Faour

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

**Dr. David Lohnes
Président-rapporteur**

**Dr. John A. Di Battista
Directeur de recherche**


**Dr. Alain Moreau
Membre du jury**

**Dr. Walid Mourad
Examineur externe**

RÉSUMÉ

Les cytokines pro-inflammatoires interleukine-1 β (IL-1 β) et interleukine-17 (IL-17) occupent une place primordiale dans l'étiologie des maladies d'origine inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde (RA). IL-1 β est secrétée seulement par les macrophages/monocytes et IL-17 dérivent exclusivement des cellules T. Les cellules T activées activent et stimulent les macrophages/monocytes à sécréter de IL-1 β soit par un contact cellulaire direct ou via la production de IL-17. Cette interaction stimule les cellules résidentes du cartilage articulaire (synoviocytes et chondrocytes) à sécréter de grandes quantités des prostaglandines de type E (PGE₂). Ces molécules lipidiques dérivées de l'acide arachidonique, sont synthétisées par la cascade enzymatique de la cyclooxygénase-2 (COX-2). Ce dernier est un enzyme inducible non exprimé à l'état normal non stimulé. Le niveau élevé de l'ARNm de COX-2, de la protéine de COX-2 et de la PGE₂ secrétée, observé chez les membranes synoviales malades a été associé étiologiquement avec le processus de développement des maladies arthritiques. Les mécanismes par lesquels IL-1 β et IL-17 régulent l'expression de COX-2 ne sont pas encore clairs. Les études cinétiques ont montré que l'ARNm de COX-2 est fortement induit par IL-1 β et IL-17 et cette induction est p38 MAPK dépendante. L'inhibition de la p38 avec SB (inhibiteur sélectif de la p38 MAPK) abolit complètement cette induction. L'activation de la p38 par IL-17 était directe mais dans le cas de IL-1 β elle est PGE₂-dépendante et est associée à une accumulation ambiante de la PGE₂. Les études de western blot faites avec différents anticorps anti-phospho MAPKs montrent que IL-1 β et IL-17 phosphorylent et activent les intermédiaires de signalisation et les facteurs de transcription appartenant à la voie p38 selon la cascade MKK3/6/SAPK/p38/ATF-2. Une bifurcation importante, dans le cas de IL-17, aboutit à l'activation de la voie MNK1/eIF4E, clé pour le recrutement du ribosome et l'initiation de la traduction. Il est à noter que les voies SAPK/JNK, Akt et NF- κ B ne sont pas activées par IL-17. La région promotrice de COX-2 contient plusieurs éléments cis qui peuvent être impliqués dans la régulation transcriptionnelle du gène COX-2 comme ATF/CRE, c/EBP et NF- κ B.

Dans notre système cellulaire, les mutations introduites seulement dans le site ATF/CRE sont suffisantes pour abolir l'activité promotrice induite par IL-1 β et IL-17 et réduire même le niveau d'activité basale du promoteur. Cette implication de ATF-2 est démontrée par la surexpression des leurres moléculaires, pour le facteur ATF-2, qui réduisent l'activité basale et induite du promoteur. Les expériences de retardement sur gel montrent une liaison accrue du complexe ATF2/CREB sur le site CRE. Les autres sites, particulièrement NF- κ B, ne jouent aucun rôle. IL-17 n'active pas cette voie de signalisation. Les mutants dominants négatifs de TRAF2/6 n'ont aucun effet inhibiteur sur l'induction de l'ARNm de COX-2 par IL-1 β et IL-17, de même que les inhibiteurs pharmacologiques de IKK. La présence des séquences AU-rich (ARE) dans la partie 3'-UTR de l'ARNm suggère un modèle de régulation majoritairement post-transcriptionnel. Les cytokines pro-inflammatoires par l'intermédiaire de la p38 augmentent la demi-vie de l'ARNm de COX-2 en stimulant la production des protéines liant spécifiquement l'ARN e.g., HuR. Les résultats de Northern blot montrent que IL-1 β et IL-17 stabilisent l'ARNm et la synthèse protéique de COX-2 via des séquences AREs distales. Les cellules transfectées avec des plasmides qui surexpriment différents types de protéines liant l'ARN (AUF1, HuR, et TTP), sauf TTP produisent un effet et déstabilisent les constructions COX-2-3'-UTR via de séquences AREs distales. Il est important à noter que TTP est phosphorylée par la p38, cette phosphorylation peut modifier ses propriétés de liaison à l'ARN et par la suite sa fonction. Dans le cas des cellules stimulées avec IL-1 β , la stabilisation de l'ARNm est exclusivement PGE₂ dépendante, vu que l'activation de la p38 dépend essentiellement de la PGE₂ sécrétée. L'inhibition de la synthèse des prostaglandines par des inhibiteurs sélectifs de COX-2 (NS 398) diminue considérablement le niveau de l'ARNm de COX-2 et provoque une chute de la durée d'activation de la p38. L'addition exogène de la PGE₂ à des concentrations physiologiques renverse complètement l'effet inhibiteur de NS. Les expériences de criblage en utilisant des anticorps et des agonistes pour différents sous-types de récepteurs de la PGE₂ montrent que la transmission du signal par la PGE₂ est médiée par le sous-type récepteur EP₄. Il est évident d'après nos résultats que la COX-2 est



régulée post-transcriptionnellement dont la composante transcriptionnelle est minoritaire et que la COX-2 devient un système modèle pour décrire le mode de régulation des gènes inflammatoires.

SUMMARY

Pro-inflammatory cytokines such as interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-17 (IL-17) occupy a primordial place in the etiology of diseases of inflammatory origin such as rheumatoid arthritis. IL-1 β is secreted by macrophages/monocytes while IL-17 is an exclusive T cell derived cytokine. Despite contact mediated activation of macrophages by stimulated T lymphocytes, which promotes IL-1 β production, activation of macrophages and IL-1 β production occur after T cell secretion of IL-17. This interaction is thought to stimulate resident cells (synoviocytes and chondrocytes) to produce large amount of prostaglandins specifically type E (PGE₂). These lipid metabolites derived from the arachidonic acid are synthesized through the cyclooxygenase-2 (COX-2) enzymatic cascade. COX-2 is an inducible enzyme. Normally not expressed, the elevated levels of COX-2 mRNA, COX-2 protein, and PGE₂ release observed in OA/RA-affected synovial membranes have been associated etiologically with the disease process. Despite its clinical importance, mechanisms by which IL-1 β and IL-17 regulate COX-2 mRNA expression are not fully uncovered. Time course and dose response studies showed that IL-1 β and IL-17 both strongly induce COX-2 mRNA. A phenomenon entirely p38 MAPK-dependent, as inhibition of p38 with SB (selective cell permeable p38 inhibitor) block completely this induction. IL-17 was observed to promote rapid and sustained p38 activation while the p38 activation pattern in case of IL-1 β is attributed to ambient accumulation of PGE₂. Western blot analysis using specific anti-phospho MAPK antibodies showed that IL-1 β and IL-17 only phosphorylate and activate signaling components and transcription factors of the p38 MAPK pathway according to MKK3/6/SAPK/p38/ATF-2 cascade. A bifurcation occurs in IL-17 mediated activation of p38 pathway to MNK1/eIF4E a key component for ribosome recruitment and translation initiation. Interestingly SAPK/JNK, Akt and NF- κ B signaling pathways are not activated by IL-17. The promoter of COX-2 contains multiple cis acting elements that may be involved in COX-2 transcription regulation such as, ATF/CRE, c/EBP and NF- κ B. In our cell culture model, mutations

introduced in ATF/CRE site were sufficient to abrogate IL-1 β and IL-17 induction of COX-2 as well as basal promoter activity. ATF-2 decoy constructs reduce basal and induced COX-2 promoter activity. EMSA studies showed an increase binding of ATF/CRE dimer at the COX-2 ATF-2/CRE site. Although strongly induced by IL-1 β , NF- κ B pathway had no effect on COX-2 induction. IL-17 do not activate this signaling pathway, dominant negative mutants of TRAF2/6 had no effect on IL-1 β and IL-17 COX-2 induction while they completely abrogate NF- κ B driven luciferase mRNA constructs induction. Same results were obtained with IKK pharmacologic inhibitors. The 3'-UTR of COX-2 mRNA contains AU-rich instability sequences (ARE) which suggest a post-transcriptional mechanism of COX-2 mRNA regulation. Pro-inflammatory cytokines through p38 MAPK activation increase steady state levels of COX-2 mRNA by stimulating the production of cognate RNA binding protein such as, HuR. Northern blot analysis showed that IL-1 β and IL-17 promote COX-2 mRNA stabilization and increase COX-2 protein biosynthesis via distal ARE sequences. In cells transfected with plasmids that overexpressed different RNA binding protein (AUF1, HuR and TTP), only TTP destabilize COX-2-3'-UTR construct via distal ARE sequences. TTP is known to be phosphorylated by p38, which may modify its RNA binding properties and hence its activity. In IL-1 β activated cells, mRNA stability is exclusively PGE₂ dependant since p38 activation depends entirely on secreted PGE₂. Inhibition of prostaglandin synthesis with NS 398 (COX-2 selective inhibitors) abolishes COX-2 mRNA levels and markedly decrease time and duration of p38 activation. Incubation of cells with exogenous PGE₂ at physiological level reverses completely NS mediated inhibition of COX-2 message induction. Screening experiments with antibodies and agonists against different PGE₂ receptor subtypes revealed that PGE₂ signal via the EP₄ receptor subtype. Our results strongly support a post-transcriptional model of COX-2 mRNA regulation in which transcriptional component is a minor determinant and that COX-2 represents a system model for studying pro-inflammatory gene regulation.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	III
SUMMARY	VI
LISTE DES TABLEAUX	XI
LISTE DES FIGURES	XII
ABRÉVIATIONS	XVI
INTRODUCTION	20
CHAPITRE I	20
I. 1) OSTÉOARTHRITE :.....	20
I. 1.1) DÉFINITION :.....	21
I. 1. 2) PROGRESSION DE LA MALADIE :.....	22
I. 2) BIOLOGIE DE L'ARTICULATION :.....	25
I. 2. 1) DÉVELOPPEMENT, STRUCTURE ET FONCTION DU CARTILAGE ARTICULAIRE :...	25
I. 2. 2) CLASSIFICATION, MORPHOLOGIE, ET FONCTION DES SYNOVIOCYTES :.....	28
CHAPITRE II	29
II. 1) BIOLOGIE MOLÉCULAIRE DE LA CASCADE DE L'ARACHIDONATE :	29
II. 1. 1) LES PROSTANOÏDES :	30
II. 1. 2) MÉCANISME GÉNÉRALE DE SYNTHÈSE DES PROSTAGLANDINES :	31
II. 1. 3) HYDROLYSE DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE PAR LA PHOSPHOLIPASE-A ₂ :	32
II. 2) STRUCTURE DU GÈNE COX/PGHS :.....	34
II. 2. 1) STRUCTURE DU GÈNE COX-1/PGHS-1 :.....	34
II. 2. 2) STRUCTURE DU GÈNE COX-2/PGHS-2 :	35
II. 3) STRUCTURE DES ENZYMES COX-1 ET -2 (PGHS-1 ET -2) :.....	35
II. 4) ENZYMOLOGIE DES COX, EFFETS DES NSAIDS :.....	37
II. 5) LES RÉCEPTEURS AUX PROSTANOÏDES :	39

II. 6) LA PROSTAGLANDINE E ₂ ET LES RÉCEPTEURS À LA PGE ₂ :	40
II. 7) RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX PROTÉINES G :	41
CHAPITRE III	42
III. 1) EXPRESSION DES GÈNES ET VOIE POST-TRANSCRIPTIONNELLE :	42
III. 2) DÉGRADATION DES ARNMS DÉPENDANTE DE LA QUEUE POLY (A) :	43
III. 3) TRADUCTION VS TURNOVER DE L'ARNM :	44
III. 4) DÉGRADATION ARE DÉPENDANTE DES ARNMS :	45
III. 5) PATHOLOGIE ET STABILITÉ DES ARNMS :	46
CHAPITRE IV	47
IV. 1) CASCADES DE SIGNALISATION DE LA FAMILLE MAPK DES MAMMIFÈRES :	47
IV. 2) LA VOIE DE SIGNALISATION P38 MAPK :	48
IV. 2. 1) EFFETS GÉNÉRAUX DE LA VOIE P38 MAPK :	48
IV. 2. 2) RÉGULATION DE LA STABILITÉ DES ARNMS :	49
IV. 3) LA VOIE DE SIGNALISATION SAPK/JNK :	51
IV. 4) LA VOIE DE SIGNALISATION ERK 1/2 (P42/44) :	52
IV. 5) LA VOIE DE SIGNALISATION NF-κB :	53
CHAPITRE V	56
V. 1) RÉSEAU DES CYTOKINES (CYTOKINE NETWORK) :	56
V. 2) CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES :	57
V. 3) INTERLEUKINE-1BETA (IL-1B) :	57
V. 4) INTERLEUKINE-17 (IL-17) :	58
V. 5) FACTEUR DE NÉCROSE DES TUMEURS (TNF-A) :	59
V. 6) PATHOPHYSIOLOGIE RA/OA :	59

ARTICLE 1	74
ARTICLE 2	89
DISCUSSION :	102
CONCLUSION :	112
LISTES DES RÉFÉRENCES	114

LISTE DES TABLEAUX

TAB.I : DISTRIBUTION DES ARN ^{MS} DES RÉCEPTEURS AUX PROSTANOÏDES DANS LES TISSUS MURINS	72
TAB.II : PHÉNOTYPES MAJEURS OBTENUS CHEZ LES SOURIS DEFICIENTES DES RÉCEPTEURS AUX PROSTANOÏDES	72
TAB.III : FAMILLES DES SÉQUENCES AU-RICHE.....	73

LISTE DES FIGURES

FIG.1A : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA LOCALISATION DES TROIS FAMILLES DE PROTÉOGLYCANES PRÉSENTS DANS LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DU CARTILAGE	61
FIG.1B: STRUCTURE PROTÉIQUE ET CARBOHYDRATÉE DE L'AGRÉCANE ET DE LA PROTÉINE DE LIAISON DU CARTILAGE ARTICULAIRE.	62
FIG.2 : VOIE GÉNÉRALE DE SYNTHÈSE DES PROSTAGLANDINES.....	63
FIG. 3A : LOCALISATION ET STRUCTURE GÉNOMIQUE DES GÈNES COX-1 ET COX-2 HUMAINS	64
FIG. 3B : ÉLÉMENTS RÉGULATEURS CIS SITUÉS DANS LA PARTIE 5' DES GÈNES COX-1 ET COX-2 HUMAINS.....	64
FIG.3C : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA PARTIR 3'-UTR DU GÈNE COX-2 HUMAIN	65
FIG.3D : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA SÉQUENCE PROTÉIQUE DES DEUX ENZYMES COX-1 ET COX-2	65
FIG. 4 : VOIE D'ACTIVATION MÉTABOLIQUE DES ISOENZYMES COXS	66
FIG. 5 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES RÉCEPTEURS AUX PROSTANOÏDES.	67
FIG. 6A : FONCTIONS MULTIPLES DE LA PARTIE 3'-UTR DE L'ARNM. CPE (CYTOLASMIC POLYADENYLATION ELEMENTS), ACE (ADENYLATION CONTROL ELEMENT).	67
FIG. 6B : DÉGRADATION DE L'ARNM DÉPENDANTE DE LA DÉADÉNYLATION DE LA QUEUE POLY (A).....	68

FIG. 6C : MODÈLE EXPLIQUANT LE PHÉNOMÈNE DE STABILITÉ ET D'INSTABILITÉ CONTRÔLÉ PAR LES SÉQUENCES AU-RICH.	69
FIG. 7 : VOIES GÉNÉRALES DE SIGNALISATION RESPONSABLES DE L'INDUCTION DU GÈNE COX-2.....	70
FIG. 8 : VOIE DE SIGNALISATION P38 MAPK, ET EFFET SPÉCIFIQUE DE SB.....	70
FIG. 9 : VOIES DE SIGNALISATION ACTIVÉES PAR TNF- α	71
FIG. 10 : MÉTABOLISME DU CARTILAGE.....	71

ARTICLE 1:

FIG. 1 : Cinétique de la stimulation de l'ARNm de COX-2 (A et B), de la protéine COX-2 (C) et de la sécrétion de la PGE ₂ (D) par IL-1 β	80
FIG. 2 : La stimulation de l'expression de l'ARNm de COX-2 (A) et de synthèse de la protéine de COX-2 (B) est PGE ₂ -dépendante.....	81
FIG. 3 : Effet des eicosanoïdes des HSF sur l'expression basale et induite de l'ARNm et de la protéine COX-2 par IL-1 β	81
FIG. 4 : Effet des inhibiteurs des différentes protéines kinases sur la stimulation de l'expression de l'ARNm de COX-2 (A) et de la synthèse protéique de COX-2	

par IL-1 β (B). Implication de l'AMPc dans le phénomène de stabilisation-PGE₂ dépendant (C et D)82

FIG. 5 : Time course de la phosphorylation de la p38 MAPK par la PGE₂ et IL-1 β (A). Activation transcriptionnelle du promoteur de COX-2 par IL-1 β et rôle de la p38 MAPK (B)83

FIG. 6 : La stabilisation PGE₂-dépendante de l'ARNm de COX-2 est achevée par l'intermédiaire de la p38 MAPK et la protéine kinase A.....84

FIG. 7 : La stabilisation PGE₂-dépendante de l'ARNm de COX-2 et la stimulation de la synthèse protéique sont médiées par les séquences AU-riche proximales et la portion distales de la partie 3'-UTR de l'ARNm de COX-285

ARTICLE 2:

FIG. 1 : Études cinétiques (A, B) de la stimulation de l'expression de l'ARNm de COX-2 et de la synthèse de la protéine COX-293

FIG. 2 : La stimulation de l'expression de l'ARNm de COX-2 et de la synthèse de la protéine COX-2 par IL-17 sont bloquée par un inhibiteur spécifique de la SAPK/p38 MAPK (A) d'une façon dose dépendante (B)93

FIG. 3 : Cinétique de l'activation de la cascade SAPK2/ p38 MAPK par IL-17.....94

FIG. 4 : Stimulation de la transactivation du dimère ATF-2/CREB par IL-1796

FIG. 5 : Rôle des voies de signalisation NF- κ B et JAK/STAT comme médiateurs de l'induction de l'expression du gène COX-2 par IL-17.....97

FIG. 6 : L'induction du promoteur de COX-2 par IL-17 dépend de l'activation de la p38 MAPK et de la transactivation de ATF-298

FIG. 7 : rhIL-17 stabilise l'ARNm de COX-2, rôle de SAPK2/p38 MAPK99


FIG. 8 : La stabilisation de l'ARNm de COX-2 et la stimulation de la traduction par rhIL-17 sont médiées via les séquences distales de la partie 3'-UTR de l'ARNm de COX-2100

ABRÉVIATIONS

AA	(arachidonic acid)
AMPC	(cyclic adenosine monophosphate)
ANG II	(angiotensin II)
AP-1	(activating protein-1)
AP-2	(activating protein-2)
APC	(antigen presenting cell)
APP	(amyloid precursor protein)
ARE	(AU rich element)
ATF-2	(activator transcription factor-2)
AUF1	(AU binding factor1)
bZIP	(basic leucin-zipper)
CD40	(cluster of differentiation 40)
COX	(cyclooxygenase)
cPLA ₂	(cytosolic phospholipase A2)
CRE	(CREB response element)
CREB	(cAMP response element binding protein)
CSAIDS	(cytokine suppressive anti-inflammatory drugs)
CSF	(colony stimulating factor)
DP	(prostanoid receptor D subtype)
EGF	(epidermal growth factor)
EGFR	(epidermal growth factor receptor)
eIF4E	(initiation factor 4E)
ELAV	(embryonic lethal abnormal region)
EP	(prostanoid receptor E subtype)
ERK1/2	(extracellular regulated kinase ½)
FGFR	(fibroblast growth factor receptor)
FP	(prostanoid receptor F subtype)
GDP	(guanosine diphosphate)

GEF	(guanine nucleotide exchange factor)
GM-CSF	(granulocyte macrophage-colony stimulating factor)
GPCR	(G protein coupled receptor)
GRK	(G protein coupled receptor kinase)
hnRNPD	(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D)
hnRNPC	(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C)
HSP27	(heat shock protein 27)
ICAM	(intercellular adhesion molecule)
I κ B	(inhibitor of kappa B)
IKK	(inhibitor of kappa B kinase)
IL-17	(interleukin-17)
IL-17R	(interleukin-17 receptor)
IL-1RAcP	(interleukin-1 receptor accessory protein)
IL-1 β	(interleukin-1 beta)
IL-6	(interleukin-6)
IL-8	(interleukin-8)
iNOS	(inducible nitric oxide synthase)
IP	(prostanoid receptor I subtype)
iPLA ₂	(intracellular phospholipase A ₂)
LPS	(lipopolysaccharide)
MAPK APK2	(mitogen activated protein kinase activated protein kinase-2)
MAPK	(mitogen activated protein kinase)
MAPKK	(mitogen activated protein kinase kinase)
MAPKKK	(mitogen activated protein kinase kinase kinase)
MBD	(membran binding domain)
MEF-2	(myogenic enhancing factor-2)
MEK	(mitogen extracellular kinase)
MEKK1	(mitogen extracellular kinase kinase-1)
MKK3/6	(mitogen kinase kinase 3/6)
MMP	(matrix metalloprotease)

MNK1/2	(MAP kinase interacting kinase1/2)
MSK	(mitogen stress kinase)
N-CAM	(neural cell adhesion molecule)
NF-IL6	(nuclear factor interleukin-6)
NF-κB	(nuclear factor kappa B)
NO	(nitric oxide)
NSAID	(non steroidal anti-inflammatory drug)
P38 MAPK	(p38 mitogen activated protein kinase)
PABP	(poly ADP binding protein)
PAF	(platelet activating factor)
Pan	(poly A nuclease)
PARN	(poly A ribonuclease)
PGD ₂	(prostaglandin D2)
PGE ₂	(prostaglandin E2)
PGF ₂	(prostaglandin F2)
PGG ₂	(prostaglandin G2)
PGHS	(prostaglandin H synthase)
PGI ₂	(prostaglandin I2)
PLA ₂	(phospholipase A2)
PLC	(phospholipase C)
POX	(peroxidase)
RA	(rheumatoid arthritis)
RHR	(Rel homology region)
RIP	(receptor interacting protein)
SAPK/JNK	(stress activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase)
SDS-PAGE	(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)
SLN	(nuclear localization signal)
TGF-β	(transforming growth factor beta)
TIA-1	(T-cell intracellular antigen-1)
TNFR	(tumor necrosis factor receptor)



TNF- α	(tumor necrosis factor alpha)
TP	(prostanoid receptor T subtype)
TRADD	(tumor necrosis factor receptor associated death domain)
TRAF	(tumor necrosis factor receptor associated factor)
TRE	(TPA response element)
TTP	(tristetraprolin)
TXA ₂	(tromboxane)
UTR	(untranslated region)
VCAM	(vascular cellular adhesion molecule)

INTRODUCTION

CHAPITRE I

I. 1) Ostéoarthrite :

L'ostéoarthrite (OA) est la maladie articulaire rhumatismale la plus fréquente au monde. Elle se manifeste d'une façon très variable chez les individus atteints par cette maladie. Les symptômes incluent une instabilité et une déformation des articulations, une raideur et une douleur qui restent la cause essentielle pour les consultations médicales. Le coût attribué à cette maladie est énorme. Ce coût est relié à la prépondérance majeure de la maladie, à l'insuffisance de l'orientation professionnelle et non professionnelle des patients OA, et aussi à une perte occasionnelle de s'autogérer (Yelin E. 1995). Une amélioration significative dans la compréhension de l'étiopathogenèse de l'ostéoarthrite était à la base du changement de l'approche conceptuelle et de son management, fournissant ainsi de nouvelles mesures préventives et des approches plus claires des méthodes thérapeutiques envisagées. Plusieurs directives pour le management de l'ostéoarthrite à certains sites spécifiques ont été développées et établies (Levy E, 1993). Les approches thérapeutiques doivent prendre en considération que l'ostéoarthrite n'est plus qu'une simple dégradation du cartilage, mais elle implique des processus biochimiques et biomécaniques dynamiques (Hochberg MC, 1995). En effet, le dommage articulaire se produit via une activité de remodelage intense qui touche toute la structure articulaire. Malgré le fait que les changements biologiques soient majoritairement localisés au niveau du cartilage articulaire qui reste toujours au centre de l'action, l'ostéoarthrite est de plus en plus considérée comme une maladie de toute la jonction articulaire, et se traduit par la suite par une faillite fonctionnelle de l'articulation comme organe.

I. 1.1) Définition :

Malgré la prépondérance de la maladie et son impact énorme sur le système de santé, il n'existe pas jusqu'à date une définition précise de la maladie qui est connue sous le nom de "maladie dégénérative des jonctions articulaires" (degenerative joint disease). Cette maladie dont l'étiologie est inconnue est caractérisée par la dégradation du cartilage articulaire comme cible primordiale de la maladie. En 1986 le Sous-Comité sur l'Ostéoarthrite du Collège Américain de la Rhumatologie et le Comité des Critères Thérapeutiques ont établi la définition suivante de l'ostéoarthrite: L'ostéoarthrite est un groupe hétérogène de conditions conduisant aux symptômes et signes des maladies des jonctions caractérisées par une perte de l'intégrité du cartilage articulaire et des changements de l'os sous-jacent au niveau de la jonction marginale (Hutton CW, 1989). Cette définition a été développée pour inclure les changements cliniques, pathophysiologiques, biochimiques et biomécaniques: "du point de vue clinique la maladie est caractérisée par une douleur au niveau de la jonction articulaire, une fragilité de l'articulation, limitation du mouvement, effusion occasionnelle et des degrés variables d'inflammation mais sans effets systémiques (Altman et al., 1986). Une définition plus récente a été élaborée en 1994, elle considère l'ostéoarthrite comme étant un groupe de plusieurs maladies se chevauchant qui peuvent avoir des étiologies différentes mais des résultats biologiques, cliniques et morphologiques similaires. Dans ce cas l'impact de la maladie dépasse le cartilage pour inclure tous les composants et l'entourage de l'articulation (Brandt KD, 1986). Les auteurs ne cessent de modifier la définition en raison des nouvelles données de recherche qui contribuent à identifier de nouvelles composantes essentielles à l'étiologie de la maladie. "L'ostéoarthrite est une maladie non inflammatoire caractérisée par une dégradation du cartilage articulaire et une croissance de l'os aux bords et à la surface des jonctions (Kuettner KE, 1995)

I. 1. 2) Progression de la maladie :

La relation entre les changements au niveau du cartilage et de l'os est toujours un sujet de débat. Un point final de l'ostéoarthrite est la perte localisée du cartilage articulaire mais les étapes qui précèdent représentent un défi majeur pour la compréhension de la maladie. OA est connue comme étant un trouble articulaire multifactoriel dont la progression de la maladie se fait très lentement. Les facteurs à risques comme l'âge, les facteurs génétiques, hormonaux, et mécaniques sont des contributeurs essentiels au développement et à la progression de la maladie. Les études faites sur des modèles expérimentaux de OA montrent que la lésion se produit premièrement au niveau du cartilage. Certaines évidences suggèrent que les déformations de l'os souschondral et la vascularisation qui s'y associe, précèdent la dégradation du cartilage. Il est connu que durant les événements précoces de la progression de OA, le cartilage articulaire perd sa capacité absorbante d'énergie, l'os souschondral présente des microfractures et une sclérose au niveau de l'os trabéculaire. Ce qui abouti à un cartilage très sensible et incapable de résister aux stress mécanique. Mais la démonstration du concept impliquant l'os souschondral comme responsable primaire reste à démontrer. Bref, les événements initiateurs de la maladie n'épargnent aucun tissu de l'articulation. Le cartilage, l'os souschondral et la membrane synoviale, et leur pathologies respectives sont inter-connectés (William J Koopman, 1996). Le cartilage articulaire possède des propriétés biochimiques uniques qui sont maintenus grâce aux molécules de sa matrice extracellulaire. La faillite biomécanique observé chez le cartilage arthrosique est essentiellement due à la perte de sa matrice extracellulaire. Malgré que le phénomène de mortalité des chondrocytes n'est pas généralement admis dans l'étiologie de OA, il est certain que ce phénomène joue un rôle primordiale dans la progression de la maladie. Dans un cartilage normal, le remodelage de la matrice extracellulaire est lent et les chondrocytes expriment les gènes spécifiques au cartilage articulaire e.g., le collagène de type II . Parcontre une activité de remodelage accrue est observée au niveau des chondrocytes OA ainsi qu'une expression des molécules atypiques de la matrice

cartilagineuse e.g., le collagène de type I. Un schéma global peut être établi pour expliquer la progression de OA. Premièrement, l'activité de remodelage dans les chondrocytes est augmentée, elle se traduit par une élévation accrue de l'expression des gènes de collagène de type II et de l'aggrécane. Ensuite, le phénotype des chondrocytes est altéré suite à l'expression de certains gènes atypiques de la matrice extracellulaire (collagène de type I). Finalement, la suppression de l'expression des gènes du collagène de type II et de l'aggrécane, est suivie par une perte des molécules du collagène de type II et de l'aggrécane grâce à l'induction de l'expression des métalloprotéases (MMPs) qui dégradent la matrice extracellulaire du cartilage (Rédini F. 2001). Ce phénomène est catalysé par les stress mécaniques appliqués provoquant davantage une perte du cartilage articulaire. L'origine de ce processus peut être au niveau des couches superficielles et ensuite progresse pour toucher les zones les plus profondes (Rédini F. 2001). À part les facteurs biomécaniques qui influencent la physiologie des chondrocytes, les interactions moléculaires avec les cellules avoisinantes les chondrocytes influencent profondément la physiologie des chondrocytes. À l'état normal, le chondrocyte assure la synthèse et la dégradation de tous les composants du cartilage articulaire et est responsable de l'équilibre homéostatique du cartilage articulaire (Muir, 1995). Dans une articulation arthrosique, l'interleukine-1, le facteur de nécrose des tumeurs et l'interleukine-6 ont été isolés dans l'articulation et peuvent activer les chondrocytes. D'autre part, ces facteurs synthétisés par les chondrocytes eux-mêmes et les synoviocytes peuvent donc agir d'une façon autocrine et paracrine. Le rôle de IL-1 est prédominant dans le catabolisme du cartilage. Il active la dégradation de la matrice extracellulaire par la libération d'enzymes (collagénases, gélatinases, stromélysine) et il inhibe la synthèse des protéoglycanes et des glycoaminoglycanes articulaires et la prolifération des chondrocytes (Tan L, 2003). À l'inverse, les facteurs de croissance comme IGF-1 et le TGF- β ont des activités opposées à celles de l'IL-1, ainsi, ils stimulent les activités de synthèse des chondrocytes et diminuent la dégradation (Moses & Serra, 1996). Le processus arthrosique se caractérise par trois étapes : dans un premier temps, une lésion principale apparaissant au niveau du cartilage articulaire arthrosique provoque

une déplétion locale en protéoglycanes de la matrice extracellulaire, accompagnée de modifications structurales : diminution de la taille des agrégats, augmentation de la quantité de protéoglycanes libres, diminution de la longueur des chaînes de chondroïtine sulfate avec une structure modifiée. Ces anomalies se concentrent principalement au niveau des zones de fibrillation. Par conséquent, le chondrocyte va essayer de combler la perte en protéoglycanes et de réparer le cartilage articulaire fissuré suite à cette lésion. Au cours de cette étape, on assiste à une reprise de la division cellulaire et à une synthèse accrue d'aggrécane dont la composition et la structure sont modifiées, ce qui entraîne une perte de l'aggrégation des protéoglycanes. Parallèlement, l'apparition d'un autre type de protéoglycane, versicane, représente un marqueur du changement phénotypique du cartilage hyalin en fibrocartilage. L'ensemble de ces modifications qualitatives et quantitatives provoque une altération des propriétés biophysiques du tissu. Puis dans un troisième temps, lorsque l'arthrose devient plus sévère, les capacités de synthèse du chondrocyte diminuent puis chutent complètement. On assiste à une augmentation de la synthèse et la libération des métalloprotéases, responsables de la dégradation des agrégats et des monomères de protéoglycanes, dont la taille diminue empêchant leur aggrégation, et de la diminution du diamètre des fibres de collagène de type II. En parallèle, l'apparition de collagène de type I provoque une augmentation de la dureté du cartilage articulaire. La diminution de la concentration en protéoglycanes, malgré l'augmentation de synthèse, suggère une prédominance importante du catabolisme de la matrice extracellulaire. Ces anomalies apparaissent bien avant la fibrillation de la surface du cartilage articulaire et entraînent l'altération des fonctions biomécaniques du tissu (Aigner T. 2002), (Rédini F. 2001), (Sandell & Aigner 2001). En conclusion, des variations d'expression des différentes familles de protéoglycanes du cartilage incluent des altérations multiples selon les fonctions remplies par ces protéoglycanes au sein du tissu. Ainsi, des modifications dans l'expression de l'aggrécane entraînent une altération des propriétés fonctionnelles du tissu, à savoir une hyperhydratation du cartilage articulaire, une altération de l'élasticité et de la compressibilité, une réponse mécanique anormale à des charges normales quotidiennes, une augmentation des

microfractures, une désorganisation de l'ultrastructure de la matrice extracellulaire, des anomalies microscopiques menant à la fibrillation. Dans les stades ultimes de la maladie on assiste à l'ulcération du cartilage articulaire avec mise à nu de l'os sous-chondral. En revanche, des modifications d'expression des protéoglycanes de surface entraînent des modulations dans l'activité biologique de certains facteurs de croissance tels que le FGF ou le TGF- β , pouvant entraîner une variation de la prolifération cellulaire, indispensable à la tentative de réparation du cartilage initiée, dans les stades précoces de l'arthrose. Pour comprendre la base moléculaire de OA il est donc nécessaire de connaître la structure et le rôle des différents tissus qui forment l'articulation et les voies qui régulent leur métabolisme

I. 2) Biologie de l'articulation :

I. 2. 1) Développement, structure et fonction du cartilage articulaire :

Les articulations sont classées en jonctions mobiles (jonction synoviale) et immobiles (Gray, 1973). Les jonctions synoviales sont majoritaires par rapport aux autres types d'articulations. Une articulation synoviale comprend deux os dont les extrémités sont liées par un tissu cartilagineux lisse et résistant de nature hyalin appartenant au tissu conjonctif primaire. Du point de vue embryologie et développement le cartilage fait partie des éléments squelettiques. Les éléments squelettiques sont formés via deux voies développementales différentes. Le cartilage et les os longs sont formés via une succession d'étapes qu'on désigne sous le nom d'ossification endochondrale (DeLise, 2000). La première étape de différenciation est caractérisée par un recrutement et une condensation des cellules mésenchymateuses. Cette condensation va donner des chondroblastes prolifératifs, qui vont être soit remplacés par des ostéoblastes pour former les os, ou poursuivre une étape de différenciation terminale vers des chondrocytes matures qui secrètent la matrice extracellulaire du cartilage (Gray, 1973), (Tickle and Munsterberg, 2001). La chondrogenèse est la première étape de l'ossification endochondrale, elle aboutit à la formation des divers tissus squelettiques responsables de la structure et de la

motilité chez les vertébrés. C'est une série d'étapes complexes, hautement organisées et contrôlées, dont la première consiste en une migration des cellules non différenciées de la plaque latérale du mésoderme, vers le tissu destiné à être de l'os. Ces cellules précurseurs se condensent en s'empilant les unes à côté des autres, et en subissant une augmentation du nombre des cellules par unité de volume ou de surface, selon un rythme prolifératif normal (Fell HB, 1925). Ce processus de condensation, aboutissant ultérieurement à la formation de la plaque de croissance cartilagineuse représente la base de l'établissement de la position, de la forme, et du nombre des éléments squelettiques futures. Durant cette étape les chondroblastes mitotiquement actifs cessent de se diviser et poursuivent une phase terminale de différenciation pour devenir des chondrocytes matures ou s'hypertrophient et meurent par apoptose pour être remplacé par les ostéoblastes néoformés et la moelle osseuse. Chaque étape de la chondrogenèse est caractérisée par un changement morphologique et phénotypique bien défini. Les chondrocytes matures expriment des gènes conduisant à maintenir une différenciation chondrocytaire terminale tel que le facteur de transcription Sox9 et les gènes codant des protéines de la matrice extracellulaire (collagène de type II), ou le gène de collagène de type X dans le cas des chondrocytes hypertrophiés (Kosher, 1986). Un bon déroulement de l'étape de la condensation est crucial pour le développement normal des cellules mésenchymateuses non différenciées vers un cartilage compétent. Pour cette raison, cette phase a été nommée « le squelette membranaire ». Ce processus est régulé selon différents mécanismes incluant des interactions cellule-cellule, cellule- matrice extracellulaire (MEC), et par l'intermédiaire des interactions spécifiques entre les ligands sécrétés avec leurs propres récepteurs. L'adhésion entre les cellules se produit grâce aux molécules d'adhésion N-cadhérine et N-CAM (DeLise, 2000). Tandis que l'interaction des cellules avec la MEC, au niveau des zones de la condensation cellulaire, se fait avec les fibronectines (Kulyk WM, 1989). D'ailleurs le niveau de l'expression de ces gènes varie dépendamment de l'étape de transition considérée. La croissance de l'os est unidirectionnelle et se fait suivant une prolifération des chondrocytes guidée par trois types d'axes de développement: l'axe

proximo-distal, l'axe antéro-postérieur et l'axe dorso-ventral. L'établissement de ces axes est très complexes, leur rôle est de maintenir une croissance moléculaire coordonnée, parfaite et normale de l'os. Les composantes moléculaires nécessaires pour le traçage de ces axes incluent les facteurs de croissance (FGF,...), les facteurs appartenant à la famille de TGF- β , les glycoprotéines secrétées de la famille Wnt, les facteurs hedgehog (SHH), les rétinoïdes et la famille des gènes Hox. Ces différents facteurs sont aussi interconnectés de telle façon que les composants (FGFs) d'un tel axe (proximo-distal) modulent l'expression des gènes (Shh) d'un autre axe (antéro-postérieur) (DeLise, 2000). Les études faites sur les souris transgéniques ont permis la découverte de nombreuses mutations causant un développement anormal de l'os. Ainsi, certaines mutations situées au niveau du récepteur de FGF3 et réduisant la croissance osseuse ont été trouvées chez les personnes souffrant d'achondroplasia et hypochondroplasia (Bellus GA, 1995), (Shiang R, 1994). La liste des facteurs moléculaires impliqués dans la chondrogenèse ne cesse de s'élargir pour inclure les voies des MAPKs qui jouent un rôle clé à cet égard (Stanton 2003). Malgré le progrès réalisé dans ce domaine, les mécanismes moléculaires impliqués dans la transition d'une étape à une autre ne sont pas encore élucidés. Le cartilage articulaire est un tissu non vascularisé, non innervé et n'est pas irrigué par la circulation lymphatique. Il est situé aux extrémités des os longs. C'est un tissu lisse et résistant. Son rôle essentiel est d'éviter les forces de frottement au niveau de l'articulation en assouplissant le mouvement et le répartissant d'une façon uniforme dans l'articulation. Le cartilage articulaire est constitué de chondrocytes noyées dans une matrice extracellulaire formée de protéoglycanes et des protéines non collagène, imbibées dans un grand réseau de collagène type II (Fig. 1a, b). Ce dernier est attaché au feuillet de l'os souschondral. Les propriétés biomécaniques ainsi que les fonctions du cartilage articulaire sont intimement liées à la composition et à l'assemblage des composants de sa matrice extracellulaire. Le collagène de type II est le composant le plus abondant. Il forme avec les collagènes mineurs du type IX et XI le réseau fibreux tridimensionnel du cartilage. En plus de son rôle de stabilisateur des protéoglycanes, ce réseau contrôle le niveau d'hydratation du cartilage (Kosher et al.,

1986). Au moment où le cartilage est comprimé sous l'effet d'un poids, les molécules d'eau et les solutés sont expulsés de la matrice jusqu'à ce que les forces répulsives des protéoglycanes égalisent le poids du corps appliqué. Les protéoglycanes se réhydratent et rétablissent la forme initiale du cartilage quand la force appliquée sur le cartilage est enlevée (Urban et al., 1979). Ce jeu de compression et de décompression du cartilage est important afin de permettre un échange et une accessibilité des nutriments et des protéines au niveau de la matrice et par la suite aux chondrocytes (Mow et al., 1992). La rupture de l'intégrité du réseau de collagène observé dans OA provoque une hyperhydratation du cartilage articulaire et par la suite une diminution de sa rigidité (O'Hara et al., 1990). Les chondrocytes sont responsables de l'homéostasie du cartilage articulaire. Leur rôle est de remplacer les macromolécules perdues ou dégradées durant le métabolisme normal du cartilage. Cependant, dans l'ostéoarthrite, cet équilibre entre anabolisme et catabolisme est rompu en faveur de la dégradation.

I. 2. 2) Classification, morphologie, et fonction des synoviocytes :

La membrane synoviale est une couche de cellules très mince formée d'un tapis de deux à trois cellules d'épaisseur. Son rôle essentiel est de fournir à la cavité de l'articulation et au cartilage articulaire des molécules lubrifiantes comme l'acide hyaluronique, ainsi que de l'oxygène et des protéines plasmatiques nutritives. Dans le cas normal, les synoviocytes sont les cellules prédominantes de la couche terminale qui recouvre la cavité de l'articulation. Au-dessous de cette couche il peut exister plusieurs autres types de cellules comme des fibroblastes, des macrophages, des mastocytes, des cellules vasculaires et lymphatiques (Byers et al., 1977). L'ensemble de ces cellules avec la membrane synoviale forme le synovium. Les synoviocytes sont séparés selon leur morphologie et leurs marqueurs moléculaires de surface en deux types: synoviocytes de type A et synoviocytes de type B. les synoviocytes de types A sont des cellules dont la morphologie est semblable à celle des macrophages, elles sont des macrophage-like synoviocytes (Rooney et al., 1988; Wilkinson et al.,

1992). Ces cellules agissent comme des phagocytes pour débarrasser l'articulation des débris qu'elle contient. aussi elles peuvent agir comme des cellules présentatrices d'antigènes (Graabaek, 1982). Ces cellules peuvent contribuer au processus inflammatoire observé dans le synovium grâce à leur capacité de synthétiser des prostaglandines dans leurs lysosomes (Klareskog et al., 1982). Les synoviocytes de type B sont des fibroblastes, elles sont appelées fibroblastes-like synoviocytes (Rooney et al., 1988; Wilkinson et al., 1992). Ces cellules sont responsables de la lubrification de l'articulation en sécrétant de l'acide hyaluronique. Elles synthétisent aussi des composants matriciels comme le collagène. Elles sont capables de sécréter plusieurs types d'enzymes qui dégradent le cartilage et l'os.

CHAPITRE II

II. 1) Biologie moléculaire de la cascade de l'arachidonate :

L'acide arachidonique est présent in vivo sous forme estérifiée avec les glycérophospholipides de la membrane cellulaire (Smith and Dewitt, 1996). Il est libéré à l'intérieur de la cellule grâce à l'activité des phospholipases (e.g. phospholipase cytosolique A₂). L'acide arachidonique libéré est le substrat du métabolisme oxydatif de différents systèmes enzymatiques. La cascade de l'acide arachidonique représente une série complexe et interconnectée de différentes voies de biosynthèse aboutissant à la production des médiateurs lipidiques suite à des réactions d'oxygénation et/ou d'hydroxylation des acides gras poly-insaturés. Les médiateurs lipidiques comprennent les prostaglandines, les thromboxanes, les leukotriènes, les lipoxines, les hépoxillines, les isoprostanes et une variété d'acide gras hydroxylés, peroxyés, ou hydroperoxyés. L'introduction des techniques de biologie moléculaire a contribué à l'accélération des études sur les enzymes et les récepteurs responsables du métabolisme et des fonctions physiologiques des eicosanoïdes. Les structures primaires de plusieurs enzymes et récepteurs ont été déduites de leur ADNc

correspondant. Ces derniers ont été utilisés pour surexprimer ces protéines dans différents modèles cellulaires. L'utilisation des techniques de ciblage géniques a approfondi considérablement la connaissance des fonctions physiologiques et pathologiques des eicosanoïdes. De plus les techniques de biologie structurale sont un outil important pour étudier le mode d'action de certaines enzymes clé de cette cascade à l'échelle atomique.

II. 1. 1) Les prostanoïdes :

Les prostanoïdes dérivent de l'oxygénation des acides gras C₁₈, C₂₀ et C₂₂. Ces produits ayant des caractères hormonaux actifs sont connus sous le nom d'eicosanoïdes (du Grec eicosa=vingt, acides gras dont la chaîne contient 20 atomes de carbones). Les eicosanoïdes dérivent à leur tour des acides gras poly-insaturés ω 3 (n=3) et ω =6 (n=6), elles incluent : Les prostanoïdes (prostaglandines, thromboxanes) sont formées par la cascade enzymatique de la cyclooxygénase, les leukotriènes (Yokomizo et al., 1997), les lipoxines (Serhan et al., 1999), les hépoxillines (Pace-Asciak et al., 1999), les acides gras monohydroxylés produits par la voie enzymatique de la lipoxygénase (Mueller et al., 1998), les acides gras époxylés et dihydroxylés synthétisés par la cytochrome P450s (Chen et al., 1999) et finalement les isoprostanes (Morrow et al., 1999), les isoleukotriènes ainsi que d'autres peroxydes d'acide gras générés d'une façon non enzymatique (Khaselev and Murphy, 1999). Les effets biologiques puissants et forts des prostaglandines qui touchent presque tous les organes du corps humain stimulaient considérablement la recherche sur ces fascinantes molécules. Elles ont été découvertes en 1930 dans le liquide séminal par deux laboratoires différents (Burr, 1930; Kurzrok R. 1930; Von Euler US, 1934). Le premier a observé que des rats soumis à une diète lipidique, présentaient un retard de croissance, des problèmes de reproduction, des lésions rénales et une consommation excessive d'eau d'où la notion d'« acides gras essentiels ». L'autre groupe a identifié un facteur ayant les propriétés des acides gras, ce facteur qui était un vasodépresseur, et stimulait l'activité des muscles lisses, a été

nommé « prostaglandine ». Il a fallu attendre 30 ans avant que Bergstrom et Samuelsson élucident la structure des prostaglandines classiques et démontraient que ces molécules sont synthétisées à partir de l'acide gras essentiel, l'acide arachidonique (Bergstrom et al., 1964). En 1971, Vane a remarqué que les médicaments aspirine-like, connus pour leurs effets analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires, inhibaient la biosynthèse des prostaglandines (Vane, 1971). Peu après la découverte de la thromboxane A_2 , un facteur stimulant l'aggrégation des plaquettes et un puissant vasoconstricteur, la prostacycline synthétisée par les parois des vaisseaux a été isolée. Cette dernière neutralise l'effet de la thromboxane. Depuis 1975 jusqu'à 1980 la biosynthèse des leukotriènes a été mise en place démontrant que ces derniers sont des médiateurs lipidiques puissants associés avec l'étiologie de l'asthme et des réactions allergiques (Samuelsson, 1983). L'importance de la recherche sur les prostanoïdes a pris sa place en attribuant un prix Nobel dans le domaine de recherche sur les eicosanoïdes (Nobel Prize, 1982). La composition de la famille des eicosanoïdes ne cesse d'augmenter pour engendrer presque tous les produits à longues chaînes carbonées, poly insaturés et oxygénés, formés à partir d'une cascade enzymatique ou non enzymatique. L'acide arachidonique (20:4 ω 6) est le premier précurseur des eicosanoïdes dans les cellules des mammifères. Les caractéristiques propres aux «vrais» eicosanoïdes se révèlent par la précision stœchiométrique durant leur genèse et par leurs effets physiologiques puissants à l'échelle nano molaire.

II. 1. 2) Mécanisme générale de synthèse des prostaglandines :

Les prostanoïdes sont synthétisées via la voie de la cyclooxygénase à partir de l'acide arachidonique (Smith et al., 1996) (Fig.2). Elles comportent les prostaglandines et les thromboxanes. La structure des prostanoïdes est celle d'un acides gras à 20 atomes de carbone avec une liaison double trans à la position C_{13} - C_{14} et un groupe hydroxyle en C_{15} et un anneau de carbone qui peut être un cyclopentane (prostaglandine) ou un cyclohexane (thromboxane). Les abréviations utilisées pour

désigner les différentes prostaglandines sont généralement indexées, e.g. PGE₂, ce nombre désigne le nombre des liaisons doubles se trouvant juste à côté de l'anneau. La cascade de synthèse se produit dans une grande variété de cellules en réponse à différents stimuli physiologiques et pathologiques. Les prostaglandines néoformées sont rapidement secrétées à l'extérieur de la cellule pour agir localement comme des hormones d'une façon autocrine ou paracrine au niveau de leur site de production. Leurs effets biologiques sont médiés par des récepteurs spécifiques localisés sur les membranes cellulaires. La cascade de biosynthèse comprend trois étapes. a) L'acide arachidonique est libéré par hydrolyse des phospholipides membranaires des cellules grâce à l'activité des phospholipases, e.g., phospholipases A₂, activées par un stimulus externe. b) L'acide arachidonique libéré est converti en prostaglandine endopéroxyde H₂ (PGH₂) grâce à l'activité enzymatique de l'enzyme prostaglandine endopéroxyde H synthase (PGHS) ou cyclooxygénase (COX). c) L'étape finale est marquée par une conversion de PGH₂ néo synthétisée en prostaglandines bioactives. Cette étape est catalysée par différents types de synthétases distribuées en fonction du tissu dans l'organisme. Cette voie enzymatique génère cinq prostanoïdes bioactives primaires qu'on appelle PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂, PGI₂ et TXA₂. L'implication de cette voie dans un grand nombre de maladies comme le cancer, l'inflammation et l'hypertension a été mise en évidence grâce à l'utilisation des inhibiteurs de la cyclooxygénase comme les Médicaments Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien (NSAID). Ces derniers inhibent d'une façon non sélective la synthèse de toutes les prostaglandines mentionnées ci-dessus.

II. 1. 3) Hydrolyse de l'acide arachidonique par la phospholipase-A₂ :

Depuis 25 ans, le métabolisme de l'acide arachidonique (AA; acide 5, 8, 11, 14-eicosatétraoïque) a été sujet à des recherches intensives dans les domaines pharmacologiques, biochimiques et physiologiques. Malgré que les fonctions physiologiques jouées par les métabolites de l'acide arachidonique soient très nombreuses, les détails de la formation de l'AA restent un phénomène à découvrir.

Le niveau d'acide arachidonique libre dans la cellule est très bas, limitant ainsi la synthèse de ses métabolites. L'AA se situe à la position sn-2 des phospholipides membranaires. Il est libéré suite à une réaction de désacylation catalysée par différents types de lipases. Le clivage direct de AA au niveau de sn - 2 par la phospholipase A₂ (PLA₂) est une étape clé des réactions de désacylation qui se produisent dans les cellules (Dennis, 1994). Il est à noter que AA peut être généré par d'autres voies différentes, e.g., phospholipase C ou D. Mais la voie de la PLA₂ demeure la plus pertinente à cet égard. La PLA₂ constitue une superfamille d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse de la liaison ester phospholipidique sn-2, générant ainsi un acide gras libre et le 2-lysophospholipide (Snyder, 1995). En plus qu'elles participent à la biosynthèse des eicosanoïdes, les PLA₂s jouent un rôle important dans l'inflammation. Ce rôle s'explique par la formation du Platelet-Activating Factor (PAF, 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine), un médiateur puissant de l'inflammation, à partir du 2-lysophospholipide libéré (Snyder, 1995). Il est difficile de savoir quel type parmi les PLA₂ est responsable de la synthèse des médiateurs inflammatoires. Les PLA₂ sont regroupées en 3 types: La PLA₂ sécrétée (sPLA₂), la PLA₂ cytosolique Ca²⁺ dépendante (cPLA₂) et la PLA₂ intracellulaire Ca²⁺ dépendante (iPLA₂). En se basant sur les études faites ultérieurement, un mécanisme général a été établi. Premièrement plusieurs PLA₂ sont impliquées dans la régulation cellulaire et la formation des seconds messagers lipidiques. Deuxièmement le mécanisme de formation de AA inclut au moins deux PLA₂ différentes, plus spécifiquement la cPLA₂ et la sPLA₂. Il est à noter que l'activation de la cPLA₂ peut être provoquée soit par une cascade de phosphorylation (Lin et al., 1993), soit par l'élévation du Ca²⁺ intracellulaire (Glover et al., 1995), ou du niveau du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (Mosior et al., 1998). Un couplage synchronisé de tous ces signaux peut converger pour produire une activation beaucoup plus prolongée de la cPLA₂ qui demeure l'enzyme clé dans l'hydrolyse et la libération de l'acide arachidonique.

II. 2) Structure du gène COX/PGHS :

La cyclooxygénase (COX, prostaglandine endopéroxyde synthase) est un enzyme clé dans la biosynthèse des prostaglandines. Deux isoformes de COX, COX-1 et COX-2, ont été identifiées. Les séquences d'acides aminés des deux isoformes humains sont à 60% homologues. COX-1 est un enzyme exprimé d'une façon constitutive dans la majorité des tissus et cellules animales. Le promoteur de COX-1 ne contient pas de boîte TATA ou CAAT mais il est riche en GC. Ces caractéristiques sont consistantes avec ceux des gènes de maintenance. COX-2 est un enzyme inductible dont la synthèse est induite par plusieurs cytokines et facteurs de croissance. L'induction du gène COX-2 est inhibée par la dexaméthasone qui est un glucocorticoïde anti-inflammatoire et un agent immunosuppresseur. La partie 5' du gène COX-2 possède plusieurs sites consensus cis qui participent à la régulation de l'expression du gène. Parmi ces sites on trouve un site CRE, un site NF- κ B, un motif NF-IL6, et une boîte-E. Ces sites peuvent réguler la transcription du gène d'une façon indépendante ou synergique. Il est à noter que le gène COX-2 est régulé aussi d'une façon post-transcriptionnelle.

II. 2. 1) Structure du gène COX-1/PGHS-1 :

Le gène COX-1 se trouve sur le chromosome 9q32-q33.3 (Funk et al., 1991) (Fig.3a). La structure primaire du COX-1 du mouton a été déterminée par clonage du ADNc en 1989 (Merlie et al., 1988; Yokoyama et al., 1988). Peu après, la séquence complète des acides aminés du COX-1 humain a été déduite par séquençage de l'ADN génomique humain de cet enzyme (Yokoyama and Tanabe, 1989). Le gène COX-1 est d'une longueur approximative de 22kb comportant 11 exons. La longueur de son transcrite (ARNm) est de 2.8kb (Fig.3c). Sa région promotrice contient plusieurs éléments régulateurs de la transcription (Fig.3b). Elle inclut un motif Sp1, 2 sites AP-1, un motif NF-IL6 et un élément GATA. Mais la partie 5' de COX-2 ne possède pas de boîte TATA.

II. 2) Structure du gène COX-2/PGHS-2 :

Le gène COX-2 a été découvert en 1991, il est qualifié comme étant un gène précoce (Kujubu et al., 1991; Xie et al., 1991). Il se trouve sur le chromosome 1q25.2-q25.3 (Tay et al., 1994) (Fig.3a). La longueur approximative du gène COX-2 est de 8.3kb comportant 8 exons. Il est transcrit en plusieurs variants de longueur successive 4.6, 4.0 et 2.8 kb (Fig.3c). Le séquençage de la partie 5' de COX-2 a montré l'existence de plusieurs éléments potentiels de régulation de la transcription (Fig.3b), ils incluent une boîte TATA, un motif NF-IL6, 2 sites AP-2, 3 sites Sp1, 2 sites NF- κ B, un motif CRE et une boîte-E. Les différences entre les deux gènes sont: le premier intron dans COX-1 n'existe pas dans COX-2 et les introns dans COX-2 sont plus courts que ceux de COX-1. L'intron le plus large de COX-2 contient toute la région 3' non traduite (3'-UTR), cette région contient 23 copies de ATTTA qui sont des éléments d'instabilité de l'ARNm. Ces éléments d'instabilité jouent un rôle primordial et très important dans la régulation du gène COX-2.

II. 3) Structure des enzymes COX-1 et -2 (PGHS-1 et -2) :

Les enzymes cyclooxygénase-1 et -2 appelés aussi prostaglandine endopéroxyde H synthase-1 et -2 (PGHS-1 et-2) respectivement, ont une activité bis-oxygénase (cyclooxygénase) et hydroperoxydase hème dépendante et ils sont liés à la membrane. Ils sont présents à la surface luminale du réticulum endoplasmique et sur les parois intérieures et extérieures de l'enveloppe nucléaire (Morita et al., 1995). La détermination de la structure et de la fonction des isoformes de PGHSs sont d'une importance primordiale car ces enzymes sont les cibles thérapeutiques des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAIDs) (Fig.3d). Il est devenu apparent après leur découverte que ces deux enzymes sont modulés d'une façon différente ainsi que leur profil d'expression et leurs rôles dans plusieurs processus pathologiques (Smith and Dewitt, 1996). Les isoenzymes de PGHS jouent un rôle important dans plusieurs pathologies incluant la thrombose (Patrono, 1994) pour PGHS-1, et l'inflammation, la douleur et la fièvre (Crofford et al., 2000), une variété

de cancers (Levy, 1997) et les troubles d'origine neurologique comme l'Alzheimer (McGeer and McGeer, 1999) et la maladie de Parkinson (Smythies, 1996) pour le PGHS-2. La structure primaire de PGHS-1 et 2 de plusieurs espèces est connue (Smith and Dewitt, 1996). Les deux isoformes contiennent des peptides signaux de longueurs variées. La protéine mature de PGHS-1 contient 576 acides aminés, et celle de la PGHS-2 contient 587 acides aminés. Les homologies entre les structures en acides aminés des enzymes appartenant à la même espèce sont de 60% à 65%, et elles sont de 85% à 90% entre des isoformes d'espèces différentes (Smith and Dewitt, 1996). La différence structurale majeure entre PGHS-1 et PGHS-2 réside dans le domaine de liaison à la membrane (MBD) (Otto and Smith, 1996). Une autre différence structurale consiste en une insertion de 18 acides aminés se trouvant après le sixième résidu de la partie C-ter de PGHS-2 et qui ne se trouve pas dans PGHS-1. Le rôle de cette séquence est inconnu. Elle peut être un domaine signal pour contrôler le recyclage de la protéine ou la translocation subcellulaire. PGHS-1 est N-glycosylée à 3 sites et PGHS-2 peut être N-glycosylée de 2 à 4 sites. Ce profil de glycosylation se manifeste sous forme de plusieurs bandes sur SDS-PAGE (Otto et al., 1993). La N-glycosylation de PGHS-1 est importante pour le repliement de la protéine (Otto et al., 1993). La structure tridimensionnelle de PGHS-1 de poulet a été documentée en 1994 (Picot et al., 1994). Peu après, La structure cristalline de PGHS-2 humaine (Luong et al., 1996), et murine ((Kurumbail et al., 1996) ont été rapidement élucidées. Plus récemment les structures de PGHS-1 complexée avec l'acide arachidonique (Malkowski et al., 2000), l'acide dihomo- γ -linoléique (Thuresson et al., 2001), l'acide linoléique (Malkowski et al., 2001) et l'acide eicosapentanoïque (Malkowski et al., 2001) ont été déterminées et publiées, ainsi que la structure cristalline de la PGHS-2 murine complexée avec l'acide arachidonique (Kiefer et al., 2000). La PGHS fonctionne comme un homodimère (Xiao et al., 1998), mais on ignore pourquoi la fonction catalytique de PGHSs nécessite une dimérisation. Chaque monomère contient 3 domaines structuraux: un domaine similaire de croissance épidermique (EGF) N-terminale et formé de 50 acides aminés, juste à côté on retrouve le domaine de liaison à la membrane (MBD) qui s'étend

jusqu'à 50 acides aminés et finalement un domaine catalytique très large de 460 acides aminés de nature globulaire situé à la partie C-terminale (Kurumbail et al., 1996; Luong et al., 1996; Picot et al., 1994). Le domaine EGF forme avec le domaine catalytique l'interface du dimère. Le domaine EGF joue un rôle dans l'intégration du PGHS mature dans la couche bilipidique (Picot and Garavito, 1994). Le domaine MBD contient quatre courtes hélices consécutives à caractères amphipatiques. Certains acides aminés aromatiques et hydrophobes émergent de ces hélices et forment une surface hydrophobe qui est responsable de l'interaction avec une seule face de la bicouche lipidique (Picot et al., 1994). Ces hélices entourent une ouverture par laquelle les substrats d'acides gras et les NSAID entrent dans le site actif de la cyclooxygénase. Les domaines MBD de PGHSs représentent le premier exemple du mécanisme d'intégration monotypique dans les membranes biologiques. Le domaine catalytique occupe la place la plus importante des isoformes de PGHSs (Picot and Garavito, 1994). Il possède une activité peroxydase (POX) hème dépendante semblable à celle des myéloperoxydases des mammifères (Picot and Garavito, 1994; Picot et al., 1994) et une activité cyclooxygénase. Le site actif de POX se loge dans le sillon majeur situé du côté opposé de MBD et le site actif de COX fait partie du canal hydrophobique s'étendant du MBD jusqu'au centre du domaine globulaire (Picot et al., 1994).

II. 4) Enzymologie des COX, effets des NSAIDs :

Les PGHSs catalysent deux réactions enzymatiques successives : une réaction de cyclooxygénase (bis-oxygénase) durant laquelle l'arachidonate est converti en PGG₂ et une réaction peroxydase durant laquelle PGG₂ est réduit en PGH₂. Les deux PGHS-1 et-2 possèdent une vitesse de conversion catalytique (cyclooxygenase turnover number) similaire (3500 mol d'arachidonate/min/mol de dimère) (Kulmacz et al., 1994). Les valeurs de Km pour l'arachidonate (Barnett et al., 1994) et pour l'O₂ (Lands et al., 1978) sont presque identiques pour les 2 enzymes. Les exigences des peroxydes et la spécificité des substrats d'acides gras sont légèrement différentes

entre les deux enzymes (Capdevila et al., 1995). Dans le contexte général, ces deux enzymes sont presque identiques du point de vue catalytique. Le mécanisme de la catalyse enzymatique se produit en plusieurs étapes. L'étape clé est la formation d'un radical arachidonyl suite à une élimination de l'hydrogène-13S de l'acide arachidonique (Tsai et al., 1995). La deuxième étape produit la PGG₂, suite à une série de réaction d'addition d'O₂ au niveau des carbones C-11 et C-15. Finalement l'activité peroxydase réduit le groupe 15-hydroperoxyde de la PGG₂ en un alcool la PGH₂. La réaction de cyclooxygénase dépend entièrement de la présence d'un hydroperoxyde (Kulmacz et al., 1994). Au départ un peroxyde d'alkyl ou un peroxydinitrite résultant d'une réaction de condensation entre un oxyde nitrique et un peroxyde (Landino et al., 1996) oxyde premièrement l'hème ensuite un groupement Tyr-385 adjacent situé dans le site actif de la cyclooxygénase (Karthein et al., 1988). Le tyrosyl résultant soustrait l'hydrogène-13S de l'arachidonate. Les NSAIDs entrent en compétition avec l'acide arachidonique pour la liaison au site actif de la cyclooxygénase, et provoquent l'inhibition de l'activité cyclooxygénase sans toucher à l'activité peroxydase. Donc les sites actifs de cyclooxygénase et de peroxydase sont physiquement et fonctionnellement séparés. Arg-120 un résidu clé du site actif agit comme un counterion pour le groupe carboxylate de l'arachidonate et des NSAIDs classiques. Tyr-355 se trouve sur le côté opposé de Arg-120 et gouverne la stéréospécificité des PGHSs pour les NSAIDs. Ser-530 est le site d'acétylation du PGHS de poulet par l'aspirine, cette acétylation interfère avec la liaison de l'arachidonate au site actif de PGHS-1. Une caractéristique finale de la catalyse cyclopentane est l'inactivation par suicide (suicide inactivation). L'addition de l'acide arachidonique à des préparations contenant de PGHSs produit un saut transitoire de la consommation de O₂ grâce à la formation de PGG₂ (Kulmacz et al., 1994). Le déclin rapide de l'activité oxygénase n'est pas du à l'inhibition du produit mais est causée par un mécanisme basé sur l'inactivation de l'enzyme (Hemler and Lands, 1980). En moyenne, chaque cyclooxygénase consomme 400 molécules d'acides arachidonique avant quelle soit inactivée par suicide (Kulmacz et al., 1994). L'explication de ce phénomène est inconnue. Il peut impliquer des réactions de

crosslinking intramoléculaires qui produisent des intermédiaires radicaux comme l'intermédiaire II. L'inhibition de l'activité de COX par NSAIDs a été sujette à des études très détaillées (Munroe and Lau, 1995; Smith WL, 1994). La liaison des NSAIDs au site actif de COX-1 et -2 a été étudiée d'une façon très approfondie, même de nombreuses structures cristallines du complexe PGHS/NSAID ont été déterminées (Kurumbail et al., 1996; Loll et al., 1995; Luong et al., 1996; Picot et al., 1994). Les NSAIDs sont divisés en deux classes: les NSAIDs classiques de nature non spécifique, ils inhibent l'activité des 2 isoformes de COX, et les inhibiteurs sélectifs de COX-2, et leurs modes d'action diffèrent selon le type de NSAID utilisé. En général ils entrent en compétition avec l'acide arachidonique pour la liaison au site actif de COX et agissent d'une façon réversible avec une affinité variable (ibuprofen, flurbiprofen), où ils provoquent des modifications au niveau du site actif (acétylation du ser530 par l'aspirine) (Dewitt, 1999; Munroe and Lau, 1995).

II. 5) Les récepteurs aux prostanoides :

Les cinq types de prostaglandines (PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGD_2 , PGI_2 et TXA_2) générés par la voie de la cyclooxygénase sont rapidement secrétés à l'extérieur de la cellule où elles vont fonctionner comme des hormones pour réguler différents phénomènes physiologiques (Fig.5). Ces métabolites agissent au niveau des tissus qui les ont synthétisé en liant des récepteurs spécifiques désignés récepteurs aux prostaglandines. Récepteurs EPs pour PGE_2 et FP, DP, IP, et TP pour $PGF_{2\alpha}$, PGD_2 , PGI_2 et TXA_2 respectivement (Coleman et al., 1994; Narumiya et al., 1999). Ils ont été caractérisés suite à des essais pharmacologiques incluant des essais de contraction vs relaxation sur divers types de muscles lisses et durant l'agrégation plaquettaire (Kennedy et al., 1982). Ils sont répandus dans presque tous les tissus corporels, mais la distribution exacte reste encore à déterminer. Chaque type de prostaglandine lie avec une grande affinité son récepteur spécifique. Il existe aussi une réactivité croisée entre un prostanoidé donné et les autres types de récepteurs. Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (Coleman et al.,

1994; Kolakowski, Jr., 1994; Narumiya et al., 1999). Les études phylogénétiques ont placé les récepteurs des prostaglandines dans le groupe V de la famille A (Kolakowski, Jr., 1994). L'homologie entre la structure primaire en acides aminés des récepteurs est de 20%-30% et à peu près 65 résidus d'acides aminés sont conservés entre les récepteurs des prostanoïdes. Les ARNm de certains types des récepteurs possèdent un épissage alternatif e.g., TP, FP, EP₁ et EP₃ (Pierce and Regan, 1998).

II. 6) La prostaglandine E₂ et les récepteurs à la PGE₂ :

La PGE₂ est le produit majeur du métabolisme de l'acide arachidonique par la cyclooxygénase. Elle peut avoir des effets physiologiques multiples et parfois opposés sur un tissu donné. Elle est impliquée dans la relaxation et la contraction des muscles lisses (homéostasie vasculaire), l'ovulation et la fertilisation, le remodelage osseux, la génération de la fièvre, la protection de la muqueuse gastro-intestinale et l'inflammation. Ces différents effets physiologiques de la PGE₂ sont dus à la présence de plusieurs sous-types de récepteurs qui lient spécifiquement la PGE₂. Leur présence a été démontrée par clonage moléculaire. Chacun de ces récepteurs est le produit d'un gène distinct. Ils sont désignés EP₁, EP₂, EP₃ et EP₄ selon leur réponse à une variété d'agonistes et d'antagonistes (Coleman et al., 1994) (Fig.5) (Tab.1,2). L'épissage alternatif de EP₁ et EP₃ produit plusieurs variants au niveau C-terminal. Tous ces récepteurs lient la PGE₂ d'une façon uniforme avec une affinité supérieure à ceux des autres types de prostanoïdes. Parmi ces sous types de récepteurs EP₃ et EP₄ sont les plus répandus dans l'organisme humain et ils sont détectés presque dans tous les tissus du corps (Coleman et al., 1994; Narumiya et al., 1999) . EP₁ provoque la constriction des muscles lisses, son effet physiologique est médié par une activation de la phospholipase C (PLC), phosphatidyl turnover et une augmentation significative du calcium intracellulaire. L'activation de EP₂ stimule l'augmentation de l'AMPc cytoplasmique via la stimulation de la protéine G (G_{as}) sensible au toxine cholérique, son effet physiologique se traduit par une relaxation

des muscles de la trachée. EP₃ est un constricteur des muscles lisses, il est couplé au protéinus Gi dont l'activation provoque l'inhibition de la synthèse de l'AMPc. L'activation du récepteur EP₄ induit une augmentation de l'AMPc, il fonctionne d'une façon similaire à EP₂ en activant l'adénylate cyclase via G_{us} (Coleman et al., 1994). L'ADNc du récepteur EP₄ humain code un polypeptide de 488 acides aminés ayant un poids moléculaire d'environ 53 kDa. Ce récepteur est exprimé dans une grande majorité de tissus incluant les reins, l'os et le cartilage. C'est un puissant vasodilatateur et il joue un rôle clé dans la fermeture prénatale du ductus arteriosus.

II. 7) Récepteurs couplés aux protéines G :

Les récepteurs composés de sept segments transmembranaires couplés à la protéine G (GPCR) représentent la superfamille des protéines la plus large dans le corps. Plus de 1000 GPCR différents ont été identifiés jusqu'à date (Kolakowski, Jr., 1994). Les ligands endogènes de ces récepteurs ont une diversité chimique remarquable. Ils peuvent être des amines biogéniques, des peptides, des glycoprotéines, des lipides, des nucléotides, des ions et des protéases. De plus la sensation exogène des stimuli comme la lumière, l'odorat et le goût est médiée via cette classe de récepteurs (Hoon et al., 1999; Kolakowski, Jr., 1994). Leur nom GPCR dérive du fait que lorsqu'ils sont actifs, ils médient leur signal via le recrutement et la régulation de l'activité des protéines G hétérotrimériques intracellulaires. Les protéines G hétérotrimériques sont composées de trois sous unités: la sous unité α qui possède un site de liaison pour le nucléotide guanine, et les sous unités β et γ qui forment un dimère $\beta\gamma$ très stable (Radhika and Dhanasekaran, 2001). Le GPCR agit au niveau de la protéine G hétérotrimérique comme un facteur d'échange du nucléotide guanine (guanine nucleotide exchange factor GEF) (Bourne et al., 1991). Une fois activé par son ligand, le récepteur induit un changement conformationnel de la sous unité α provoquant le remplacement du GDP ($G_{\alpha-GDP}$) par du GTP ($G_{\alpha-GTP}$). Ensuite la forme $G_{\alpha-GTP}$ se dissocie du récepteur ainsi que le dimère $\beta\gamma$ pour aller moduler plusieurs voies de signalisation cellulaire incluant la

stimulation ou l'inhibition de l'activité des adénylate cyclases, l'activation des phospholipases et la régulation de l'activité des canaux calciques (Hamm, 1998). Tous les GPCR sont formés de sept hélices transmembranaires reliées par des segments intra et extracellulaires. La partie N-terminale du récepteur est située dans la partie extracellulaire et la partie C-terminale est située dans la partie intracellulaire (Probst et al., 1992). Les GPCR sont regroupés en trois sous-familles: la famille A, affiliée au récepteur rhodopsine et le récepteur β 2-adrénergique, engendre les récepteurs aux eicosanoïdes. la famille B du récepteur du glucagon et la famille C affilié aux récepteurs métabotropiques neurotransmetteurs (Kolakowski, Jr., 1994). Le mécanisme d'activation des GPCR est très complexe. mais la liaison du ligand approprié reste l'étape clé dans le déclenchement du signal activateur. D'autres phénomènes comme la dimérisation (Hall et al., 1999; Hebert et al., 1996), l'endocytose, l'internalisation et la séquestration du récepteur sont présents (Koenig and Edwardson, 1997), mais leur implication exacte est encore mal connue. La terminaison du signal est un autre phénomène très important et peu connue qui nécessite pour certain type agoniste-spécifique la présence des GRKs qui phosphorylent le récepteur et provoquent sa désensibilisation (désensibilisation homologue) (Hausdorff et al., 1990), et pour un autre type non agoniste-spécifique la désensibilisation se produit grâce à la phosphorylation du récepteur par PKC ou par PKA activé suite à l'élévation du AMPc intracellulaire (Bouvier et al., 1988).

CHAPITRE III

III. 1) Expression des gènes et voie post-transcriptionnelle :

Le flux de l'information génétique dans toutes les cellules passe de l'ADN vers l'ARN pour mener finalement à la protéine. Même pour les gènes dont la régulation est très simple, plusieurs évènements doivent passer d'une façon précise pour générer une protéine efficace et active. Par conséquent, les cellules ont adopté

un système d'expression génique qui achemine le transcrit nouvellement synthétisé à travers un complexe multimérique ARNm-protéine qui va promouvoir l'épissage, la polyadénylation, le transport nucléaire, la traduction et la dégradation ultérieure de l'ARNm en question. Le contenu protéique des cellules est déterminé selon plusieurs niveaux de contrôle (transcriptionnel et post-transcriptionnel), et par l'intermédiaire de la dégradation sélective par le protéasome. Le mécanisme de régulation agissant sur le niveau de l'ARNm est beaucoup plus économique et est dépendant de sa stabilité, de sa localisation cellulaire et de l'efficacité de sa traduction. La biosynthèse d'un ARNm compétent (Fig.6a), au niveau traductionnel nécessite l'initiation et le démarrage de plusieurs processus par l'ARN polymérase II (Proudfoot, 2000). Ces événements sont immédiatement suivis par des modifications structurales caractérisées par l'addition d'une coiffe 7-méthylguanosine à l'extrémité 5', et une queue poly (A) à l'extrémité 3' par la poly (A) polymérase. Ces deux modifications sont des déterminants cruciaux des mécanismes de transport extracellulaire, de la traduction et de la longévité de l'ARNm dans la cellule.

III. 2) Dégradation des ARNms dépendante de la queue poly (A) :

L'initiation de la voie de dégradation des ARNms chez les eucaryotes et les levures est caractérisée par la dégradation de la queue poly (A) (Fig.6b). Chez les levures des nucléases poly (A) (Pan2/pan3) vont dégrader la queue poly (A) dans le noyau (Brown and Sachs, 1998). L'activité de ce complexe dépend des protéines liant spécifiquement la queue poly (A). Ce complexe de nucléases peut aussi participer au processus de déadénylation se produisant dans le cytoplasme (Boeck et al., 1996; Tucker M and Staples RR, 2001). L'enlèvement de la queue poly (A) déclenche le clivage de la coiffe 5' par les enzymes de décoiffement, ex : Dcp1 (Beelman CA and Caponigro G, 1996; LaGrandeur and Parker, 1998). L'étape finale consiste en une dégradation totale de l'ARNm par des nucléases 5' et 3' (Anderson and Parker, 1998; Hsu and Stevens, 1993). Chez les mammifères, les nucléases poly (A) spécifiques appelées PARN (Ribo Nucléase Poly (A)) initient le

processus de dégradation mais les étapes qui suivent sont encore mal connues (Korner and Wahle, 1997; Korner et al., 1998). L'enlèvement de la coiffe s'avère une étape importante dans le processus de turnover des ARNm des mammifères: un enzyme de décoiffement a été cloné et récemment il a été trouvé que la queue poly (A) avait la possibilité d'inhiber le processus de décoiffement des ARNm provenant des extraits cellulaires Hala (Gao et al., 2001). Il a été démontré que PARN peut interagir directement sur la coiffe 5' et cette interaction stimule l'activité des déadénylases in vivo et in vitro (Dehlin et al., 2000). La queue poly (A) inhibe la dégradation des ARNm en recrutant des protéines liant spécifiquement la queue poly (A) (PABP). PABP à son tour interagit avec une région spécifique du facteur d'initiation de la traduction eIF4G et forment un complexe ternaire avec eIF4E (cap-binding protein) (Gingras AC and Sonenberg N, 1999). Ce complexe circularise le message et le stabilise en bloquant l'accès aux enzymes de déadénylation et de décoiffement (Wells SE and Vale RD, 1998).

III. 3) Traduction vs turnover de l'ARNm :

Il est devenu de plus en plus convaincant que la traduction et la dégradation de l'ARNm sont deux phénomènes étroitement liés. L'inhibition de la traduction déstabilise les ARNm (Schwartz and Parker, 1999). Mais l'inhibition de la traduction avec des produits chimiques comme la cycloheximide induit la stabilisation des des ARNm (Beelman and Parker, 1994). Il est probable que l'interaction des facteurs d'initiation avec l'ARNm est réduite durant le phénomène d'élongation ou de terminaison, ce qui rend l'ARNm beaucoup plus accessible aux facteurs de dégradation. Le rôle de la traduction sur la stabilité de l'ARNm a été mis en évidence par des études de ciblage géniques. Les mutations introduites dans le gène PAB1 provoquent un décoiffement prématuré de l'ARNm (Caponigro and Parker, 1995). Et celles introduites dans les gènes de eIF4E et eIF4G accélèrent le processus de déadénylation et de décoiffement (Schwartz and Parker, 1999). Ainsi

l'interaction de eIF4E recombinant inhibe le décoiffement l'ARNm en bloquant l'accès de Dcp1 à la coiffe (Schwartz and Parker, 2000).

III. 4) Dégradation ARE dépendante des ARNms :

La régulation de la stabilité des ARNms est un facteur essentiel dans la régulation de l'expression des gènes, en particulier ceux exprimés d'une façon transitoire et nécessitant des niveaux des ARNms fortement contrôlés. Les ARNms de certains gènes exprimés d'une façon transitoire comme ceux des cytokines, des lymphokines, de la cyclooxygénase-2 et des facteurs de transcriptions possèdent une demi vie très courte. Ceci est dû à la présence des séquences AU-riche (ARE) dans la partie 3'-UTR des ARNms des gènes en question (Chen and Shyu, 1995). Les séquences ARE facilitent le phénomène de déadénylation et par la suite la dégradation de l'ARNm (Ford et al., 1999; Peng et al., 1998). La taille des séquences AU-riche varie entre 50 et 150 nucléotides. Elles contiennent une ou plusieurs répétitions du pentamère AUUUA ou du nonamère UUAUUUA (U/A) (U/A). Généralement les AREs sont regroupés en 2 types de séquences non-AUUUA, et AUUUA. Le groupe AUUUA est subdivisé en 2 classes (classe I. c-fos et classe II, GM-CSF) dont la différence réside dans le mode de régulation et de déadénylation (Chen and Shyu, 1995) (Tab.3). Le rôle primaire de ARE est de promouvoir la dégradation sélective des ARNms (Peng et al., 1996). Le processus de dégradation est aussi régulé de telle façon qu'en présence de conditions de stress ou de stimulation cellulaire les ARNms contenant des séquences ARE sont stabilisés. Un ensemble de protéines liant spécifiquement les séquences ARE a été identifié, il inclus AUF1/hnRNPd, HuR, TIA-1, et tristetraproline (TTP). La liaison de ces facteurs sur les ARNms contenant des ARE peut avoir des effets positifs ou négatifs sur divers processus comme la stabilité, la traduction et la localisation cellulaire des ARNms (Fig.6c). Ainsi HuR stabilise certains gènes contenant des AREs in vivo et in vitro. Par contre, la liaison de AUF1 contribue à la déstabilisation de l'ARNm durant les conditions normales, et augmente leur stabilité des ARNms durant les conditions de

stress comme celui du choc thermique. TTP déstabilise les transcrits des gènes de TNF- α et GM-CSF qui normalement contiennent des AREs dans leurs ARNms.

III. 5) Pathologie et stabilité des ARNms :

Plusieurs gènes importants sur le plan clinique ont un mode de régulation basé sur la stabilité de leurs ARNms. Par conséquent, un mauvais contrôle de la stabilité du transcrit a été relié au développement de plusieurs maladies. Ainsi la régulation post-transcriptionnelle représente actuellement un point saillant du contrôle de l'expression des gènes dans les différents types de tumeurs. Plusieurs facteurs de croissance et cytokines liés au développement des tumeurs et à l'angiogenèse possèdent des séquences AREs dans la partie 3'-UTR de leurs transcrits. Ainsi une augmentation accrue de la stabilité des ARNms par la famille des protéines ELAV (HuR) a été trouvée chez les neuroblastomes (Nabors et al., 2001) et les troubles d'origine inflammatoire comme l'arthrite chronique. Chez les gliomes malins la surexpression du ARNm de VEGF se fait par un mécanisme de stabilisation (Ikeda et al., 1995). Aussi la stabilisation de l'ARNm de TNF- α dans les cellules cancéreuses d'origine épithéliales contribue au phénomène de résistance acquis de ces cellules aux effets cytolytique de TNF- α exogène (Wang E and Ma WJ, 1997). Le gène iNOS est surexprimé par les stimuli immunologiques et inflammatoires. Il fait partie de la réponse antimicrobienne et anti-tumorale des macrophages mais il peut avoir des conséquences pathologiques suite à une production accrue de NO comme l'endommagement tissulaire surtout observées dans l'arthrite et le diabète de type I. L'ARNm de iNOS possède dans sa partie 3'-UTR des séquences AREs. Et il a été démontré que l'expression de iNOS suit un modèle majoritairement post-transcriptionnelle (Carpenter et al., 2001). Finalement l'accumulation du précurseur de la protéine amyloïde (APP) un facteur clé dans l'étiologie de la maladie Alzheimer est due à une stabilisation de l'ARNm de l'APP par le complexe hnRNPc (Rajagopalan et al., 1998).

CHAPITRE IV

IV. 1) Cascades de signalisation de la famille MAPK des mammifères :

La réponse des cellules aux signaux extracellulaires, se traduit par la transmission des instructions intracellulaires dans le but de coordonner une régulation appropriée des gènes cibles. Chez les cellules eucaryotes, la phosphorylation des facteurs intracellulaires aboutissant à la transcription des gènes cibles est un mécanisme universel pour telles voies de transmission du signal. La voie de signalisation MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) représente le mode de régulation le plus prépondérant chez les cellules eucaryotes. Ce sont des enzymes conservés durant l'évolution, dont le rôle est de connecter par phosphorylation successive les récepteurs membranaires à des cibles régulatrices critiques dans la cellule. Les MAPKs des mammifères sont activées par une grande panoplie de stimuli agissant via diverses familles de récepteurs, incluant les récepteurs tyrosines kinases (e.g., EGFR récepteur au facteur de croissance épidermique, FGFR récepteur au facteur de croissance des fibroblastes), les récepteurs aux cytokines (TNFR, IL-1 β R,...), les récepteurs couplés aux protéines G pour certains peptides vasoactifs (ANG II, endothéline) (Kyriakis and Avruch, 1996; Marshall, 1995). Une fois activée cette voie de signalisation régule plusieurs processus physiologiques comme la prolifération, la différenciation, le développement, l'inflammation et l'apoptose. L'activation de toutes les voies de signalisation MAPKs se fait selon une hiérarchie précise, elle est représentée par un module de signalisation central rangé en trois étages. Selon cette hiérarchie les MAPKs sont activées par une cascade de phosphorylation concomitante des résidus Tyr et Thr localisés dans des motifs conservés au sein de la boucle d'activation du sous-domaine VIII du domaine kinase de l'enzyme. Toutes les MAPKs possèdent des caractéristiques communes : 1) Les MAPKs sont des prolines-directed-kinases (la reconnaissance du résidu Tyr ou Thr à phosphoryler se fait grâce à un résidu proline adjacent). 2) Certains composants de signalisation peuvent avoir plusieurs rôles biologiques et peuvent interagir avec

différents complexes de signalisation ainsi qu'ils peuvent être régulés de différentes façons. 3) L'organisation de la cascade de signalisation se fait par l'intermédiaire des protéines d'échafaudage. 4) L'activité de la MAP3K est régulée par phosphorylation, oligomérisation et recrutement à la membrane. Chez les humains, la cascade des MAPK est représentée par trois grands groupes régulés d'une façon différente : ERK1/2, JNK et p38 MAPK.

IV. 2) La voie de signalisation p38 MAPK :

IV. 2. 1) Effets généraux de la voie p38 MAPK :

La voie de signalisation p38 MAPK est impliquée dans la régulation de plusieurs processus biologiques comme la croissance et la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose et les réponses au stress et à l'inflammation (Ono and Han, 2000). Elle est activée par une variété de stimuli extracellulaires incluant les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-17, TNF- α ,...), les prostaglandines (PGE₂), LPS et d'autres facteurs environnementaux comme les chocs thermiques et les radicaux libres (Faour et al., 2001; Ono and Han, 2000) (Fig.7,8). La p38 MAPK a été identifiée d'abord comme étant une kinase phosphorylée en réponse aux endotoxines bactériennes (LPS). Elle est l'homologue mammifère et est associée d'une façon structurale et fonctionnelle à HOG1 la MAPK osmo-sensible de *S. cerevisiae* (Han et al., 1994). Cette kinase est une cible moléculaire de choix pour les composés pyridinyl-imidazol CSAIDS (cytokine-suppressive anti-inflammatory compounds) représentés par le SB203580 (Lee et al., 1994) (Fig.8). La p38 MAPK existe sous 4 isoformes : p38 α et p38 β exprimées d'une façon ubiquitaire, p38 γ se trouve exprimée dans les muscles et la p38 δ dans les poumons et les reins (Jiang et al., 1997; Wang et al., 1997). Le phénomène d'activation de la protéine inclut plusieurs voies de signalisation, la plus connue est son activation par phosphorylation, par les kinases (MKK3/4/6) situées en amont, au niveau des résidus Thr et Tyr spécifiques (Kyriakis and Avruch, 2001). Un autre mécanisme d'activation de la p38 est le MAPKKK indépendant, consiste à la voie de signalisation de TGF- β ou TAB1

un composant de cette voie interagit directement avec p38 et induit son activation (Ge et al., 2002). Ces différents mécanismes de régulation montrent la complexité du phénomène de régulation des MAPKs. Le rôle de la p38 sur la physiologie des cellules se traduit par un effet direct sur la transcription des gènes cibles. Une fois activée par les kinases sus-jacentes la p38 cible plusieurs facteurs de transcription incluant ATF-2, un composant du complexe AP-1 (Activator Protein-1) (Raingeaud et al., 1995), et CREB (Wang and Ron, 1996), MEF-2 (Han et al., 1997). La p38 est une kinase multifonctionnelle dont le rôle ne s'arrête pas au niveau de la transcription. Elle régule d'une façon profonde la traduction, le remodelage chromatinien et l'organisation du cytosquelette. Ces fonctions diverses de la p38 s'expliquent par un ciblage spécifique des kinases clé régulant ces différents processus biologiques dans la cellule. La p38 cible les MSKs qui sont des kinases impliquées dans la phosphorylation et la régulation des facteurs clé du remodelage chromatinien (Caivano and Cohen, 2000; Deak et al., 1998). L'initiation de la traduction nécessite un recrutement du ribosome sur la coiffe N⁷-methylguanosine situé à l'extrémité 5' de l'ARNm. La reconnaissance de la coiffe par le ribosome se fait via le facteur d'initiation eIF-4E dont sa phosphorylation sur Ser-209 augmente considérablement son affinité pour la coiffe. La liaison de eIF-4E phosphorylé à la coiffe promeut une succession d'étapes qui aboutissent au recrutement du ribosome à l'ARNm et à l'initiation de la traduction. MNK1/2 sont les kinases responsables de la phosphorylation de eIF-4E sur Ser-209. Ces kinases sont phosphorylées et activées par la p38 MAPK (Fukunaga and Hunter, 1997; Waskiewicz et al., 1997). En plus la p38 activée phosphoryle des MAPKAP Kinase-2/3 qui à leur tour catalysent la phosphorylation de HSP27 un composant essentiel de la réorganisation des protéines F-actine en fibres de stress (McLaughlin et al., 1996; Stokoe et al., 1992).

IV. 2. 2) Régulation de la stabilité des ARNms :

L'implication de la p38 dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes contenant des séquences AU-riche devient de plus en plus évidente. La stimulation des cellules monocytes et synoviocytes humaines par IL-1 β ou IL-17 provoque une

stabilisation accrue et prolongée de l'ARNm et de la protéine de COX-2 (Dean et al., 1999) (Faour et al., 2003). Cette stabilisation est complètement renversée si ces cellules sont traitées avec des inhibiteurs sélectifs (SB) de la p38, suggérant que durant une réaction inflammatoire les niveaux élevés de COX-2 dépendent essentiellement de la p38. Les études moléculaires ont montré que le phénomène de stabilisation de l'ARNm de COX-2 dépend des séquences AU-riche situées dans la partie 3'-UTR de l'ARNm. Ainsi les études de transfections faites avec des plasmides contenant le gène de la β -globine (gène stable) ou celui de la luciférase fusionnée avec la partie 3'-UTR de l'ARNm de COX-2 présentent un patron de régulation post-transcriptionnelle semblable à celui de l'ARNm de COX-2 et d'une façon p38-dépendante (Dean et al., 1999; Faour et al., 2001; Faour et al., 2003). Ces séquences AU-riche confèrent une instabilité aux ARNms dans les cellules quiescentes et une stabilité dans le cas stimulé. TNF- α une autre cytokine pro-inflammatoire présente un patron d'expression p38 dépendant. Les inhibiteurs de la p38 bloquent l'expression de l'ARNm et la synthèse protéique de TNF- α (Dean et al., 1999; Rutault et al., 2001; Wang SW and Wathen ST, 1999). De la même façon, le gène inflammatoire IL-6 montre un profile de régulation dépendant de l'activation des intermédiaires de la voie p38 MAPK (Miyazawa et al., 1998). Les essais rapporteurs ont montré que la stabilisation de l'ARNm et de la synthèse protéique des gènes IL-6, IL-8, COX-2 et TNF- α est régulé par la p38 via MAPKAPK-2 d'une part et est ARE dépendante d'autre part (Faour et al., 2001; Faour et al., 2003; Lasa et al., 2000; Neininger et al., 2002; Winzen et al., 1999). Les évidences suggèrent que la régulation par la p38 de la stabilité ARE dépendante implique les protéines liant les séquences AREs. Ainsi p38 active TTP par une phosphorylation directe, ce phénomène n'exclut pas l'implication d'autres kinases vu que TTP possède plusieurs sites de phosphorylation (Carballo et al., 1998; Carballo et al., 2001). Le mécanisme par lequel p38 régule l'activité de ces protéines est mal connu. Un modèle suggérait que l'affinité de TTP pour lier ARE dépend de son état de phosphorylation qui est étroitement régulée par la p38. Ainsi TTP non phosphorylée peut se lier aux AREs de l'ARNm de TNF- α et le déstabilise. Une fois phosphorylée par la p38, TTP change

sa localisation cellulaire et diminue son affinité pour ARE (Taylor et al., 1995). En conclusion, la p38 peut réguler la traduction ou la stabilité des ARNms dans plusieurs types cellulaires, en plus elle peut aussi réguler l'expression d'un gène particulier suivant ces deux niveaux post-transcriptionnel et traductionnel e.g., COX-2, dépendant du type cellulaire.

IV. 3) La voie de signalisation SAPK/JNK :

SAPK/JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase) est une famille de kinases activée par les stress environnementaux et inflammatoires (Fig.7). Les activateurs de JNK incluent les cytokines inflammatoires appartenant à la famille de TNF- α , IL-1, ligand CD40, ligand CD27, ligand Fas, récepteur activateur de NF- κ B, ligand RANK, ..., ainsi que les peptides vasoactifs (endothéline et ANG II)(Akiba et al., 1998; Berberich et al., 1996; Bird et al., 1994; Shapiro et al., 1996; Zohn et al., 1995). SAPK est encodée par au moins trois gènes : SAPK α /JNK2, SAPK β /JNK3, SAPK γ /JNK1(Gupta et al., 1996; Kallunki et al., 1994). L'activation et la régulation de la voie SAPK sont très complexes, elles impliquent plusieurs voies de signalisation situées en amont de SAPK. Le signal activateur s'initiant au niveau de la membrane va activer MEKK1 dans une série d'événements impliquant Ras et les GTPases de la famille Rho (Fanger et al., 1997; Russell et al., 1995), MEKK1 activée va à son tour phosphoryler et activer SAPK (Yan M and Deak JC, 2003). Cependant durant une réaction inflammatoire SAPK peut être régulée différemment par les Protéines Adaptatrices qui la couple aux récepteurs de la famille TNF (Liu ZG and Goeddel DV, 2003; Natoli et al., 1997; Reinhard et al., 1997). L'activation de SAPK via cette voie est le point final d'une série d'événements débutant par l'activation du récepteur de TNF. Les récepteurs appartenant à la famille TNF (TNFR) ne possèdent pas une activité enzymatique intrinsèque mais suite à la liaison du ligand, le récepteur recrute des kinases en interagissant avec des protéines accessoires. Ces protéines accessoires nommées TRAFs, TRADD et RIP interagissent entre elles mêmes et avec le récepteur pour recruter et activer des cibles protéiques situées en aval du signal activateur.

SAPK est responsable du recrutement et de l'activation du facteur de transcription AP-1 (activator protein-1) (Karin et al., 1997; Kyriakis and Avruch, 1990). AP-1 est un hétérodimère formé par l'association des facteurs de transcription appartenant à la famille bZIP des facteurs de transcription qui comprennent les facteurs c-Jun et JunD en association avec des membres de la famille fos généralement c-fos et ceux de la famille ATF (CREB subfamily of bZIP transcription factors), généralement ATF-2 qui lient les séquences CRE (CREB response element). Tous les facteurs de transcription bZIP contiennent un domaine leucine zipper qui leur permet de former des homo ou des hétérodimères (Karin et al., 1997). AP-1 peut être un dimère Jun-Jun, Jun-Fos ou Jun-ATF (Karin et al., 1997). Le facteur de transcription AP-1 agit sur des éléments de réponse cis nommés TRE (TPA Response Elements) dans les promoteurs des gènes cibles pour réguler leur transcription. Les dimères AP-1 contenant un membre ATF sont capables de lier des séquences TRE et CRE (Habener JF, 1990; Karin et al., 1997). L'activité transcriptionnelle de AP-1 est régulée par phosphorylation, ainsi SAPK active le dimère AP-1 en phosphorylant le domaine d'activation transcriptionnelle de c-Jun, au niveau des résidus Ser-63 et Ser-73, situé dans sa partie NH₂-terminale (Derijard B and Wu IH, 1994; Kyriakis JM and Nikolakaki E, 1994). ATF-2 peut être phosphorylé et activé par SAPK au niveau des résidus Thr-69 et Ser-71 (Gupta S and Derijard B, 1995). Donc SAPK participe à la régulation transcriptionnelle des gènes dont les séquences promotrices contiennent des séquences TRE en régulant primordialement l'activité transcriptionnelle du complexe AP-1.

IV. 4) La voie de signalisation ERK1/2 (P42/44) :

ERK est la première cascade de signalisation à être identifiée chez les familles des MAPKs et jouant un rôle clé dans la croissance, la prolifération et la survie cellulaire (Pages et al., 1993). Deux isoformes de ERK ont été identifiés et sont connues sous le nom de ERK1/2 ou p42/44 MAPK. Elles sont exprimées d'une façon ubiquitaire (Boulton TG and Robbins DJ, 1991; Boulton TG and Gregory JS, 1990).

ERK (p42/44 MAPK) est activée chez les cellules des mammifères via la stimulation des récepteurs tyrosine kinases, les récepteurs couplés aux protéines G et les intégrines (Widmann et al., 1999) (Fig.7). Les signaux, émanant de ces récepteurs, convergent vers l'activation de la petite protéine-G Ras (small G-protein Ras) qui recrute la protéine kinase Ser/Thr Raf à la membrane cytoplasmique (Kerkhoff and Rapp, 2001). Le signal est amplifié via les kinases sous-jacentes MEK (Hallberg et al., 1994). Selon cette cascade de phosphorylation aboutissant à l'activation de ERK par phosphorylation, MEK agit comme MAPKK et Raf comme MAPKKK de ERK (Todd et al., 1999). À son tour ERK activée phosphoryle plusieurs substrats situés dans tous les compartiments cellulaires. La régulation de l'activité et la longévité du signal activateur émanant de ERK dépendent du jeu des phosphatases qui diminuent radicalement l'efficacité de ERK (Todd et al., 1999). L'importance physiologique de la voie ERK est mise en évidence par les études sur des souris trans-géniques. L'inactivation de Raf ou MEK1 par ciblage génique est létal chez la souris (Pearson et al., 2001). Mais le mécanisme par lequel ERK régule la physiologie cellulaire reste à élucider. ERK peut réguler l'activité des facteurs de transcription appartenant à la famille AP-1 en phosphorylant certains composants du dimère AP-1 comme c-Jun, c-Fos et ATF-2. Mais la pertinence biologique de cette phosphorylation reste à découvrir (Gupta S and Derijard B, 1995). Elk-1, un facteur de transcription qui active c-Fos, est aussi phosphorylé par ERK. L'implication de ERK dans certains processus inflammatoires devient évidente vu que les souris déficientes en ERK présentent une maturation anormale du thymus et une réduction de l'expression des chaînes α et β des cellules T (Egrave et al., 1999). Ceci indique que l'activation de la voie ERK est essentielle pour l'activation des cellules T, et il a été mentionné que cette activation est produite via le facteur de transcription AP-1.

IV. 5) La voie de signalisation NF- κ B :

NF- κ B est un nom collectif qui désigne un facteur de transcription existant sous forme de dimère dont l'activité est inductible par des signaux extracellulaires

liés à l'inflammation, la différenciation, la survie cellulaire, l'apoptose, et durant la régulation des réponses du système immunitaire (Fig.7). Elle peut être activée par une grande variété de stimuli extracellulaires incluant les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β), les bactéries et les LPS, les virus et les protéines virales, les facteurs mitogéniques des cellules B et T, l'ARN double brin ainsi que les stress chimiques et physiques (Ghosh S and Kopp EB., 1998; Miyamoto S, 1995). NF- κ B est un hétéro dimère formé par une combinaison de différents membres appartenant à la famille NF- κ B/Rel. Cinq protéines Rel ont été clonées chez les mammifères NF- κ B1 (p50 et son précurseur p105), c-Rel, RelA (p65) et RelB (Ghosh S and Kopp EB., 1998; Miyamoto S, 1995; Siebenlist U and Brown K, 1994). Toutes ces protéines ont en commun un domaine de 300 a.a hautement conservé appelé domaine d'homologie à Rel (Rel Homology Domain: RHR) comportant 2 domaines immunoglobulin-like (Miyamoto S, 1995). RHR est responsable de la dimérisation, de la liaison à l'ADN et de l'interaction avec les protéines inhibitrices de la famille I κ Bs. L'activité transcriptionnelle des dimères NF- κ Bs varie d'un dimère à un autre (Ghosh S and Kopp EB., 1998). Le dimère le plus abondant et qui se trouvent dans la plupart des cellules stimulées est celui de RelA/ NF- κ B1 (p65/p50) et est connu comme étant le facteur de transcription classique NF- κ B qui stimule le plus la transcription. L'activité transcriptionnelle de NF- κ B est régulée à plusieurs niveaux. Pour fonctionner comme facteur de transcription NF- κ B doit premièrement migrer vers le noyau. Sa rétention dans le cytoplasme est achevée par une interaction directe avec des protéines inhibitrices appelées I κ Bs. La famille des protéines I κ Bs comprend : I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl-3, le précurseur de NF- κ B1 (p105) et NF- κ B2 (p100) (Ghosh S and Kopp EB., 1998; Whiteside and Israel, 1997). Les protéines I κ Bs contiennent plusieurs motifs Ankyrin capables de se lier avidement à RHR et de masquer le signal de localisation nucléaire (SLN) de NF- κ B. L'interaction de I κ B avec NF- κ B provoque la localisation cytoplasmique de ce dernier. Donc I κ B joue un rôle essentiel pour mettre fin au signal activateur de la voie NF- κ B (Ghosh S and Kopp EB., 1998; Whiteside and Israel, 1997). Dans les cellules non stimulées NF- κ B est retenu dans le cytoplasme par une interaction

physique avec I κ B (Arenzana-Seisdedos et al., 1997). La stimulation des cellules provoque une phosphorylation suivie d'une dégradation de I κ B par le protéasome et par la suite la libération de NF- κ B et sa translocation nucléaire pour activer la transcription d'une centaine de gènes cibles. La cascade des étapes aboutissant à la dégradation de I κ B engendre une succession d'évènements qui comprennent la phosphorylation, l'ubiquitination de I κ B et sa dégradation par le protéasome. Ces évènements sont contrôlés par trois complexes multi protéiques très larges; I κ B Kinase (IKK) ou signalsome, I κ B Ubiquitine ligase et le protéasome 26S (Karin M, 2000). NF- κ B joue un rôle essentiel dans la pathophysiologie de RA (Gilston V and Soo CC, 1997). L'analyse, des extraits nucléaires provenant des explants synoviaux des patients RA, montre une activité accrue de liaison à l'ADN de NF- κ B (Asahara H and Ogawa N, 1995) L'initiation, du processus de l'inflammation chronique observé dans RA, est associée avec le développement d'une réponse auto-immune qui progresse vers un phénomène inflammatoire perpétuel. Les évidences expérimentales suggèrent que l'activation de la voie NF- κ B joue un rôle clé durant les étapes d'initiation et de la progression perpétuelle de l'inflammation. Cette implication s'explique par le grand nombre de gènes inflammatoires régulés par NF- κ B. Ainsi l'activation de la voie NF- κ B induit l'expression des gènes : a) des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β) chez les macrophages activées (Miagkov et al., 1998), b) des métalloprotéases (MMPs) (Bond et al., 1998; Vincenti MP and Brinckerhoff CE., 1998) de la cyclooxygénase-2 de iNOS (Pahl HL, 1999) et des molécules d'adhésion chez les synoviocytes humains (Li et al., 2000). La suppression de cette voie provoque l'inhibition de l'expression de plusieurs gènes inflammatoires incluant, IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8, ICAM-1 et VCAM-1 (Bondeson et al., 1999; Makarov SS and Olsen JC, 1997; Miagkov et al., 1998). Bref, la voie NF- κ B est impliquée dans la pathophysiologie de RA en participant au phénomène de déséquilibre des facteurs pro-inflammatoires versus les facteurs anti-inflammatoires dans les articulations RA.

CHAPITRE V

V. 1) Réseau des cytokines (Cytokine Network) :

Les cytokines sont des petites molécules protéiques de poids moléculaires variant entre 8 et 40 kDa. Elles sont secrétées suite à des stress et des réactions biologiques, impliquant le système immunitaire d'une façon spécifique ou non spécifique, comme l'infection et l'inflammation. Ce terme regroupe un ensemble hétérogène de molécules dont certaines sont appelées interleukines (IL, médiateurs agissant entre les leucocytes), lymphokines (médiateurs produits par les lymphocytes), interférons, facteurs stimulant les colonies (CSF), facteurs de nécrose tumorales (TNF) et facteurs transformants de croissance (TGF),...,. La dénomination lymphokines et monokines a été utilisée pour désigner le tissu cellulaire qui les produit. Actuellement le mot cytokine est le plus utilisé du fait que la majorité des cellules nucléées produisent ces molécules et une fois stimulées par ces dernières livrent une réponse biologique adéquate. 150 cytokines et plus ont été identifiées et clonées. À la différence des hormones dont le taux de sécrétion est continu bien que modifié par des signaux physiologiques, les cytokines ne sont pas synthétisées par les cellules au repos mais principalement en réponse à un signal activateur. Contrairement aux hormones, chaque cytokine peut être produite par de nombreux types cellulaires. Ces cytokines agissent sur les cellules cibles en se fixant sur des récepteurs spécifiques de très haute affinité, les concentrations actives étant de l'ordre du nanomolaire (10^{-9} M/L) ou de picomolaire (10^{-12} M/L). Ces récepteurs sont exprimés en très faible densité sur différents types cellulaires ce qui explique les effets pléiotropiques des cytokines. Les cytokines agissent d'une façon autocrine, paracrine ou endocrine pour induire leur signal biologique. Contrairement à leurs récepteurs qui présentent un patron d'expression continu mais régulé, le répertoire des cytokines sécrétées est spécifique pour un tissu donné. Elles sont exprimées d'une façon transitoire en réponse à un stimulus externe dont le plus puissant est une autre cytokine. Un phénomène qui est la base du concept de réseau de cytokines (Cytokine

Network) durant lequel, les cytokines peuvent induire ou inhiber l'expression d'autres cytokines.

V. 2) Cytokines pro-inflammatoires :

Les gènes pro-inflammatoires sont ceux qui induisent une réaction inflammatoire. Le concept de cytokines pro-inflammatoires est basé sur les gènes codant des petites molécules médiateurs de l'inflammation et sont surexprimés durant une réaction inflammatoire par les cytokines. Par exemple, les gènes de la phospholipase type II, la cyclooxygénase-2 et iNOS sont des gènes inflammatoires. Ces gènes codent des enzymes qui catalysent les réactions de synthèse des facteurs impliqués dans l'inflammation comme le facteur activateur des plaquettes (PAF), les leukotriènes, le prostaglandines et NO. Les cytokines IL-1 et TNF sont des puissants inducteurs des molécules d'adhésion nécessaires pour le phénomène d'adhésion des leucocytes au tissu endothélial. En résumé, les cytokines pro-inflammatoires activent les cascades de signalisation qui stimulent l'expression des gènes inflammatoires.

V. 3) Interleukine-1beta (IL-1 β) :

IL-1 β est une cytokine pro-inflammatoire sécrétée par les macrophages et les monocytes activées. Elle participe à élaborer une réponse locale et systémique aux infections, et générer de la fièvre en réponse à un stress immunologique. Elle est aussi responsable de l'activation des lymphocytes et promeut l'infiltration des leucocytes aux sites d'infection (Dinarello, 1998). IL-1 β est la cause principale de l'inflammation aiguë et chronique (Dinarello, 2000). IL-1 β est synthétisée premièrement sous forme d'un précurseur inactif de 31 kDa (proIL-1). Ce fragment clivé par voie protéolytique pour donner la forme active de 17 kDa va être sécrété dans le milieu extracellulaire où il va agir sur le métabolisme des cellules cibles (Hazuda et al., 1988). IL-1 β produit son effet biologique en se liant avec une grande affinité à un récepteur spécifique (IL-1RI) (Fig.8). La cascade de signalisation activée après la liaison du ligand à son récepteur inclut une interaction et

oligomérisation avec d'autres protéines plus particulièrement IL-1RI s'agrège avec la chaîne polypeptidique (IL-1RAcP) déclenchant ainsi la formation d'un complexe de signalisation proximal à la membrane plasmique (Sims, 2002). Ce complexe va activer les voies de signalisation I κ B kinase (IKK) et MAPK (Sims, 2002) pour aboutir à la fin à l'activation des facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B responsable de la régulation de l'expression des gènes cibles (Luheshi, 1998).

V. 4) Interleukine-17 (IL-17) :


Interleukine-17 est une cytokine pro-inflammatoire sécrétée exclusivement par les cellules T activées. Elle a été clonée à partir des hybridomes murins (Rouvier et al., 1993; Zhengbin et al., 1996). Cette famille de cytokines contient 6 cytokines (A, B, C, D, E, F) ayant 20-50% d'homologie entre elles au niveau de la séquence primaire en acides aminés (Starnes et al., 2001). Le mode d'action de IL-17 est encore sujet à plusieurs études dans le but d'élucider son mécanisme d'action et de signalisation. IL-17 interagit avec un récepteur spécifique nommé IL-17R par lequel elle transmet son signal au milieu intracellulaire (Moseley et al., 2003). La régulation des gènes cibles par IL-17 se fait via l'activation d'une gamme de voie de signalisation incluant la voie ERK, JNK, et NF- κ B (Martel-Pelletier J and Mineau F, 2001; Shalom-Barak et al., 1998), aussi IL-17 active d'une façon spécifique la voie p38 MAPK par laquelle IL-17 peut réguler l'expression du gène COX-2 selon un modèle transcriptionnel et post-transcriptionnel (Faour et al., 2003). Cette cytokine représente un intérêt primordial sur le plan clinique car elle occupe une place importante dans la hiérarchie des cytokines pro-inflammatoires impliquées dans l'étiologie des maladies arthritiques. Ainsi IL-17 stimule les macrophages et les monocytes à produire des quantités énormes de cytokines pro-inflammatoire (IL-1 β , TNF- α) (Jovanovic et al., 1998), et les cellules chondrocytes et synoviocytes à sécréter une grande quantité de prostaglandines et des métalloprotéases qui dégradent la matrice cartilagineuse (Benderdour M and Tardif G, 2002; Chabaud et al., 2000).

V. 5) Facteur de nécrose des tumeurs (TNF- α) :

TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire sécrétée par plusieurs types cellulaires incluant les macrophages, les monocytes, les lymphocytes, les kératinocytes et les fibroblastes durant une réaction inflammatoire ou en réponse à une infection et un stress environnemental (Tracey KJ and Cerami A, 1993). Cette cytokine peut provoquer une variété de réponses : elle active les lymphocytes et les leucocytes, elle est impliquée dans la prolifération, la différenciation cellulaire et l'apoptose (Tracey KJ and Cerami A, 1993). La liaison du trimère protéique à son récepteur (TNFR1 ou TNFR2) induit sa trimérisation et le recrutement de plusieurs facteurs associés (TRAFs) (Hsu H and Shu HB, 1996; Vandenabeele et al., 1995) pour former le signalement responsable de l'activation de plusieurs voies de signalisation impliquées dans la modulation des gènes cibles (Fig.9). TNF- α est un puissant inducteur de la voie de signalisation NF- κ B (Karin M, 2000), aussi TNF- α peut activer les voies p38 et JNK (Liu ZG and Goeddel DV, 2003; Natoli et al., 1997). Donc il module l'expression des gènes cibles principalement via l'activation des facteurs de transcriptions NF- κ B et AP-1.

V. 6) Pathophysiologie RA/OA :

L'arthrite rhumatoïde (RA) est une maladie d'étiologie inconnue. Il a été admis que l'étiologie consiste en une présentation anormale des antigènes par les cellules présentatrices d'antigènes (APCs) et l'activation des cellules T autoréactives. Dans ce contexte les cellules T jouent un rôle très important dans le développement de la maladie. Aussi il n'est pas clair si l'activation des cellules T se produit avant l'infiltration et la migration trans-endothéliale ou dans le synovium. La différenciation des APCs nécessite un signal activateur en provenance des cellules T activées. Par la suite, les APCs sont capables d'activer les cellules T nouvellement arrivées d'une façon spécifique ou non spécifique durant une réaction inflammatoire locale. Les cellules T activées amorcent le développement et la progression de la maladie en stimulant les cellules macrophages et synoviocytes à sécréter des



cytokines pro-inflammatoires selon un processus complexe d'évènements impliquant un contact direct cellule-cellule et/ou cellule-humorale. Dans le cas de l'ostéoarthrite le point crucial dans le développement de la maladie consiste en un changement phénotypique des cellules de soutien résidentes dans la jonction articulaire plus particulièrement les chondrocytes, les synoviocytes et les cellules osseuses de l'os souschondral. Certains des synoviocytes acquièrent un phénotype macrophage-like synoviocyte, les chondrocytes se différencient et présentent un phénotype beaucoup plus primitifs. Donc ces cellules seront incapables de maintenir une structure articulaire normale qui se traduit par une faillite structurale de la jonction articulaire (Fig.10).

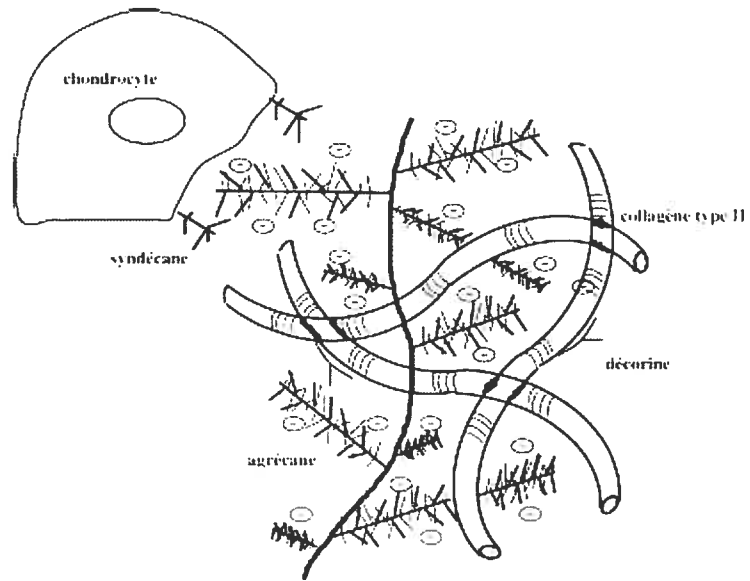


FIG.1A : Représentation schématique de la localisation des trois familles de protéoglycanes présents dans la matrice extracellulaire du cartilage

Agrécan, petits protéoglycane riches en leucine (décorine) et protéoglycanes de surfaces (syndécane) en connexion étroite avec le collagène type II.

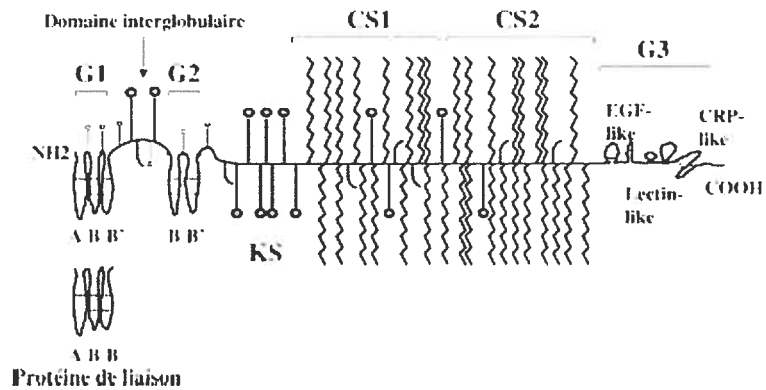


FIG.1B: Structure protéique et carbohydratée de l'agrécane et de la protéine de liaison du cartilage articulaire.

Représentation schématique de la structure protéique et carbohydratée de l'agrécane et de la protéine de liaison du cartilage articulaire. G1, G2, G3 : domaine globulaire; KS : kératane sulfate; CS : chondroïtine sulfate; EGF : epidermal growth factor.

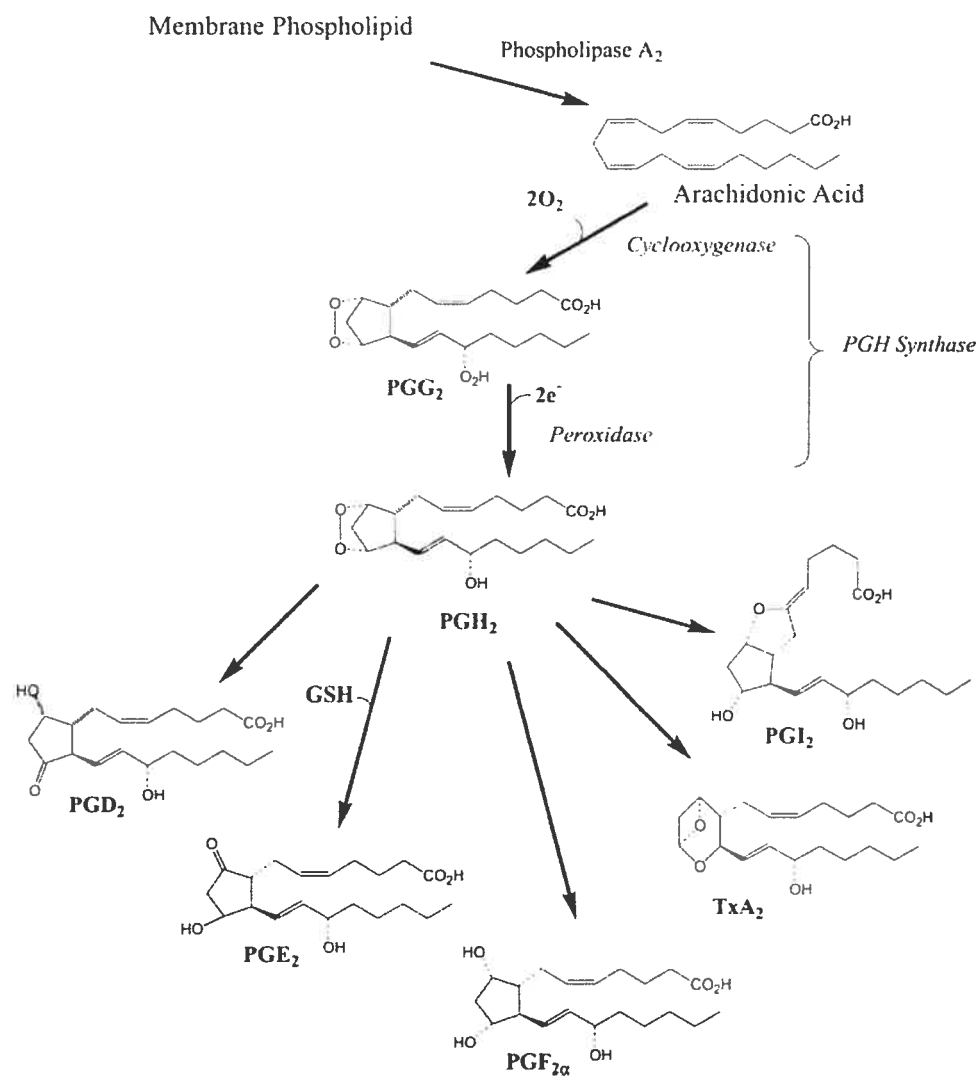


FIG.2 : Voie générale de synthèse des prostaglandines.

L'acide arachidonique libéré par la PLA₂ est converti par l'activité cyclooxygénase en PGG₂ dans une réaction de consommation d'oxygène. PGG₂ est converti en PGH₂ par l'activité peroxydase. Des prostaglandines synthases tissus spécifiques interviennent dans l'étape finale pour former les prostaglandines définitives

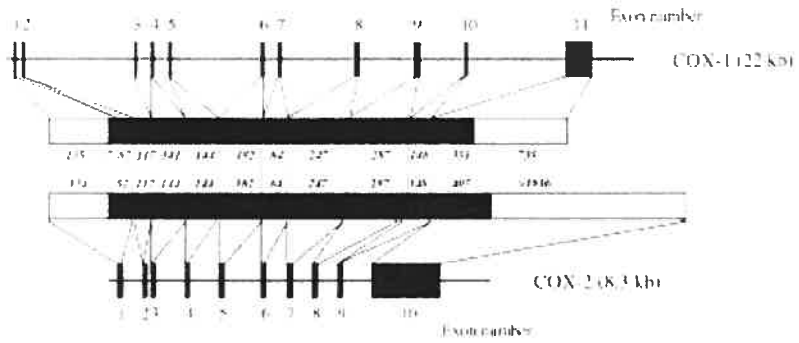


FIG. 3A : Localisation et structure génomique des gènes COX-1 et COX-2 humains

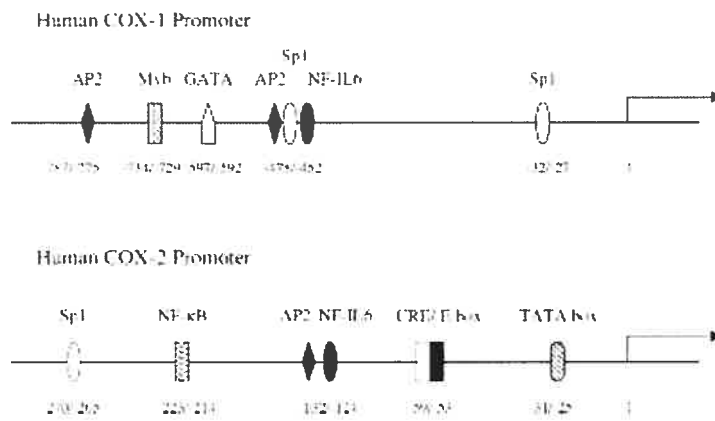


FIG. 3B : Éléments régulateurs cis situés dans la partie 5' des gènes COX-1 et COX-2 humains

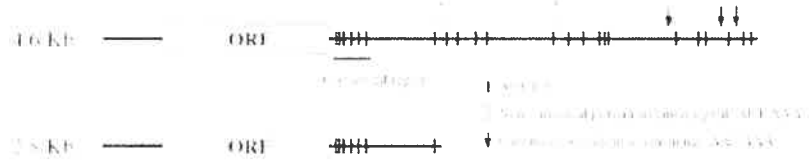


FIG.3C : Représentation schématique de la partie 3'-UTR du gène COX-2 humain

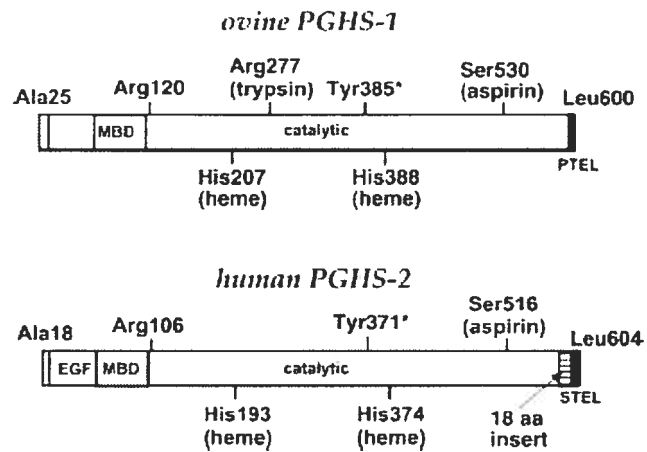


FIG.3D : Représentation schématique de la séquence protéique des deux enzymes COX-1 et COX-2

Diagramme schématique de la séquence protéique des deux enzymes COX-1 et COX-2. EGF (epidermal growth factor-like domain), MBD (membrane-binding domain), PTEL et STEL (ER retention signal).

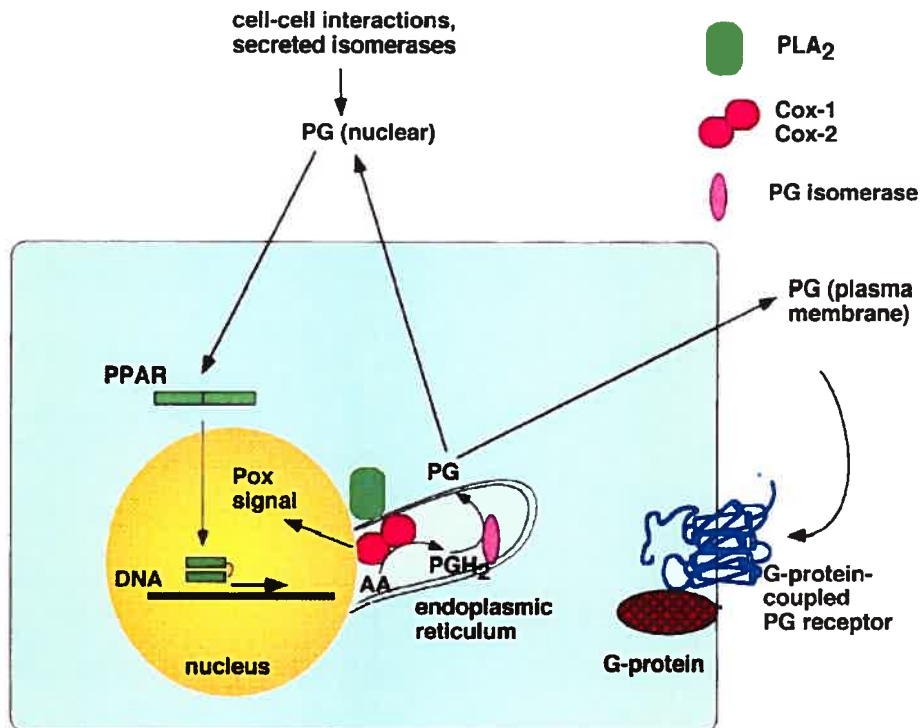


FIG. 4 : Voie d'activation métabolique des isoenzymes COXs

Les isoenzymes de COXs sont activés suite à la translocation nucléaire de la PLA₂ au réticulum endoplasmique et à la membrane nucléaire où elle libère l'AA. Les COXs catalysent la formation de PGH₂ qui va être converti en PG plus stable par l'activité des isomérases tissues spécifiques. Les PGs classiques secrétées à l'extérieur de la cellule e.g., PGE₂, agissent d'une façon autocrine ou paracrine, en se liant à des récepteurs membranaires couplés aux protéines G. les PG nucléaires vont se lier au récepteur PPAR qui va migré vers le noyau pour activer la transcription des gènes cibles.

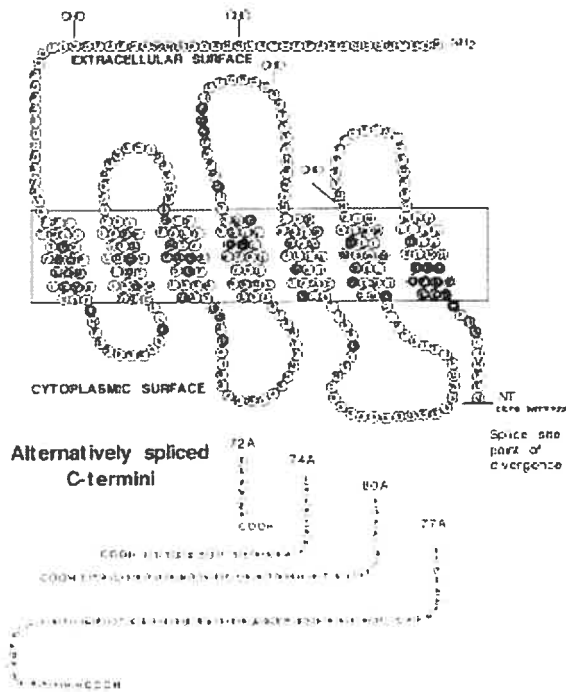


FIG. 5 : Représentation schématique des récepteurs aux prostanoides.

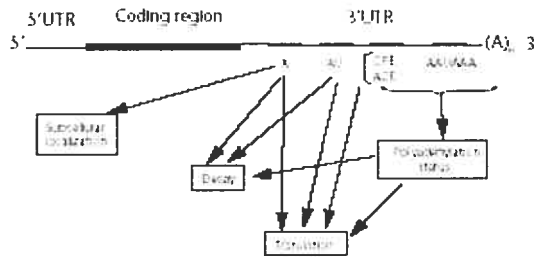


FIG. 6A : Fonctions multiples de la partie 3'-UTR de l'ARNm. CPE (cytoplasmic polyadenylation elements), ACE (adenylation control element).

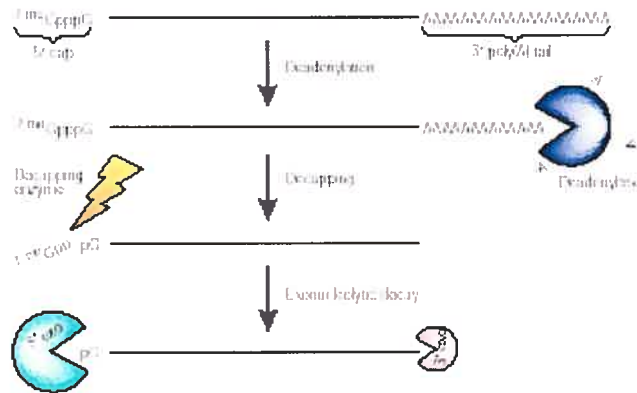


FIG. 6B : Dégradation de l'ARNm dépendante de la déadénylation de la queue poly (A).

Première étape : raccourcissement de la queue poly A par des déadénylase; deuxième étape : l'ARNm déadénylé est décoiffé par des enzymes de décoiffement. L'étape finale est la dégradation rapide de l'ARNm par des exonucléases 5' et 3'

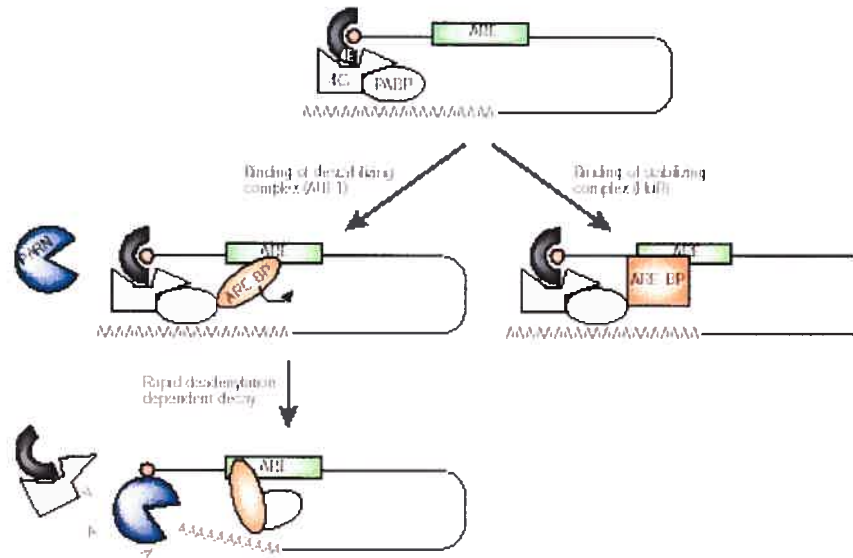


FIG. 6C : Modèle expliquant le phénomène de stabilité et d'instabilité contrôlé par les séquences AU-rich.

L'interaction des éléments AREs avec des facteurs déstabilisants peut provoquer une déadénylation rapide de la queue poly A en réduisant l'affinité de PABP à la queue poly (A). par contre les facteurs stabilisants empêchent la déadénylation en renforçant la liaison de PABP à la queue poly (A).

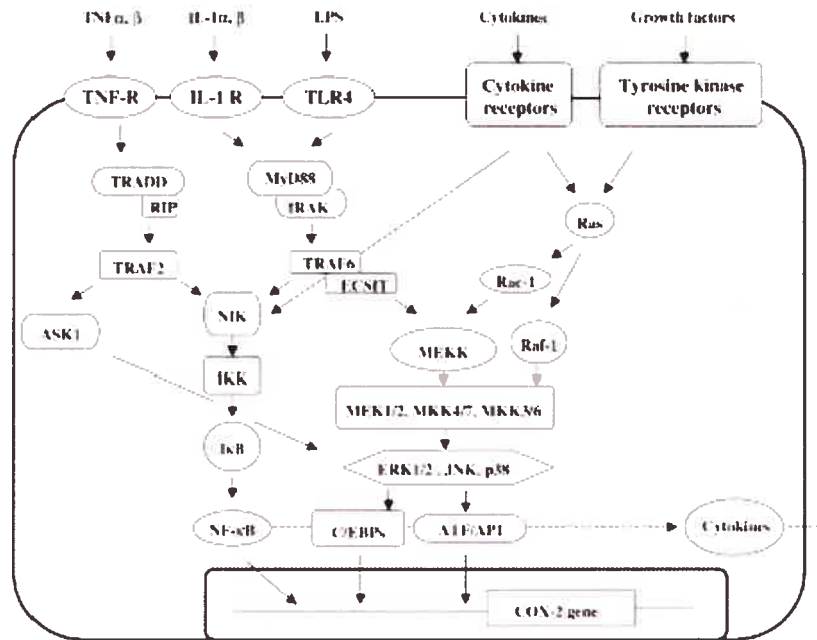


FIG. 7 : Voies générales de signalisation responsables de l'induction du gène COX-2

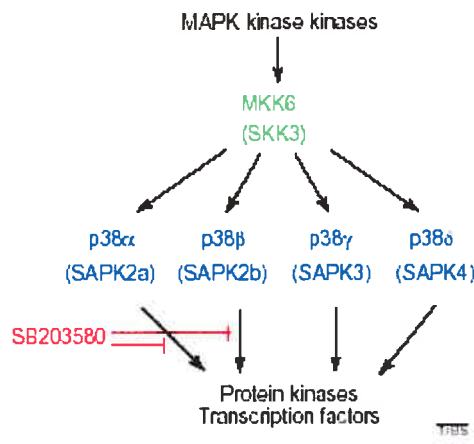


FIG. 8 : Voie de signalisation p38 MAPK, et effet spécifique de SB

Tab.I : Distribution des ARNm des récepteurs aux prostanoides dans les tissus murins

Distribution of prostanoid receptor mRNAs in mouse tissues⁴

Tissue/Cell	EP1	EP2	EP3	EP4
CNS	Neuron ⁹	Neuron Leptomeninges ¹ [34]	Neuron [20]	Neuron ⁹ [34]
PNS	Neuron (DRG)[31]		Neuron (DRG & enteric ganglion) [20]	Neuron (DRG) [34]
Lung				
Heart				
Thymus				Fibrocyte ⁹
Spleen				
Gastrointestinal tract	SM (Muscularis mucosa) [32]		Epithelial cell (Deep layer in stomach SM (Longitudinal layer) [32]	Epithelial cell (Superficial layer) [32]
Kidney	Epithelial cell (Collecting duct) [33]		Epithelial cell (Distal tubule) [33]	(Glomerulus) [33]
Ovary		Theca cell & Granulosa cell [35]		
Uterus	SM ²	Luminal epithelial cell ¹ [36,37]	SM (Longitudinal ² & circular layer ²) [36]	Epithelial cell & Stromal cell [36]
Macrophage				

Tab.II : Phénotypes majeurs obtenus chez les souris déficientes des récepteurs aux prostanoides

Major phenotypes of mice deficient in prostanoid receptors

Disrupted gene	Major phenotypes of knockout mice
EP	Reduced responses in allergic asthma
EP1	Reduction in carcinogen-induced colorectal neoplasia
EP2	Impaired ovulation and fertilization Salt-sensitive hypertension
EP3	Impaired febrile response to pyrogens Impaired duodenal bicarbonate secretion
EP4	Patent ductus arteriosus Decreased inflammatory bone resorption
EP	Parturition failure
IP	Thrombotic tendency, decreased inflammatory swelling Decreased acetic acid writhing
IP	Bleeding tendency

Article 1

Prostaglandin E2 Regulates the Level and Stability of Cyclooxygenase-2 mRNA through Activation of p38 Mitogen-activated Protein Kinase in Interleukin-1 β -treated Human Synovial Fibroblasts*

Wissam H. Faour, Yulan He, Qing Wen He, Manon de Ladurantaye, Maritza Quintero \ddagger , Arturo Mancini, and John A. Di Battista \S

From the Osteoarthritis Research Unit, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hopital Notre-Dame, Montréal, H2L 4M1 Québec, Canada and Rheumatology \ddagger Unit, Department of Medicine, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 276, No. 34, Issue of August 24, pp. 31720–31731, 2001

© 2001 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.
Printed in U.S.A.

Résumé :

Dans les synoviocytes stimulées par interleukin-1 β ou LPS, la voie de signalisation p38 MAPK régule d'une façon transcriptionnelle et posttranscriptionnelle l'expression du gène de la cyclooxygénase-2. Suite à la stimulation des synoviocytes par IL-1 β , l'ARNm de COX-2 est stabilisé selon une boucle de régulation rétropositive. Cette stabilisation dépend essentiellement de l'activation de la p38 MAPK par la prostaglandine-E₂ sécrétée. La stimulation des synoviocytes avec IL-1 β provoque une induction rapide (5 min), grande (>30 fois) et prolongée de l'expression de l'ARNm de COX-2, de la protéine de COX-2 et de la sécrétion de la PGE₂. Cette induction est complètement inhibée par SB202190, un inhibiteur sélectif de la p38 MAPK, et par NS398, un inhibiteur sélectif de l'enzyme COX-2. L'addition de la PGE₂ a complètement renversé l'effet inhibiteur de NS398 mais pas celui de SB202190. D'ailleurs la PGE₂ ne produit pas un effet additif sur l'induction de l'expression de l'ARNm de COX-2 par IL-1 β , de même elle n'active pas la transcription du gène COX-2 dans les cellules quiescentes. Les études de transfections faites avec des plasmides contenant différentes constructions du promoteur du gène COX-2 montrent que la p38 MAPK régule la transcription de COX-2 via le site ATF/CRE. L'effet de la p38 MAPK se synergise avec la cascade de signalisation de l'AMPc, pour activer le promoteur de COX-2. Le niveau d'ARNm de COX-2 dans les synoviocytes préstimulés avec IL-1 β 4h puis lavés et incubés avec du milieu frais, diminue rapidement (< 2h) pour devenir comparable à celui du cas contrôle non stimulé. L'addition de la PGE₂ après le lavage avec du milieu frais, stabilise l'ARNm de COX-2 pour une durée prolongée (16h). Les agonistes des récepteurs EP₂ et EP₃, butaprosté et salprosté respectivement, n'ont aucun effet à cet égard. Dans ces conditions, l'ajout de SB202190 ou un anticorps anti-PGE₂ abolit complètement la stabilisation de l'ARNm de COX-2 dépendante de la PGE₂. Les analyses de délétion faites avec des plasmides chimères contenant la luciférase liée à la partie 3'-UTR de l'ARNm de COX-2 ont montré que IL-1 β stimule la stabilité et la traduction du gène rapporteur via les séquences AU-riche

distales de la partie 3'-UTR. Un processus entièrement dépendant de la boucle PGE₂/p38 MAPK. En se basant sur nos résultats nous concluons que le niveau et la durée de l'induction de l'ARNm de COX-2, de la protéine de COX-2 ainsi que la sécrétion de la PGE₂ suite à la stimulation des synoviocytes avec du IL-1 β , résultent du processus de stabilisation de l'ARNm de COX-2 et de la stimulation de la traduction d'une façon dépendante de la PGE₂. Ce processus comprend une boucle rétro-positve médiée majoritairement par le récepteur EP4 et la p38 MAPK avec une implication mineure de l'AMPc.

Prostaglandin E₂ Regulates the Level and Stability of Cyclooxygenase-2 mRNA through Activation of p38 Mitogen-activated Protein Kinase in Interleukin-1 β -treated Human Synovial Fibroblasts*

Received for publication, May 1, 2001, and in revised form, June 22, 2001
Published, JBC Papers in Press, June 22, 2001, DOI 10.1074/jbc.M101036200

Wissam H. Faour, Yulan He, Qing Wen He, Manon de Ladurantaye, Maritza Quintero[†],
Arturo Mancini, and John A. Di Battista[‡]

From the Osteoarthritis Research Unit, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital Notre-Dame, Montréal, H2T 1M1 Québec, Canada and [†]Rheumatology Unit, Department of Medicine, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela

The p38 MAPK mediates transcriptional and post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA following interleukin-1 β /lipopolysaccharide cellular activation. We explored a positive feedback, prostaglandin E₂ (PGE₂)-dependent stabilization of COX-2 mRNA mediated by the p38 MAPK cascade in IL-1 β -stimulated human synovial fibroblasts. We observed a rapid (5 min), massive (>30-fold), and sustained (>48 h) increase in COX-2 mRNA, protein, and PGE₂ release following a recombinant human (rh) IL-1 β signal that was inhibited by NS-398, a COX-2 inhibitor, and SB202190, a selective, cell-permeable p38 MAPK inhibitor. PGE₂ completely reversed NS-398-mediated inhibition but not SB202190-dependent inhibition. The eicosanoid didn't potentiate IL-1 β -induced COX-2 expression nor did it activate COX-2 gene expression in quiescent cells. Transfection experiments with a human COX-2 promoter construct revealed a minor element of p38 MAPK-dependent transcriptional control after IL-1 β stimulation. p38 MAPK synergized with the cAMP/cAMP-dependent protein kinase cascade to transactivate the COX-2 promoter. When human synovial fibroblasts were activated with rhIL-1 β for 3–4 h (steady state) followed by washout, the elevated levels of COX-2 mRNA declined rapidly (<2 h) to control levels. If PGE₂, unlike EP2/3 agonists butaprost and sulprostone, was added to fresh medium, COX-2 mRNA levels remained elevated for up to 16 h. SB202190 or anti-PGE₂ monoclonal antibody compromised the stabilization of COX-2 mRNA by PGE₂. Deletion analysis using transfected chimeric luciferase-COX-2 mRNA 3'-untranslated region reporter constructs revealed that IL-1 β increased reporter gene mRNA stability and translation via AU-containing distal regions of the untranslated region. This response was mediated entirely by a PGE₂/p38 MAPK-dependent process. We conclude that the magnitude and duration of the induction of COX-2 mRNA, protein, and PGE₂ release by rhIL-1 β is primarily the result of PGE₂-dependent stabilization of COX-2 mRNA and stimulation of translation, a process involving a positive feedback loop mediated by the EP4 receptor and the downstream kinases p38 MAPK and, perhaps, cAMP-dependent protein kinase.

Cellular activation by external proinflammatory stimuli results in, among other responses, increased phospholipid-derived eicosanoid synthesis that is believed to play a cardinal role in the etiology of many immune and inflammatory diseases (1, 2). Additionally, acting locally in an autocrine, autocrine, or paracrine fashion, eicosanoids initiate and modulate cell and tissue responses involved in many physiological processes affecting essentially all organ systems in the human organism (3, 4). Although synthesized through the concerted activity of multiple enzyme systems, the rate-limiting step in the formation of prostanooids is the conversion of arachidonic acid to prostaglandin H₂ by cyclooxygenase (COX)¹ (5, 6). A constitutive and inducible form of COX has been identified, and x-ray crystallographic analysis suggest strongly that they are monotypic, endoplasmic reticulum-associated homodimeric enzymes that possess heme-dependent peroxidase and cyclooxygenase activity (7). The constitutive COX-1 gene has been ascribed a homeostatic function and indeed has a GC-rich house-keeping promoter (8). In contrast, the COX-2 gene (mRNAs 4.6 and 2.8 kb) is rapidly induced by tumor promoters, growth factors, cytokines, and mitogens in many cell model systems (9–11). It behaves much like an immediate-early gene, and its regulation has been shown to occur at both transcriptional and post-transcriptional levels (12–14). In this regard, the COX-2 message has an extensive 3'-UTR having at least two distinct polyadenylation sites and 22 Shaw-Kamen 5'-AUUUA_n-3' motifs (11). The latter sequences are believed to be associated with message instability, translational efficiency, and rapid turnover (15, 16). Furthermore, sequence analysis of the 5'-flanking region has shown several potential transcription regulatory sequences, including a TATA box, a c/EBP motif, two AP-2 sites, 3 SP-1 sites, two NF- κ B sites, a CRE motif, and an Ets-1 site (no AP-1 site) (11). Nevertheless, despite this wealth of structural information, it is still not totally

*The abbreviations used are: COX, cyclooxygenase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; p38, mitogen-activated protein kinase-3; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; PGE₂, prostaglandin E₂; LTP₁, leukotriene P₄; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FCS, fetal calf serum; rhIL-1 β , recombinant human interleukin-1 β ; JNK/SAPK, c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase; ATF-2, activating transcription factor-2; PKA, cAMP-dependent protein kinase; MEK, mitogen-activated protein kinase; 3'-UTR, 3'-untranslated region; ARE, AU-rich element; IL-1, interleukin-1; IL-1 β , IL-1 β gene; TNF α , tumor necrosis factor- α ; HSF, human synovial fibroblasts; PCR, polymerase chain reaction; RT, reverse transcription; OA, osteoarthritis; RFA, rheumatoid arthritis; DMSO, dimethyl sulfoxide; HPLC, high-performance liquid chromatography; T_{1/2}, half-life; NS-398, N-[2-(6-ethoxybenzyl)-4-methylphenyl]piperazine.

This work was supported in part by the Medical Research Council of Canada and the Arthritis Society of Canada. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ To whom correspondence should be addressed: Université de Montréal, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital Notre-Dame, 1560 Rue Sherbrooke Est, Montréal, Québec H2T 1M1, Canada. Tel.: 514-251-0999, ext. 7119; Fax: 514-296-0681.

incubation. Generally, 5 µg of total RNA were resolved on 1.2% agarose-formaldehyde gels and transferred electrophoretically (30 V overnight at 4°C) to Gene-Screen Plus membranes (Amersham Pharmacia Biotech Inc. 57). Transcripts EDTA (TAE) buffer (pH 7.4) after probe hybridization for 24 h hybridization were carried out at 70°C for 24 h followed by high stringency washing at 65°C in 1× SSPE (1× SSPE). The following probes, labeled with digoxigenin-labeled (DIG) 5' end labeling priming, were used for hybridization: Human COX-2 cDNA (1.5 kb) c-myc (Chemical Co.) was cloned into the *EcoRV* site of pDNA1 (Invitrogen) and labeled (CA) and released by *Pst*I and *Xba*I digestion. A 78-bp *Pst*I/*Xba*I fragment was obtained from GAPDH cDNA (2 kb, American Tissue Culture Collection, Manassas, VA). This latter probe served as a control of RNA loading as GAPDH is constitutively expressed. All blots were subjected to a digital imaging system (Alpha Innotech 2990, Cambridge Packard Chemical, Mississauga, Ontario, Canada) for semi-quantitative measurements, and changes in COX-2 expression were always considered as a ratio: COX-2/GAPDH mRNA.

Transfection Experiments.—Transient transfection experiments were conducted in 4- or 12-well cluster plates with HSF as described previously (37). Transfections were conducted using the Fugene 6 (Roche Molecular Biochemicals) or LipofectAMINE 2000 (Invitrogen) kit. To be brief, the method for 6 h according to the manufacturer's protocol with cells at confluence. HSF were re-suspended in culture medium + 10% FCS for 2 h prior to the addition of the biological agents. Transfection efficiencies were controlled by co-transfection with 0.5 µg of pCMV-β-gal, a β-galactosidase reporter vector under the control of cytomegalovirus promoter. The COX-2 promoter (299 bp) and pGL3 plasmid was kindly provided by Dr. Stephen Prescott, University of Utah (9). As were the chimeric luciferase reporter plasmid fused with the entire human COX-2 mRNA (5'-UTR-1471 bp, ATG start, clone no. 1291) of which the first 116 bp contain an ATG start, or a construct completely devoid of the COX-2 5'-UTR but containing the SV40 poly(A) signal (11). The plasmids are designated 116/2-UTR, 116/5'-ARE, 116-Δ27-UTR. The p38, MAPK kinase, MEK1, MEK2, and p38CKA₂ expression vectors were purchased from Stratagene (La Jolla, CA). Luciferase values, expressed as relative light units, were normalized to 1.00 unit of β-galactosidase activity and post-measured per sample for all experiments.

RT-PCR for Luciferase and GAPDH.—The oligonucleotide primers for the polymerase chain reactions (PCR) were prepared with the aid of a DNA synthesis robot (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) and used at a final concentration of 200 nmol/liter. The sequences for the luciferase primers are as follows: 5'-CAAGATTACCAAGGATTTGATGTC-3' and 5'-AGGATTCCTCAGAAACAGGTTTTC-3' (nucleotides for the luciferase fragment of 387 bp) (11). The sequences for the GAPDH (which served as a standard) of quantitative primers are 5'-CAGAGCAATCATCACTGGCTCTG-3' which corresponds to position 694–721 bp of the published sequence and 5'-GGTTGCAAAAGTGGTGTGTTCAAG-3', from position 991–1022 bp, for an amplified product of 318 bp (37). Two µg of total RNA, extracted with the Trizol reagent, was reverse transcribed and then subjected to PCR as described previously (37). RT and PCR assays were carried out with the enzymes and reagents of the GeneAmp RNA PCR kit manufactured by PerkinElmer Life Sciences. Both the RT and PCRs were done in a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

The amplification process was conducted over 19–29 cycles in order to define the linear range of product amplification; the first cycle consisted of a denaturation step at 95°C for 1 min, followed by annealing and elongation at 60°C for 20 s and 72°C for 15 min, respectively. All subsequent cycles were executed under the same conditions, with the exception of the last cycle, where the elongation step was extended to 7 min. We found a linear range of 2–12 linearized GAPDH versus log cycle number between 19–17, as such we chose 11–17 cycles depending on the type of experiment.

The PCR products were analyzed and verified by electrophoresis on 1.1% agarose gels in a Tris-borate/EDTA buffer system as described previously (37). All gel photos were subjected to a digital imaging system (see above) for semi-quantitative measurements, and results were expressed as a ratio of luciferase/GAPDH PCR fragments.

Extraction of Nuclear Proteins and Electrophoretic Mobility Shift Assay Experiments.—Cells in 4-well cluster plates (5 × 10⁶ cells/well) in control and treated cells were carefully scraped into 15 ml of ice-cold phosphate-buffered saline and pelleted by low centrifugation. Nuclear extracts were prepared as described previously (37).

Dend biotinylated oligonucleotides containing consensus and mutant sequences were from GeneAmp biotechnology. In addition, oligonucleotides and were end-labeled with [³²P]ATP using T4 polynucleotide

kinase (Promega, Madison, WI). The sense sequences of the oligonucleotides are as follows: NF-κB p50, 5'-GGC ATG GGG CGA TCC CCG AAG TCC-3'; NF-κB p50 mut, 5'-GGC ATG GGC CGA TCC CCG AAG TCC-3'; ATF-2, 5'-GAT TCA ATG ACA TCA CCG CTTG TGG-3'; ATF-2 mut, 5'-GAT TCA AGA ACA TAG CCG CTTG TGG-3'. Binding buffer consisted of 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 0.5 mM dithiothreitol, 0.5 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 1 µg/ml poly(I) and 1.25 µg/ml poly(U)-60%. Binding reactions were conducted with 15 µg of nuclear extract and 100,000 cpm of ³²P-labeled oligonucleotide probes at 22°C for 20 min in a final volume of 10 µl. Binding complexes were resolved by nucleic acid staining polyacrylamide gel electrophoresis through 6% gels in a Tris-borate buffer system, after which the gels were fixed, dried, and prepared for autoradiography.

Essential Enzyme-Labeled Immunosorbent Assay (ELISA).—Measurements of the principal proinflammatory (IL-1β) HSE were performed by ELISA kits according to the manufacturer's instructions (R & D Systems, Minneapolis, MN). Detection limits for PGE₂, IL1P₁, and IL1β were 39, 3.9, and 7.8 pg/ml, respectively.

RESULTS

Kinetic Paradigm of rhIL-1β Induction of COX-2 Gene in HSF.—Studies in our laboratory (39) indicate that the EC₅₀ for rhIL-1β-dependent COX-2 gene induction in our cell culture system is 5.7 pmol/liter or 100 pg/ml. As such, this concentration was chosen for all subsequent experimentation. Time course studies revealed that increases in COX-2 mRNA expression were detectable within 5 min of 1-fold, reached greater than 10-fold after 1 h, attained steady state at 3–4 h, and thereafter declined very gradually for the next 14 h as shown in Fig. 1, A and B. The COX-2 protein was perceptible within 1 h following stimulation with rhIL-1β and thereafter followed a pattern of de-synthesis closely resembling COX-2 mRNA expression (Fig. 1C). The rhIL-1β-stimulated PGE₂ release profile is also illustrated in Fig. 1D (mean ± SE). The prostanoid levels reached 21 ng per 10⁶ cells after 1 h and 139 ng by 4 h, and by 24 h we detected more than 300 ng per 10⁶ cells. Other arachidonic acid metabolites elaborated by HSE, such as PGI₂ and LTB₄, were also released in higher concentrations after IL-1β-stimulation, however, in both cases, the amounts detected approximated 200 pg/ml per 10⁶ cells (data not shown).

Suppression of rhIL-1β-Induced COX-2 Gene Expression by COX-2 Inhibitors, Role of PGE₂.—We reported (39) that the COX-2 preferential inhibitor NS-398 and its structural analog nimesulide inhibit rhIL-1β-induced COX-2 mRNA expression (maximum ~80% COX-2 protein synthesis, maximum ~80% and PGE₂ release, maximum ~85%) in a dose-dependent manner. The concentrations used represent sub- and therapeutic concentrations. In the present study, when PGE₂ was added to the incubation medium in increasing concentrations along with NS-398 and rhIL-1β, the inhibitory effect of NS-398 on COX-2 mRNA and protein synthesis was completely reversed (Fig. 2, A and B). PGE₂ didn't potentiate the inductive effect of rhIL-1β (Fig. 2A).

It is widely acknowledged that IL-1β and tumor necrosis factor-α (TNF-α) have overlapping proinflammatory effects, activate common signaling cascades, and induce similar target genes (reviewed in Ref. 12). As such we wondered whether TNF-α would also require PGE₂ to modulate the induction of COX-2. Previously, we showed that TNF-α, at physiologically relevant levels (e.g., 1–10 ng/ml or 60–60 pmol/liter), induces COX-2 mRNA expression, COX-2 protein synthesis, and PGE₂ release in HSF (33); here we demonstrate that the induction was not abrogated with the addition of NS-398, and in fact the inductive effect was potentiated with the addition of increasing concentrations of PGE₂ (Fig. 2C). In carefully controlled comparisons of IL-1β versus TNF-α stimulation of COX-2 expression and PGE₂ release in our cell culture system, we observed that IL-1β is at least 15-fold more potent in terms of COX-2 mRNA expression (ratio 16 to 1) COX-2 mRNA normalized to

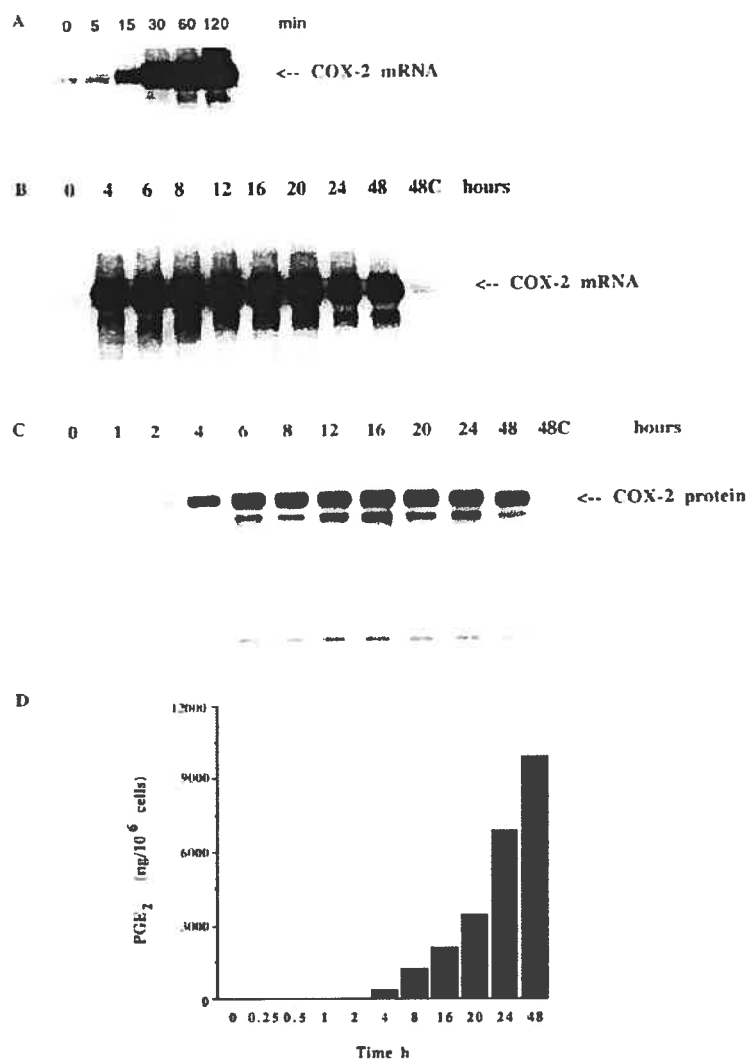


Fig. 1. Time course of rhIL-1 β stimulation of COX-2 mRNA (A and B), COX-2 protein (C), and PGE₂ release (D). Cultured confluent human synovial fibroblasts (HSF-1.2 \times 10⁶ cells/ml) in 6-well plates were preincubated for 24 h in DMEM supplemented with 1% FCS plus antibiotics at 37°C in order to ensure synchronous and quiescent cells. Cells were then treated for varying time (0–48 h) with 57 pmol/l (0.09 μ g/ml) of rhIL-1 β . Media were extracted for protein or RNA. 20 μ g of protein were analyzed for COX-2 protein by Western blotting using a specific polyclonal anti-COX-2 antibody, whereas 20 μ g of total RNA were analyzed for COX-2 mRNA by Northern blot hybridization using a specific 32P-labeled cDNA probe as described under "Experimental Procedures." Cell media supernatant was collected and analyzed by ELISA for PGE₂. Results are expressed as the mean \pm S.D. of parallel experiments performed in duplicate. Interassay coefficient of variation never exceeded 11% when expressed on ng/10⁶ cells.

GAPDH ($n = 3$) and more than 40 times more active with respect to PGE₂ release (0.5 μ g of PGE₂/10⁶ cells/24 h versus 0.15 μ g of PGE₂/10⁶ cells/24 h, $P < 0.05$).

Interestingly, the inflammatory 5-lipoxygenase product LTB₄ could also reverse NSAID-dependent inhibition of IL-1 β -induced COX-2 mRNA expression and protein synthesis, whereas a putative anti-inflammatory prostanoid and PPAR agonist 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ had no effect (Fig. 3). All three arachidonic acid metabolites had absolutely no effect on the COX-2 gene in quiescent, unstimulated cells. The non-selective COX-2 inhibitor indomethacin (0.5–5 μ g/ml) also inhibited rhIL-1 β -induced COX-2 mRNA expression (maximum 80%) and COX-2 protein synthesis (maximum \sim 80%) but in an inverse, dose-dependent manner (Fig. 3). As expected, PGE₂ release was blocked by at least 95% at 5 μ g/ml (data not shown).

ERK1/2 MAP Kinase Activity and PGE₂-dependent Regulation of COX-2 Gene Expression in IL-1 β -stimulated Cells. Previous stud-

ies in our laboratory demonstrate that calcium channel blockers (e.g., verapamil and nifedipine) and reactive oxygen species scavengers (e.g., pGPR-dimethylthiocarbamate, N-acetylcysteine, and L-N^G-l-methyllysine oxyl) either no effect or very modest inhibition of rhIL-1 β -stimulated COX-2 mRNA and protein synthesis (39). In this study, SB202190 (SAIK p38 α inhibitor) suppressed rhIL-1 β -induced COX-2 mRNA and protein synthesis by \sim 80% (78 \pm 9%, mean \pm S.D., $n = 7$) (Fig. 1, A and B). PGE₂ release was suppressed by greater than 95% (data not shown). The MEK1/2 inhibitor PD98059, and the Jnk3 kinase inhibitor, Bay-11-7892 were without significant effect, whereas the PKA inhibitor KT-5720 had modest but consistent inhibitory activity. In order to determine whether the suppressive effect of SB202190 was also dependent on PGE₂ release (as in Fig. 2, A and B), we co-incubated 10–1000 nmol/liter of PGE₂ with SB202190 and rhIL-1 β and found that the cocooned restored about 20–25% (22.08 \pm 2.92%, mean \pm S.D., $n = 5$) of the levels observed with rhIL-1 β alone (Fig. 1C). As such, these

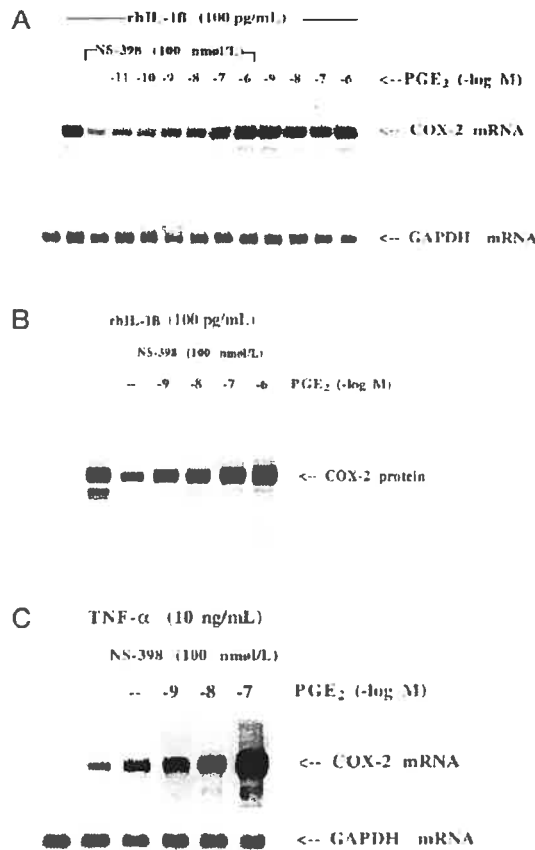


Fig. 2. rhIL-1 β stimulation of COX-2 mRNA (A) and COX-2 protein (B) is PGE₂-dependent. TNF- α stimulation of COX-2 mRNA is PGE₂-independent. C: quiescent HSF were treated with 100 pg/ml (5.7 pmol/liter) of rhIL-1 β (A and B) or 10 ng/ml (1 TNF- α) (C) for 16 h with or without NS-398 (100 nmol/liter) in the absence or presence of increasing concentrations of PGE₂ (10 pmol/liter to 1 μ mol/liter = 500 M). 11 lanes for each figure. Membranes were extracted for protein or RNA and prepared for Western and Northern blotting as described under "Experimental Procedures." Blots are representative of three separate experiments that gave essentially identical results.

results suggested that part of PGE₂-dependent effect (compare Fig. 2, A and B with Fig. 1, A-C) was not affected by the presence of SB202190 (*i.e.*, not p38 MAP kinase-dependent). As such we investigated the cAMP/PKA signaling cascade, which is also potently stimulated by PGE₂ via the prostaglandin EP1 receptor in our cell cultures [11, 17]. We co-incubated the cAMP mimetic rolipram, a cAMP-dependent phosphodiesterase type IV inhibitor, and forskolin, an activator of adenylyl cyclase, with SB202190 in order to examine the role of the cAMP signaling cascade of COX-2 mRNA stability. The levels of COX-2 mRNA were reactive to elevations in cellular cAMP and were restored to about 157 \pm 15.0% \pm 1.8% (mean \pm S.D., n = 7) of the rhIL-1 β -induced levels in the face of p38 MAP kinase blockade (Fig. 1D).

The activation by pro-inflammatory cytokines of the p38 kinase cascade is well described, although the role of prostanooids in this regard is not clear (reviewed in [6, 28]). In HSF the stimulation of p38 kinase phosphorylation by rhIL-1 β was

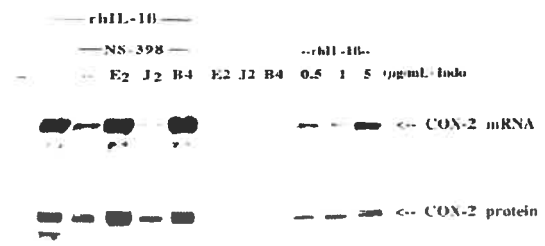


Fig. 3. Effect of HSF eicosanoids on basal and rhIL-1 β -stimulated COX-2 mRNA and COX-2 protein. Quiescent HSF were treated with vehicle (lanes 1) or with 100 pg/ml (5.7 pmol/liter) of rhIL-1 β (lanes 2) for 16 h with NS-398 (100 nmol/liter) (lanes 3–6) in the presence of PGE₂ (E₂, 100 nmol/liter), 15-deoxy- $\Delta^{12,13}$ -prostaglandin (J₂, 100 nmol/liter), or leukotriene (L₁, B₁, 100 nmol/liter) (lanes 4–6). In lanes 7–9, cells were treated with PGE₂ (E₂, 100 nmol/liter), 15-deoxy- $\Delta^{12,13}$ -prostaglandin (J₂, 100 nmol/liter), or leukotriene (L₁, B₁, 100 nmol/liter) alone. In lanes 10–12, cells were co-incubated with 100 pg/ml of rhIL-1 β and 0.5, 1, or 5 μ g/ml of indomethacin (Indo). Membranes were extracted for protein or RNA and prepared for Western and Northern blotting as described under "Experimental Procedures." COX-2 mRNA (upper panel), COX-2 protein (lower panel).

bi-phasic, reaching a maximum level at 20 min, a rapid decline to near control values between 20 and 60 min, followed by a second surge with a zenith at 1 h (Fig. 5A). The initial phase was unaffected by co-incubations with NS-398, whereas the second phase was abolished suggesting that the latter phase of p38 phosphorylation was PGE₂-dependent. Surprisingly, rhIL-1 β didn't activate the phosphorylation of another stress-activated kinase, JNK1/2 in our cell cultures to any significant extent (data not shown), in contrast to what we observed in human chondrocytes.² PGE₂ (100 ng/ml) caused a robust and protracted phosphorylation of p38 kinase that persisted for up to 16 h (Fig. 5A). PGE₂ didn't phosphorylate JNK1/2 appreciably (data not shown). These findings are consistent with our previous work showing PGE₂-dependent stimulation of MEK3/6, ATF-2, and CREB/ATF-1 phosphorylation in an identical time frame [16].

Gel-shift analysis revealed that SB202190 (500 nmol/liter to 10 μ mol/liter) inhibited rhIL-1 β -induced ATF-2 oligonucleotide-binding but caused a mild induction of NF- κ B (p50) nuclear binding proteins both in the absence and presence of IL-1 β (data not shown).

In order to examine for elements of transcriptional control of COX-2 via p38 MAP kinase or cAMP/PKA signaling, we conducted transient transfection analyses and observed that rhIL-1 β (100 pg/ml) stimulated a human COX-2 promoter-luciferase reporter construct by 1.99 \pm 0.11-fold (mean \pm S.D., n = 4); this induction was not inhibited by NS-398 nor PGE₂ but was completely abrogated by SB202190 (Fig. 5B). Neither NS-398, PGE₂, nor SB202190 had any effect on basal promoter activity. In companion experiments, co-expression of a MEK3 expression vector stimulated the COX-2 promoter-luciferase construct by 1.76 \pm 0.23-fold (mean \pm S.D., n = 4). SB202190 abolished the induction completely (Fig. 5B). The magnitude of COX-2 promoter activation by rhIL-1 β and MEK3 was not significantly different. The over-expression of catalytic subunits of PKA had no effect on the COX-2 promoter activity (Fig. 5B), whereas co-expression of MEK3 and PKA_{cat} synergized to increase COX-2 promoter activity to 3.26 \pm 0.33-fold (mean \pm S.D., n = 4), an effect partially inhibited by SB202190 (Fig. 5B).

Prostaglandin E₂ Stabilizes COX-2 mRNA. Judging by the

² W. H. Faour, Y. He, Q. W. He, M. K. Lachman, and M. Quintana-A. Mancini and J. A. DiPaola, unpublished observations.

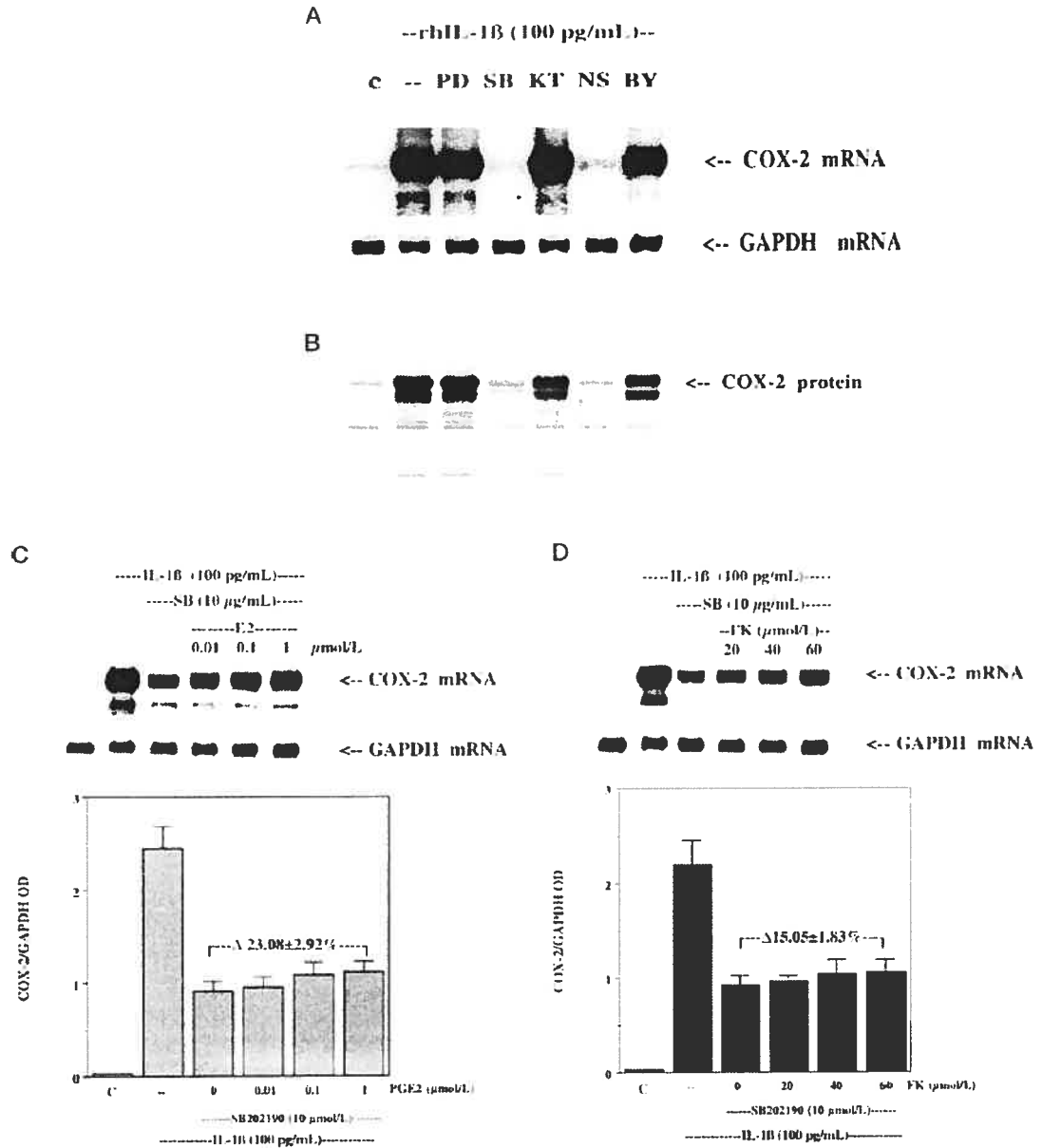
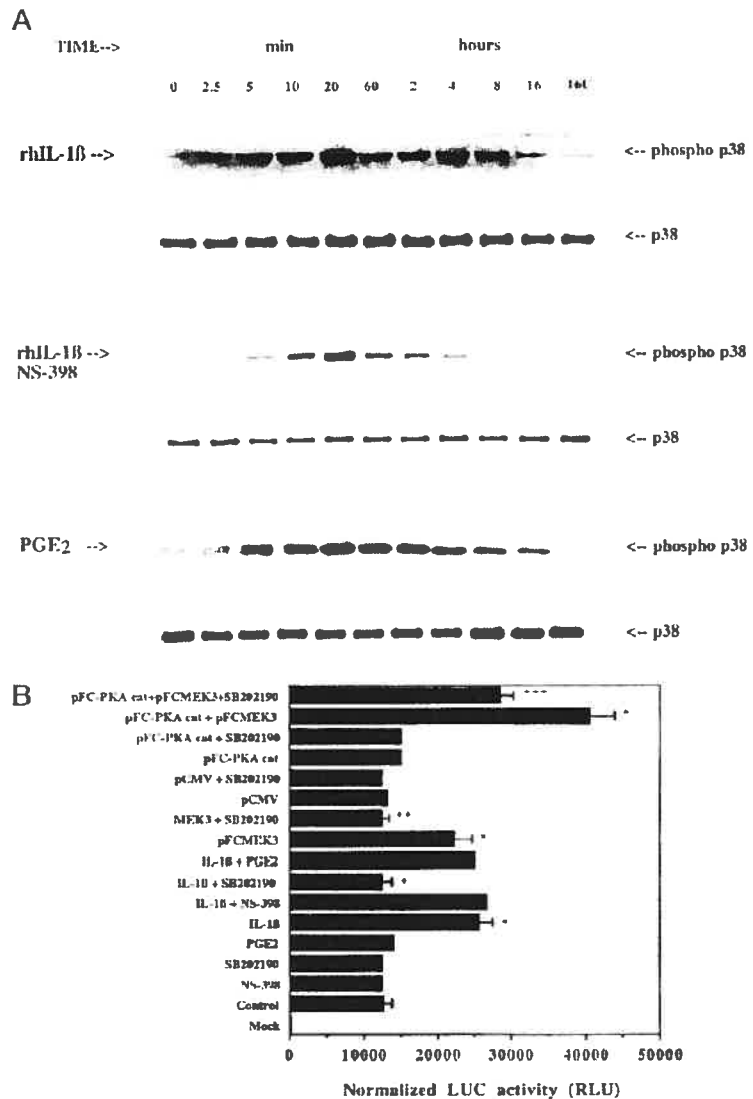


Fig. 4. Effect of protein kinase inhibitors on rhIL-1 β stimulation of COX-2 mRNA (A) and COX-2 protein (B). PGE₂ stimulation by p38 MAP kinase and protein kinase C. C and D. C, control HSF cells treated with vehicle (*lane 1*) or with 100 μ g/ml (5.7 μ mol/l) of rhIL-1 β (*lane 2*) for 18 h in the presence of either P198770 (PD; 50 μ mol/l), a MEK1/2 inhibitor, SB202190 (SB; 10 μ mol/l), a p38 MAP kinase inhibitor, or KT-5720 (KT; 2 μ mol/l), a PKA inhibitor, NS-398 (NS; 100 μ mol/l), or Pex-11-7082 (BY; 5 μ mol/l), an ERK inhibitor. Monolayers were extracted for protein or RNA. 5 μ g of total RNA were analyzed for COX-2 mRNA and GAPDH mRNA by Northern hybridization using specific DNA probes, whereas 50 μ g of protein were analyzed for COX-2 protein by Western blotting using specific polyclonal anti-COX-2 antibodies as described under "Experimental Procedures." C and D. Cells were treated with rhIL-1 β in presence of SB202190 in the absence or presence of increasing concentrations of PGE₂ (*E*₁, 0.1–1 μ mol/l) or the cAMP membrane forskolin (20–60 μ mol/l) or isoproterenol (100 μ mol/l) (upper figure). Northern analysis was performed as described above. C, $p < 0.01$; D, $^*p < 0.01$; Student's *t* test.

accumulated data (see above), it is unlikely that PGE₂ modifies COX-2 expression in HSF at the transcriptional level. As such, we examined post-transcriptional mechanisms involving

strictly message stabilization and/or protein translation. As a first approach, we employed classical techniques involving measuring COX-2 mRNA in transcriptionally arrested cells

Fig. 5A, time course of p38 MAP kinase phosphorylation (Thr180/Tyr182) by rhIL-1 β and PGE₂ (time point HSF treated for varying times: 0, 10 h, *PGE* = 10 μ M) (control with 100 μ M of 5,7 μ Mol/liter of rhIL-1 β (*rhIL-1 β 5,7 μ Mol/liter*), rhIL-1 β + NS-398 (100 μ Mol/liter) (*rhIL-1 β + NS-398*), rhIL-1 β + 100 μ Mol/liter) (*rhIL-1 β 100 μ Mol/liter*), or PGE₂ (100 μ Mol/liter) (*PGE*). Monday is was extracted for protein, and 50 μ g were analyzed for total and phospho-p38 MAP kinase by Western blotting using a specific anti-phospho-p38 antibody as described under Experimental Procedures. **B**, transcriptional activation of the COX-2 promoter by IL-1 β and the role of p38 MAP kinase. Cells were plated at 10⁶ cells/ml in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 100 units/ml penicillin, and 100 μ Mol/ml streptomycin. Two μ g of the COX-2 promoter-luciferase construct in the presence or absence of 50 ng each of pFCMEK3, pCMV, or pFCPKA_{cat} or p5'3'UTR_{cat} + pFCPKA_{cat} and 0.5 μ g of pCMV- β -galactosidase were transfected into cells using LipofectAMINE 2000 according to the manufacturer's instructions. Following a change in medium containing 1% FCS, 2 h later, cells were transfected with 10⁶ cells/ml of rhIL-1 β (5.7 μ Mol/liter) + NS-398 (100 μ Mol/liter) + SB202190 (10 μ Mol/liter) and PGE₂ (100 μ Mol/liter) per the figure. Cells were lysed and the luciferase activity (β -galactosidase activity) and protein amount were determined as described under Experimental Procedures. * $p < 0.05$ versus control; + $p < 0.05$ versus IL-1 β ; - $p < 0.05$ versus pFCMEK3; $p < 0.05$ versus p5'3'UTR_{cat} + pFCPKA_{cat} (mean \pm S.D., $n = 3$, 4 determinations in duplicate).



activation in D) in the absence or presence of PGE₂. When HSF were activated with rhIL-1 β for 2–4 h (steady state) followed by washout and a fresh change of medium, the elevated levels of COX-2 mRNA declined rapidly ($t_{1/2} = 0.85$ h, $n = 4$ determinations) such that within 2 h the levels were similar to control, unstimulated cells (Fig. 6, A and B). The inclusion/exclusion of actinomycin D (1 μ g/ml) had no effect on the rate of COX-2 mRNA decay in these experiments (data not shown). However, if PGE₂ (1 μ g/ml) was added to fresh medium in the presence of actinomycin D, COX-2 mRNA levels remained elevated for up to 16 h ($t_{1/2} = 13.02$ h, $n = 4$ determinations) and declined thereafter (Fig. 6, A and B). The addition of a monoclonal anti-PGE₂ antibody, but not a monoclonal anti-IL-1 β antibody (control), abolished the stabilizing effect, suggesting the oxygenase itself added PGE₂ alone was responsible for stabilizing COX-2 mRNA. Although we showed that long-term phospho-

rylation of p38 kinase by IL-1 β was PGE₂-dependent (see Fig. 5A), it was necessary to establish whether COX-2 mRNA stabilization by PGE₂ was also a p38 kinase-mediated process. Indeed, SB202190 reduced considerably the stabilization of COX-2 mRNA by PGE₂ (Fig. 6, C and D), whereas the PKA inhibitor KT-5720 was somewhat effective in this regard (41.21 \pm 3.39%, $n = 4$).

As we have shown (15), HSF express trace quantities of EP3 receptors (subtype 1) that mediate either calcium fluxes or decreases in cellular levels of cAMP. The predominant EP1 receptor is associated with increases in cellular cAMP levels (14–16) and is coupled to MAP kinase cascades by Rap1B-Raf activation (reviewed in Ref. 17). Butaprost (EP2 > EP3 agonist) and sulprostone (EP1 > EP3 agonist) (data not shown) had little stabilizing effect on COX-2 mRNA up to 10 μ Mol/liter (Fig. 6E), compared PGE₂ (*in vivo*) butaprost.

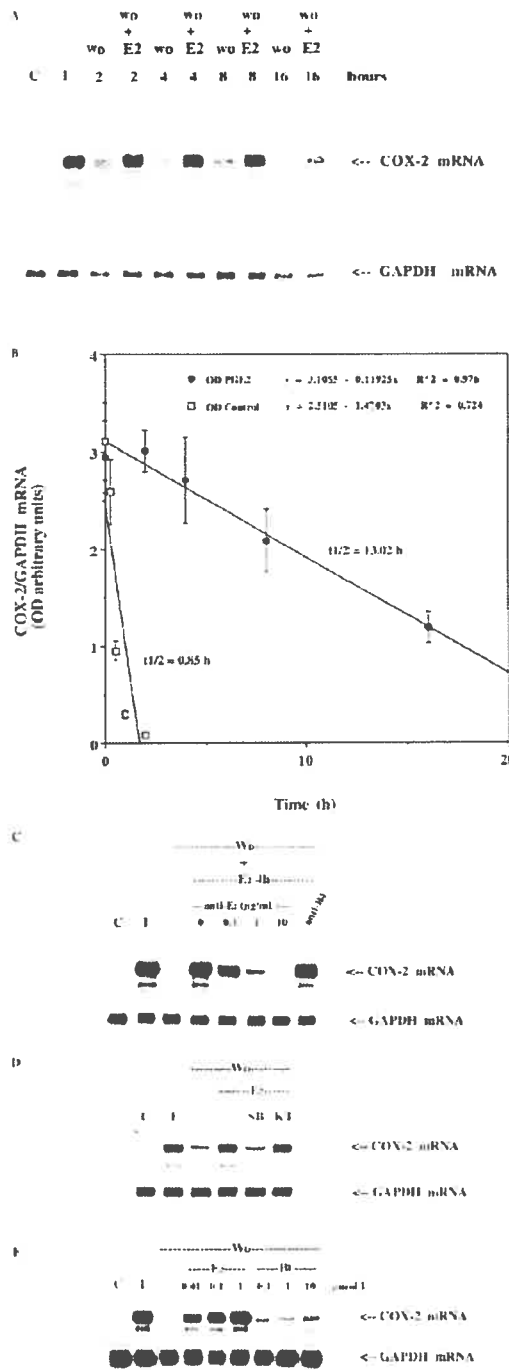


Fig. 6. PGE₂-dependent stabilization of COX-2 mRNA is mediated by p38 MAP kinase and protein kinase A. (A) Quiescent HSFs were treated with vehicle (w/o) or with 100 μg/ml (5.7 μmol/liter) of rhIL-1β (*E*) for 3 h, and at each time, cells were washed out (*Wd*) and treated with actinomycin D (1 μg/ml) for 30 min, and then

As mentioned earlier, the COX-2 mRNA has multiple copies of the Shaw-Kamen AU-rich sequences that are believed to influence message stability. Recent studies (36, 41) have provided evidence that the AU-rich elements (in the first 116 bp) of the 3'-UTR may mediate COX-2 mRNA instability. Furthermore, specific cytoplasmic AU-binding proteins were identified that may initiate message degradation (36, 41). To determine whether PGE₂/p38 MAP kinase-dependent mRNA stabilization is manifested through the 3'-UTR and AU-rich sequences, we transfected HSFs with cytomagal virus–driven chimeric expression constructs containing luciferase cDNA reporter fused to the COX-2 3'-UTR (Luc + 3'-UTR), AU-rich region (Luc + ARE), or complete removal of the 3'-UTR region (Luc Δ3'-UTR) (kindly provided by Dr. Stephen Prescott, University of Utah). By using an identical experimental design as in Fig. 6(A), we observed that rhIL-1β stimulated luciferase mRNA after 4 h stimulation by more than 3-fold using Luc + 3'-UTR constructs (Fig. 7A, top, representative RT-PCR; lower panel, densitometric analysis of five determinations). Removal of the rhIL-1β stimulus for 2 h under washout conditions resulted in a substantial (apparently rapid) decrease in luciferase mRNA. The addition of PGE₂ reversed the dramatic fall in luciferase mRNA levels, an effect largely reversed by the coaddition of the p38 kinase inhibitor SB203580. As expected, HSF transfected with constructs devoid of COX-2 3'-UTR were unresponsive to our treatment protocols, whereas the inclusion of the AU-rich region of COX-2 3'-UTR resulted in more modest effects on luciferase mRNA expression. No major mRNA decay was observed in the latter experiments for an additional 4 h, whereas the presence of the entire 3'-UTR region resulted in complete disappearance of Luc mRNA under our experimental conditions (data not shown). In addition, when we treated cells transfected with the Luc + 3'-UTR construct followed by treatments with rhIL-1β in the absence or presence of NS-398, with or without PGE₂, rhIL-1β substantially augmented luciferase mRNA after 16 h of stimulation. The stimulation was abrogated by the addition of NS-398 to a substantial degree; the latter inhibitory effect was entirely reversed by further additions of PGE₂ (Fig. 7B).

PGE₂ Mitigates the Inhibition of Protein Translation by 3'-UTR Region of COX-2 mRNA.—There is now good evidence that the AU-rich elements of certain cytokines and COX-2 mRNA inhibit translation (41, 48–50). By using the same chimeric constructs transiently transfected in our primary cultures of HSF as described above, we found dramatically increased luciferase activity (protein) when the 3'-UTR was removed (Luc Δ3'-UTR/COX-2) as compared with Luc + 3'-UTR or Luc + ARE (Fig. 7C). The entire 3'-UTR/COX-2 region mediated the most robust inhibition of translation with the AU-rich region (proximal 116 bp) displaying intermediate inhibitory activity in this regard (Fig. 7C). In order to assess whether translational mechanisms are implicated in the induction of COX-2 protein

fresh medium was added (containing either vehicle (*Wd*) or PGE₂ (E₂, 100 nmol/liter). After an additional 2, 4, 8, or 16 h of incubation, monolayers were extracted for RNA at each time point, and 5 μg of total RNA were analyzed for COX-2 mRNA and GAPDH mRNA by Northern hybridization using specific 100-labeled cDNA probes (A). *B*, Densitometric analysis of COX-2 mRNA levels in the presence or absence of PGE₂ (*n* = 4 determinations). *C–E*, Cells were treated with vehicle (*Wd*) or with 100 μg/ml (5.7 μmol/liter) of rhIL-1β (*D*) for 4 h, washed out (*Wd*), treated with actinomycin D (1 μg/ml) for 30 min, and then fresh medium was added (containing either vehicle (*Wd*) or PGE₂ (E₂, 100 nmol/liter) alone or in the presence of increasing amounts of a monoclonal anti-PGE₂ antibody or a control (non-binding) anti-IL-1β antibody (*C*, SB203580, *SB*, 1 μg/ml; the other KT-5720 (*KT*, 2 μmol/liter) (*D*), or increasing concentrations of PGE₂ (0.01–1 μmol/liter) or butaprost (*BU*, 0.1–10 μmol/liter) (*E*) for 4 h in 6 hours.

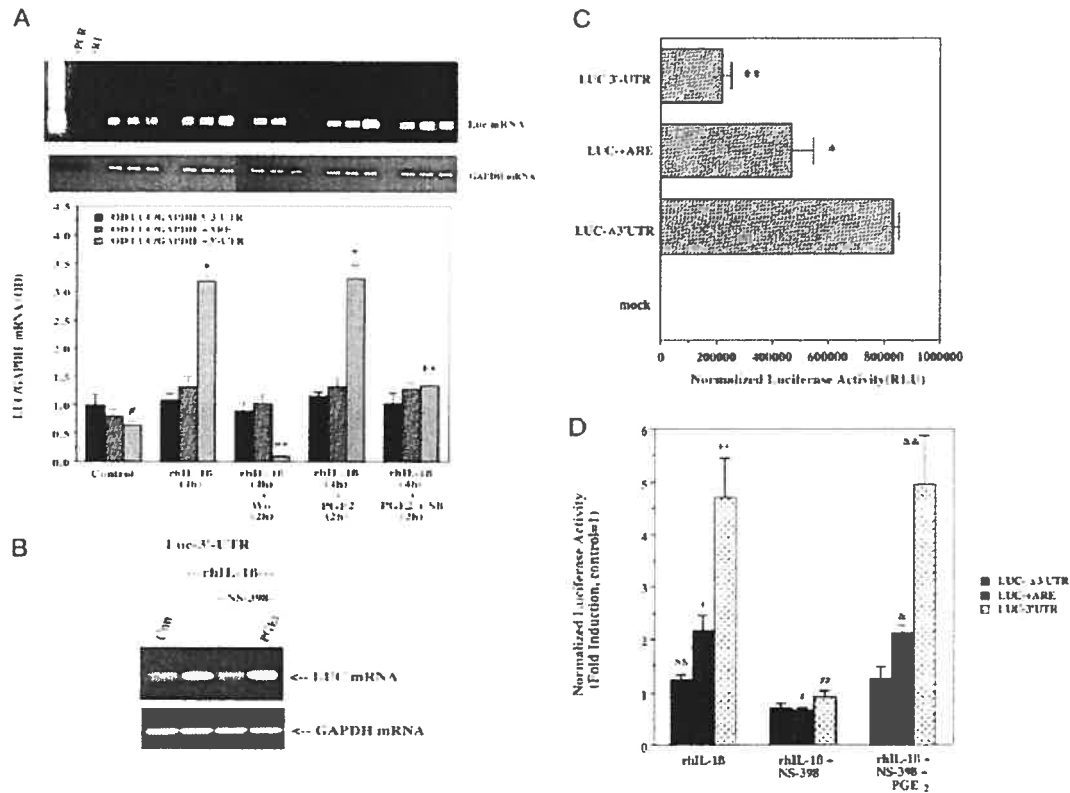


Fig. 7. PGE₂-dependent stabilization of COX-2 mRNA and increased translation is mediated by the proximal (AUC-rich) and distal portion of COX-2 3'-UTR. Cells were plated at 40% confluence in DMEM in the presence of 10% heat-inactivated FCS, 100 units/ml penicillin, and 100 μg/ml streptomycin. Two μg of LUC 3'-UTR, LUC+ARE, or LUC-Δ3'UTR and 0.5 μg of pCMV-β-galactosidase were transfected for 6 h using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions. Following a change in medium containing 1% FCS, 2 h of treatment, cells were treated with vehicle (control) or with 100 μg/ml (7.7 μmol/l) of rhIL-1β for 1 h, washed out, and treated with actinomycin D (1 μg/ml) for 20 min, and then fresh medium was added containing either vehicle (control) or PGE₂ (100 nmol/l) or in the presence of NS-398 (NS-398, 10 μmol/l) for an additional 2 h. **A:** Monolayers were scraped into phosphate-buffered saline, divided into 2 portions, centrifuged, and extracted for protein (to determine β-galactosidase activity) or extracted for RNA and 1 μg of total RNA was analyzed for luciferase mRNA and GAPDH mRNA by RT-PCR as described under "Experimental Procedures." A representative RT-PCR analysis along with statistical analysis of 6 representative data ($n = 3$; $p < 0.02$ versus control LUC-Δ3'UTR; $p < 0.0007$ versus control LUC 3'-UTR; $p < 0.0001$ versus rhIL-1β + LUC 3'-UTR; $p < 0.0002$ versus rhIL-1β + NS-398 + LUC 3'-UTR; $p < 0.0001$ versus rhIL-1β + PGE₂ + LUC 3'-UTR). **B:** Cells were treated for 16 h with rhIL-1β (100 μg/ml), rhIL-1β + NS-398 (100 nmol/l) or rhIL-1β + NS-398 + PGE₂ (100 nmol/l) or, monolayers were extracted for RNA, and 1 μg of total RNA was analyzed for luciferase mRNA and GAPDH mRNA by RT-PCR. **C and D:** 2 μg of LUC 3'-UTR, LUC+ARE, or LUC-Δ3'UTR and 0.5 μg of pCMV-β-galactosidase were transfected for 6 h using Lipofectamine 2000 followed by a change in medium containing 1% FCS. 2 h of cells were then analyzed for luciferase activity. **C:** or medium for 16 h with biological effectors rhIL-1β (100 μg/ml), rhIL-1β + NS-398 (100 nmol/l) or rhIL-1β + NS-398 + PGE₂ (100 nmol/l) or as per the figure. **D:** Cells were lysed and the luciferase activity/β-galactosidase activity and protein content were determined as described under "Experimental Procedures." $n = 3$ for all experiments. $p < 0.01$ versus LUC 3'-UTR; $p < 0.001$ versus LUC-Δ3'UTR; $p < 0.01$ versus control; $p < 0.001$ versus control; $p < 0.01$ versus rhIL-1β; $p < 0.001$ versus rhIL-1β + NS-398; && $p < 0.001$ versus rhIL-1β + NS-398.

synthesis by IL-1β and whether the effect may be PGE₂-dependent, we transfected HSF with the chimeric constructs and treated the cells with IL-1β in the absence or presence of NS-398 with or without PGE₂. Indeed, rhIL-1β substantially increased luciferase activity (protein synthesis) after 16 h of stimulation, and the effect proved to be almost entirely PGE₂-dependent (compare data, rhIL-1β + NS-398 versus rhIL-1β + NS-398 + PGE₂, Fig. 7D). Interestingly, the AU-rich region of COX-2 mRNA appeared to play a modest role in the PGE₂-dependent increase in protein synthesis with the distal AU-rich sequences being apparently more important in this regard (Fig. 7E).

DISCUSSION

Normally not expressed, the elevated levels of COX-2 mRNA, COX-2 protein, and PGE₂ release observed in OARs-affected synovial membranes have been associated etiologically with the disease process [17, 18]. Thus, understanding the mechanisms responsible for aberrant COX-2 expressions is of considerable clinical concern. It now seems clear from published evidence and the present study that the COX-2 gene is regulated through both 5' transcriptional and 3' post-transcriptional regulatory elements following IL-1β signal activation in both normal (this study) and transformed cell phenotypes. We believe that the levels of IL-1β-induced COX-2 mRNA are the

result of a more minor element of transcriptional control supported by robust post-transcriptional regulation (i.e., message stability and/or translational control). The COX-2 protein levels always mirrored precisely COX-2 mRNA in our studies, suggesting precise coordination between message expression and translation. Our data confirm previous work (11, 15, 36) implicating the p38 MAPK cascade as critical to the magnitude and duration of cellular COX-2 mRNA. We now add, however, that the COX-2 product, PGE₂, is largely responsible for this activation of p38 MAPK cascade resulting in the stabilization of COX-2 mRNA and increased COX-2 protein synthesis. In this regard, the exact contribution of the cAMP/PKA pathway (see "Results") will require further investigation but is likely to be another example of signaling redundancy (51). In this context, our COX-2 promoter experiments seem to suggest that p38 MAP kinase and the cAMP/PKA synergize to activate transcription so that expression of the COX-2 gene may be controlled transcriptionally and post-transcriptionally by the latter two signaling pathways. The data are also consistent with a positive feedback loop involving released PGE₂ binding to the prostanoid EP4 receptor in our cell cultures. Therefore, considering the impressive amounts of PGE₂ released by human OAR synovial membranes in explant cultures (52), it is conceivable that the COX-2 gene expression levels are sustained in this cyclic positive-feedback loop.

There are contrary reports (51, 54) of PGE₂ inhibiting IL-1 β -induced COX-2 expression in human umbilical vein endothelial cells presumably through a negative feedback loop. The design of the latter studies was different to the extent that high concentrations of exogenous PGE₂ were added in combination with IL-1 β and, in some cases, in the absence of any inhibition of endogenous prostanoid production (e.g., by NS-398). One explanation could be that added PGE₂ inhibits IL-1 β -induced NF- κ B-driven transactivation of the COX-2 promoter by interacting with I κ B kinase, although this may require metabolism of PGE₂ to cyclo-oxygenone derivatives by human umbilical vein endothelial cells (55). It is curious that IL-1 β -induced PGE₂ release occurs in tandem with increases with COX-2 mRNA and protein, whereas exogenously added PGE₂ reverses the up-regulation. Compared with HSF, human umbilical vein endothelial cells release much less PGE₂ and thus COX-2 expression could not depend on PGE₂ accumulation (51). The phenomenon may be particular to endothelial cells since we have observed only PGE₂-dependent positive feedback in human macrophages, chondrocytes, and skin fibroblasts.²

The present data are consistent with a more minor element of transcriptional regulation of the COX-2 gene by IL-1 β through the p38 kinase pathway occurring within the 1st hour or so. By using nuclear run-on assays, however, others have shown (56, 57) 5–15-fold increases in COX-2 transcriptional rates following IL-1 β stimulation which would better reflect steady-state mRNA levels normally observed. We were able to measure only a 2-fold increase in human COX-2 promoter (-184) bp activity after IL-1 β stimulation of transiently transfected HSF, addition of NS-398, PGE₂, or 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin G₂ had no effect, although SR202190 was capable of reversing promoter induction. Furthermore, MEK1 overexpression induced human COX-2 promoter activity to levels similar those induced by rhIL-1 β , and this was also quite sensitive to SR202190. The p38 MAP kinase pathway synergized with the cAMP/PKA cascade to elicit transcriptional activation. Saklatvala and co-workers (58) observed, using nuclear run-on technology and HeLa cells, that IL-1 β induced a 2-fold increase in transcription of the COX-2 gene and that the effect was refractory to inhibitors of p38 kinase. Since PGE₂ metabolized alone doesn't stimulate transcription of the COX-2

gene, the massive increase and persistence of COX-2 mRNA is most likely due, in large part, to post-transcriptional regulation. Nevertheless, even considering the strong evidence for COX-2 mRNA stabilization, one must include some transcriptional control since both NS-398 and SR202190 inhibit 80–90%, not 100%, of IL-1 β -induced COX-2 mRNA. Although PGE₂ stabilized COX-2 mRNA for up to 16 h in transcriptionally arrested cells, 21 h COX-2 mRNA levels in the presence of PGE₂ were no different from controls. We attribute this to rapid PGE₂ metabolism (59, 60), an effect that would not be as critical with cells constantly releasing PGE₂ as in the presence of IL-1 β for 0–18 h (see Fig. 1).

There is some circumstantial evidence suggesting that NF- κ B mediates a transcriptional induction of the COX-2 gene by IL-1 in human RA synovial fibroblasts (25). These latter studies, however, were not designed to address the mechanisms controlling steady-state COX-2 mRNA levels and were focused on the notion of NF- κ B-dependent promoter-based regulation. However, no data were reported to show a direct activation of the COX-2 reporter by NF- κ B via its cognate response elements.³ Evidence of this nature has been demonstrated in osteoblasts and vascular endothelial cells, as mentioned earlier (26, 27). Nevertheless, it could be argued that the NF- κ B cascade acts as a "priming" mechanism in our cell cultures to initiate transcription of the gene, while the PGE₂-dependent p38 kinase signaling pathway stabilizes, augments, and maintains the levels of COX-2 mRNA found in cells after an IL-1 β signal. The results with TNF- α may be instructive in this regard. Consider that the TNF- α -induced response, in terms of COX-2 mRNA/protein and PGE₂ release, amounts to about 2.5–5% of the cellular response normally induced by IL-1 β ², it is not suppressed by co-incubations in the presence of NS-398, and further additions of PGE₂ potentiate the effect to the extent that the steady-state levels of COX-2 mRNA become indistinguishable from those generated by IL-1 β . In HSF, TNF- α is an extremely potent activator of the NF- κ B cascade (25, 43) while having little or no discernible effect on p38 kinase. Redress to chemical blockade of IKK yielded equivocal results and suppressed only a fraction of IL-1 β -induced COX-2 mRNA expression; the latter portion was not PGE₂-reversible.² We chose to interpret these experiments with due caution as Bay-11-7082 (IKK inhibitor) at high concentrations (2-fold EC₅₀) is cytotoxic as are other NF- κ B inhibitors especially those that block proteasomal activity. This observation is perhaps not surprising given that inhibition of IKK in primary and transformed cell lines causes apoptosis (61, 62). Using stable transfectants of HSF harboring either a wild type I κ B α expression construct or a non-phosphorylatable I κ B α mutant expression construct has not helped to resolve the transcriptional issue since there was no blockade of induced COX-2 expression by IL-1 β or TNF- α ,² suggesting purely post-transcriptional p38-dependent mechanisms. In a recent publication (43), we showed that the T-helper cell Th2-derived cytokines IL-1 and IL-10 inhibit, virtually to 100%, TNF- α /IL-1 β -stimulated iPLA₂ protein, COX-2 mRNA, COX-2 protein, and PGE₂ release; tandem experiments reveal that the cytokines have no effect on TNF- α /IL-1 β -induced NF- κ B as judged by gelshift analysis. However, in the same study, TNF- α /IL-1 β -induced cI κ B β activation was potently reversed by IL-1, the critical role of cI κ B β in COX-2 promoter activation has been described previously (26, 27).

Recently it was shown (33) that the strength and duration of COX-2 mRNA expression following IL-1 β activation of HeLa cells could be traced to the posttranscriptional regulatory phase in which a short (123-nucleotide) fragment of the COX-2 3'-UTR was shown to be essential and sufficient for the regu-

lation of mRNA stability by a p38/MAPK/p38-p27 cascade. The latter nucleotide sequence interacted with a protein identified as an AU-rich element (ARE)-binding factor 1 (ABF). The authors used post-transcriptional reporter constructs in which 3'-UTR fragments of COX-2 were cloned into a rabbit β -globin reporter plasmid under the control of a tetracycline operator sequence. Dominant-negative mutants of MAPKAPK-2 and S1320/580, a p38 inhibitor with properties similar to SB202190, blocked the MKK3/6 expression vector stabilization of the β -globin mRNA. Others (41, 63, 64) have used transient or stable transfections in immortalized cell lines using luciferase reporters with COX-2 3'-UTR fragments cloned downstream. Both stable and transient approaches came to the same conclusion about the importance of the AU-rich sequences in the 3'-UTR as targets for extraplasmic/messenger binding proteins that act to destabilize mRNA. However, the notion that mRNA stability was related to translational efficiency was presented, and it was argued that in fact AU sequence arrays regulate translation through a complex, yet-to-be-described interaction of M-binding proteins and translational initiation factors. This notion is on solid ground based on data with AU-rich sequences from cytokine mRNAs (8, 19).

Our work suggests that the COX-2 3'-UTR inhibits protein reporter translation and promotes rapid mRNA decay in HSF. The proximal AU-rich region and distal MTTCA sequences contribute more or less equally to the translation inhibitory effect, although the entire 3'-UTR was seemingly far more important to mRNA decay than the AU-rich region alone. Regardless, the inhibition of translation and mRNA decay were relieved when the cells are treated with IL-1 β , this was a purely PGE₂/p38 MAP kinase-dependent effect that reflects quite closely what we observed in our COX-2 mRNA experiments (Fig. 6A). In contrast to the previous studies emphasizing AU-rich tract-dependent regulation (33, 36, 41), we find that distal MTTCA sequences were quite reactive to the stabilizing effects of PGE₂ both in terms of mRNA and protein in HSF. Further studies will reveal whether the cocatalytic stimulates proteins that favor COX-mRNA stability (36, 59) and translation or inhibit those that serve to destabilize the message-translation. Whatever the case, it would not be surprising if we find that these proteins differ in quantity and/or composition from those isolated and identified from primate cells in heterologous systems (41) or transformed human cell lines (33, 36, 41).

We thus used cell-permeable pharmacological inhibitors like SB202190 and NS-398 to study COX-2 mRNA stability which always raise concerns about specificity and thus the validity of the data presented here. For example, SB202190 at higher concentrations can inhibit certain isoforms of JNK (65, 66), which could lead to erroneous conclusions about the predominant role of p38 MAP kinase. This proved not to be of concern for us since JNK is not phosphorylated in HSF following rhIL-1 β stimulation. The issue of SB202190 inhibiting NF- κ B transactivation (65) following IL-1 β or TNF- α cellular activation is probably related to cell-to-cell since, in our cell cultures, SB202190 actually had a mild stimulatory effect in this regard.

In summary, this study describes a molecular paradigm in which membrane phospholipid-derived metabolites, released immediately following cytokine cellular activation, modulate cytokine-target gene expression in a fundamental way. It remains to be determined the degree to which target genes are modulated, the type of modulation, and if the phenomenon applies to other lipoidal metabolic pathways and/or cellular phenotypes, allowing the development of a unifying hypothesis in this regard.

Acknowledgments—We thank Dr. K. Kuroda for excellent cell culture work and Dr. S. Prescott for the human COX-2 promoter construct.

REFERENCES

1. Wu, K. K. (1996) *J. Lab. Clin. Med.* 128, 242-245
2. Dubois, R. N., Abramson, S. B., Crofford, L., Gupta, R. A., Simon, L. S., Van der Putte, L. B., and Lipsky, P. E. (1998) *FASEB J.* 12, 1063-1073
3. Goebel, E. J., An, S., and Smith, W. L. (1995) *FASEB J.* 9, 1651-1658
4. Paul Robert, A. R. (1995) *Trends Endocrinol. Metab.* 6, 293-297
5. Samuelsson, B., Gørling, M., Gronstrom, E., Hamberg, M., Hammarstrom, S., and Malmsten, C. (1978) *Annu. Rev. Biochem.* 47, 597-620
6. DeWitt, D. L. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1063, 121-124
7. Picot, D. L., P. J., and Garavito, M. (1994) *Nature* 367, 243-249
8. Wang, L. H., Hailu, X., Xu, X. M., Lowe-Mitchell, D., and Wu, K. K. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190, 406-411
9. Hla, T., and Neilson, K. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 7384-7388
10. O'Banion, M. K., Winn, V. D., and Young, D. A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 4888-4892
11. Apple, S. E., Bistimski, A., Neilson, K., Narko, K., and Hla, T. (1994) *Biochem. J.* 302, 723-727
12. Rysock, R. P., Rayneschek, C., Macdonald-Bravo, H., Deffmann, K., Matti, M. G., and Bravo, R. (1992) *Cell Growth Differ.* 3, 443-450
13. Newton, R. J., Seybold, J., Kautert, L. M., Bereman, M., and Barnes, P. J. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 32312-32321
14. Dean, J. L. E., Bowk, M., Clark, A. R., and Saklatvala, J. (1990) *J. Biol. Chem.* 274, 264-269
15. Rodman, C. A., and Parkor, R. (1995) *Cell* 81, 179-183
16. Pasolunghi, S. (1993) *Cell* 87, 779-781
17. Martel-Pelletier, J., Di Battista, J. A., and Lajeunesse, D. (1999) in *Osteoarthritis: Experimental and Clinical Aspects* (Ragotzke, J.-Y., Ilmarinen, Y., Martel-Pelletier, J., and Pelletier, J.-P., eds.), pp. 156-187. Springer-Verlag, Heidelberg
18. Crofford, L. J., Wilder, R. L., Ristimaki, A. P., Soss, H., Remmers, E. F., Epps, H. R., and Hla, T. (1994) *J. Clin. Invest.* 93, 1095-1101
19. Jones, D. A., Carlisle, D. P., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A., and Prescott, S. M. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 9046-9057
20. Reek, P. L., Hardman, J. C., Timpane, R., Kastolic, R., and Baran, F. J. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 558-562
21. Di Battista, J. A., Hayakawa, M., Redwood, D. M., Zandi, E., and Karin, M. (1997) *Nature* 388, 548-554
22. Muzik, M., Ni, J., Feng, P., and Dixit, D. V. (1997) *Science* 278, 1612-1615
23. Muzik, M., Natoli, G., Saravani, S., Lovrenc, M., and Mantovani, A. (1998) *J. Exp. Med.* 187, 2097-2104
24. Zhang, F. X., Kirschbaum, C. J., Mancini III, R., Xu, X.-P., Jin, Y., Faure, E., Mariani, A., Roth, M., Marsoni, M., and Avlitti, M. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 7611-7614
25. Crofford, L. J., Tan, B., McCarthy, C. J., and Hla, T. (1995) *Arthritis Rheum.* 38, 229-236
26. Schindler, J. F., Jr., Ji, Y. S., Liu, W. L., DuBois, R. N., and Raus, M. S. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 691-698
27. Yamamoto, K., Arakawa, T., Ueda, N., and Yamamoto, S. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 31715-31720
28. Herlihy, E., and Brown, Z. (1999) *Mol. Med. Today* 5, 439-447
29. Liang, H. (1999) *Oncogene* 18, 6087-6097
30. Tildesley, L. A., and Woodgett, J. R. (1999) *Cell Mol. Life Sci.* 55, 1299-1254
31. Tan, Y., Rouse, J., Zhang, A., Cariani, S., Cohen, P., and Gonda, M. J. (1998) *EMBO J.* 17, 4629-4642
32. Raines, J., Gupta, S., Rogers, J. S., Dickson, M., Han, J., Ulevitch, R. J., and Davis, R. J. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 7420-7426
33. Fowlney, N. W., Rawlinson, L., Gussak, F., Jones, E., Cooley, S., Hsuan, J., and Saklatvala, J. (1994) *Cell* 78, 1039-1049
34. Gong, Y., Valbrunn, J., and Lutz, M. (1996) *J. Clin. Invest.* 98, 2426-2430
35. Guan, Z., Buckman, S. Y., Penland, A. P., Templeton, D. J., and Morrison, A. R. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 12601-12608
36. Liso, M., Muktiani, K. R., Finch, A., Brewer, G., Saklatvala, J., and Clark, A. R. (2000) *Mol. Cell Biol.* 20, 4265-4274
37. Di Battista, J. A., Zhang, M., Martel-Pelletier, J., Fernandes, J. C., Alcocer-Varela, N., and Pelletier, J. P. (1999) *Arthritis Rheum.* 42, 157-166
38. Alcocer-Varela, N., Di Battista, J. A., Pelletier, J. P., Cloutier, J. M., Kinross, K., Dupuis, M., and Martel-Pelletier, J. (1997) *J. Rheumatol.* 24, 1985-1994
39. Fabian, H., He, Y., Zhang, M., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J. P., and Di Battista, J. A. (2001) *Osteoarthritis Cartilage* 9, 332-340
40. Kirschbaum, C., Jones, D. A., Matsumura, N., Groden, J., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A., White, R. L., and Prescott, S. M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 4816-4820
41. Dixon, D. A., Kaplan, C. D., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A., and Prescott, S. M. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 11750-11757
42. Eker, J. (1997) *Trends Pharmacol. Sci.* 18, 319-322
43. Alcocer-Varela, N., Di Battista, J. A., Pelletier, J. P., Kinross, K., Cloutier, J. M., and Martel-Pelletier, J. (1999) *Arthritis Rheum.* 42, 719-718
44. Di Battista, J. A., Dore, S., Morin, N., and Marbat, T. (1996) *J. Cell. Biochem.* 64, 320-323
45. Morin, N., Kinross, K., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J. P., and Di Battista, J. A. (1999) *Osteoarthritis Cartilage* 7, Suppl. A, S21
46. Faour, W., He, Y., and Di Battista, J. A. (2000) *Proceedings of the 5th World Congress on Osteoarthritis*, Barcelona, Spain, October 4-6, 2000, p. S10 (Abstract TH030, W. B. Saunders, London)
47. Gutkind, J. S. (1998) *Oncogene* 17, 1351-1342
48. Han, J., Brown, T., and Benker, B. (1990) *J. Exp. Med.* 171, 465-475
49. Krav, V. I., Wathlet, M. G., and Hwa, G. C. A. (1988) *Gene Anal.* 72, 191-211
50. Dean, J. L., Wait, R., Mshkini, K. R., Sully, G., Clark, A. R., and Saklatvala, J. (2001) *Mol. Cell Biol.* 21, 721-730
51. Mestry, J. R., Mackrill, P. J., Rydelbauer, D. E., Stapleton, P. P., Tansbe, T., and Dals, J. M. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 3977-3982
52. He, W., Pelletier, J. P., Martel-Pelletier, J., Di Battista, J. A. (2001) *Arthritis Rheum.* in press

- 53 Akara-cresnoud, P., Tachetziak, K., Chotewuttakorn, S., and Thaworn, A. (1999) *Mol. Cell. Inflamm.* 8, 287-294
- 54 Collier, N. A., Castrillo, A., Bosco, L., and Martin-Sanz, P. (1999) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288, 1235-1241
- 55 Rossi, A., Kapahl, P., Nishii, G., Takahashi, T., Chen, Y., Karin, M., and Gabriella Santoro, M. (2000) *Nature* 403, 103-107
- 56 Newton, R., Kutert, I., Bergmann, M., Alesch, I., and Barnes, P. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 28-32
- 57 Ristimaki, A., Garfinkel, S., Weissendorf, J., Maier, T., and Hla, T. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 11769-11775
- 58 Riley, S. H., Dean, J. L. E., Sarzfeld, S. J., Brook, M., Clark, A. R., and Saklatvala, J. (1998) *FEBS Lett.* 429, 75-80
- 59 Oliv, E. H. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 1001, 107-110
- 60 Oliv, E. H., Faldstadler, P., and Hamberg, M. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 9216-9221
- 61 Wang, C. Y., Mayo, M. W., and Baldwin, A. S. (1998) *Science* 271, 786-787
- 62 Karin, M., and Delhase, M. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 9067-9069
- 63 Newton, R., Seybold, J., Liu, S. F., and Barnes, P. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231, S8-S9
- 64 Guo, Q., Liu, C. H., Ben-Av, P., and Hla, T. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242, 508-512
- 65 Weisselborg, S., Bauer, M. K. A., Vogt, M., Schmitz, M. L., and Schulze-Osthoff, K. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 12422-12429
- 66 Clerk, A., and Suckon, P. H. (1997) *FEBS Lett.* 426, 93-96

Article 2

T-cell-derived Interleukin-17 Regulates the Level and Stability of Cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA through Restricted Activation of the p38 Mitogen-activated Protein Kinase Cascade

ROLE OF DISTAL SEQUENCES IN THE 3'-UNTRANSLATED REGION OF COX-2 mRNA*

Wissam H. Faour[‡], Arturo Mancini[§], Qing Wen He[¶], and John A. Di Battista^{§¶}

From the [‡]Molecular Biology Program, University of Montreal, and the Departments of [¶]Medicine and [§]Anatomy and Cell Biology, McGill University, Montreal, Quebec H3A 1A1, Canada

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 278, No. 29, Issue of July 18, pp. 26897–26907, 2003

© 2003 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.
Printed in U.S.A.

Résumé :

Interleukine-17 (IL-17) est une cytokine proinflammatoire dérivant exclusivement des cellules T. Son mécanisme de signalisation cellulaire est encore mal connu. Cette étude décrit un nouveau mécanisme par lequel IL-17 régule l'expression du gène de la cyclooxygénase-2 dans les chondrocytes, les synoviocytes et les macrophages humains. Les résultats préliminaires montrent que IL-17 stimulent rapidement (5-15 min), fortement (>8fois) et pour une durée supérieure à 24h, l'expression de l'ARNm de COX-2, la synthèse de la protéine COX-2 ainsi que le relâchement de la prostaglandine-E₂. Les expériences de criblage faites avec des inhibiteurs spécifiques des MAP kinases (e.g. SB202190), les expériences de western blot faites avec différents anticorps anti-phospho MAPKs et les études de transfection faites avec des plasmides dirigeant la surexpression des kinases actives (MKK3/6), ou avec des plasmides contenant des délétions ou le promoteur entier de COX-2, montrent que l'induction de l'expression de la cyclooxygénase-2 par IL-17 est exclusivement médiée via la voie de signalisation p38 MAPK. IL-17 active la transcription du gène COX-2 préférentiellement au niveau du site ATF/CREB en activant les facteurs de transcription ATF-2/CREB-1. D'ailleurs le niveau de l'ARNm de COX-2 diminue considérablement pour être comparable à celui du cas contrôle non stimulé suite au lavage et incubation des cellules, préstimulées avec IL-17, avec du milieu frais. Dans ces conditions, l'addition de IL-17 aux cellules déjà stimulées et incubées avec de l'actinomycine D stabilise le niveau de l'ARNm de COX-2 pour une durée minimale de 6h. Ce processus de stabilisation est complètement aboli par SB202190. Les études de transfections faites avec des plasmides contenant la luciférase liée à la partie entière ou à des délétions de la partie 3'-UTR de l'ARNm de COX-2 montrent que IL-17 stabilise l'ARNm de COX-2 via les régions distales AU-riche de la partie 3'-UTR. Ce phénomène de stabilisation est entièrement médié par la voie p38 MAPK. En conclusion, IL-17 exerce un mode de régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle pour contrôler l'expression des oncogènes et des cytokines proinflammatoires.

T-cell-derived Interleukin-17 Regulates the Level and Stability of Cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA through Restricted Activation of the p38 Mitogen-activated Protein Kinase Cascade

ROLE OF DISTAL SEQUENCES IN THE 5' UNTRANSLATED REGION OF COX-2 mRNA

Received for publication, December 16, 2002, and in revised form, May 12, 2003
Published in JBC Papers in Press, May 13, 2003; DOI: 10.1074/jbc.M212790.2003

Wissam H. Faour[‡], Arturo Mancini[§], Qing Wen He[¶], and John A. Di Battista^{§¶}

From the [‡]Molecular Biology Program, University of Montreal, and the Departments of [§]Medicine and [¶]Anatomy and Cell Biology, McGill University, Montreal, Quebec H3A 1A1, Canada

Although interleukin-17 (IL-17) is the pre-eminent T-cell-derived pro-inflammatory cytokine, its cellular mechanism of action remains poorly understood. We explored novel signaling pathways mediating IL-17 induction of the cyclooxygenase-2 (COX-2) gene in human chondrocytes, synovial fibroblasts, and macrophages. In preliminary work, recombinant human rhIL-17 stimulated a rapid (5–15 min), substantial (>8-fold), and sustained (>24 h) increase in COX-2 mRNA, protein, and prostaglandin E₂ release. Screening experiments with cell-permeable kinase inhibitors (e.g. SB202190 and p38 inhibitor), Western analysis using specific anti-phospho-antibodies to a variety of mitogen-activated protein kinase cascade intermediates, co-transfection studies using chimeric cytomegalovirus-driven constructs of GAL4 DNA-binding domains fused to the transactivation domains of transcription factors together with Gal4 binding element-luciferase reporters, ectopic overexpression of activated protein kinase expression plasmids (e.g. MKK3/6), or transfection experiments with wild-type and mutant COX-2 promoter constructs revealed that rhIL-17 induction of the COX-2 gene was mediated exclusively by the stress-activated protein kinase 2/p38 cascade. A rhIL-17-dependent transcriptional pulse (1.76 ± 0.11-fold induction) was initiated by ATF-2/CREB-1 transactivation through the ATF/CRE enhancer site in the proximal promoter. However, steady-state levels of rhIL-17-induced COX-2 mRNA declined rapidly (<2 h) to control levels under wash-out conditions. Adding rhIL-17 to transcriptionally arrested cells stabilized COX-2 mRNA for up to 6 h, a process compromised by SB202190. Deletion analysis using transfected chimeric luciferase-COX-2 mRNA 3'-untranslated region reporter constructs revealed that rhIL-17 increased reporter gene mRNA stability and protein synthesis via distal regions (–545 to –1414 bases) of the 3'-untranslated region. This response was mediated entirely by the stress-activated protein kinase 2/p38 cascade. As such, IL-17 can exert direct transcriptional and post-transcriptional control over target proinflammatory cytokines and oncogenes.

This work was supported in part by funds from the Canadian Institutes of Health Research and the Arthritis Society of Canada (to J. D. B.). The receipt of publication of this article is not to be interpreted as the warrant of page charges. The article must therefore be held as marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 which so indicates the fact.

To whom correspondence should be addressed: Dr. J. A. Di Battista, Department of Clinical Immunology, Royal Victoria Hospital, McGill University, 1160 St. Urbain, 687 Pine Ave., West, Montreal, PQ H3A 1A1, Canada.

Human interleukin-17 (IL-17)¹ (previously referred to as cytotoxic T-cell lymphocyte-associated antigen 8 (CTLA 8)) is a widely recognized prototypic CD4⁺RO⁺ T-cell (CD4⁺cd4⁺)-derived pro-inflammatory cytokine (1–3). The IL-17 gene is expressed as a 155-amino acid chain that is glycosylated and manifests biological activity as a covalent homodimer (2). Recent cloning and sequencing studies have led to the identification of several genes (IL-17B–F) that bear close homology to IL-17, highlighted by four to six functionally conserved cysteines that adopt cysteine-knot structural conformations (4–6). The biological activity of the IL-17 homologs is believed to overlap with that of IL-17 (4–6).

It has become increasingly clear that interleukin-17 occupies an important place in the hierarchy of pro-inflammatory cytokines associated with inflammatory, immune, malignant, and arthritic diseases (reviewed in Refs. 7 and 8). Indeed, there is now wide agreement, based on *in vivo* and *in vitro* studies, that the T-cell-derived cytokine may play a fundamental role in the pathophysiology of rheumatoid arthritis (RA) and possibly osteoarthritis (OA) (7–10). The cytokine is found in high levels in the synovial fluid of RA and OA patients, and synovial tissues express and produce abundant IL-17 (11–13), likely from infiltrating T-cell populations. The gamut of target genes and cells include the IL-17-dependent stimulation of the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β by infiltrating macrophages, IL-6, IL-8, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, G-CSF, and ICAM-1 from mononuclear phagocytes, endothelial cells and fibroblasts, matrix-destructive metalloproteinases (e.g. collagenases and aggrecanases) from activated synovial fibroblasts and cartilage chondrocytes, NO from endothelial cells and chondrocytes, and inflammatory mediators such as eicosanoids (e.g. PGE₂) from many sources (14–22). Thus, IL-17 stimulates tissue damage and cartilage degradation joint fail-

¹ The abbreviations used are: IL, interleukin; MAPK, mitogen-activated protein kinase; COX-2, cyclooxygenase-2; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; PGE₂, prostaglandin E₂; DMEM, Dulbecco modified Eagle medium; PBS, fetal calf serum; rh, recombinant human; SAPK, stress-activated protein kinase; JNK, Jun N-terminal kinase; ATF-2, activating transcription factor-2; PKA, AMP-dependent protein kinase; CREB-1, cAMP response element binding protein; MEK3 or MKK3/6, p38 MAPK kinase; UTR, untranslated region; ARE, AU-rich element; MnK1, MNK mitogen-activating kinase; cFos, c-fos; c-myc, c-myc; I κ B α , inhibitor of NF- κ B; JAK, Janus family tyrosine kinase; STAT, signal transducer and activator of transcription; ERK1/2 (p42/44), extracellular signal-regulated kinase; HC, human chondrocytes; HSF, human synovial fibroblasts; c-Myc, c-myc; RA, rheumatoid arthritis; OA, osteoarthritis; TNF α , tumor necrosis factor- α ; RT, reverse transcription; β 2-mi, β 2-microglobulin; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; CRE, cAMP response element binding protein; RLU, relative light unit.

indirectly or indirectly by recruiting activated inflammatory cells (e.g., neutrophils via adhesion molecules) and inducing the synthesis of proinflammatory cytokines in the inflamed tissue.

The IL-17 cascade modulating the proinflammatory actions of IL-17 are currently under study, and although the IL-17 receptor (IL-17R) is a type I transmembrane protein (33 kDa) with no intrinsic kinase activity (27), it can transduce a signal through the activation of protein kinase A (PKA), JNK, ERK1/2, JAK/STAT, and the NF- κ B cascades (20, 21–27). Interleukin-17-treated bovine chondrocytes express increased levels of inducible nitric oxide synthase mRNA, inducible nitric oxide synthase protein, and NO release, a process associated with PKA, ERK1/2, and, to a lesser extent, JNK activation (20). Cyclooxygenase-2 mRNA expression and PGE₂ release is concomitant with the stimulation of JNK1 and JNK2 by IL-17 in bovine chondrocytes (20). Interleukin-17 activated release of MMP9 by human monocyte macrophages followed a time course coincident with the phosphorylation of ERK1/2 and the transcription factors STAT1 and STAT3 (12). Using the same cell and culture conditions, IL-17 stimulated macrophage release of IL-1 β , TNF- α , and IL-6 was related to rapid calcium flux and a more delayed increase in NF- κ B DNA binding (11). Studies using TRAF-2 or TRAF-6-deficient mouse embryonic fibroblasts suggest strongly that TRAF6 is a critical mediator of IL-17 signaling, implying the involvement of NF- κ B and/or JNK cascades (26).

In the present study, we examined the IL-17-dependent signaling events using as a paradigm the IL-17 induction of COX-2 gene in human synovial fibroblasts, chondrocytes, and, where indicated, macrophages. The COX-2 protein represents the rate-limiting step in the activated biosynthesis of prostaglandins, the latter playing a cardinal role as pleiotropic immune and inflammatory modulators (28–30). The COX-2 gene is an inducible immediate-early gene regulated at both transcriptional (promoter based) and post-transcriptional levels (31–33) and, once induced, can be largely controlled by a positive feedback loop involving PGE₂ (34). We report that the magnitude and duration of the induction of COX-2 mRNA, COX-2 protein, and PGE₂ release by rhIL-17 is primarily the result of IL-17-dependent stabilization of COX-2 mRNA, although transcriptional mechanisms are also involved in the initial phase of induction. Essentially, rhIL-17 mitigates COX-2 mRNA decay normally mediated by the 5' UTR of COX-2 mRNA. Finally, we provide evidence that the transcriptional and stabilization processes involve a restricted MAPK profile, the MKK2/p38 cascade.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals—Crystalline 4-aminobiphenyl-3-ol (IL-17) (10⁶ IU/ml) (Dr. Ax-Tone, Memphis, TN), 4-aminobiphenyl-3-ol (10⁶ IU/ml) (Dr. Ax-Tone), penicillin, penicillin G, phenylmethylsulfonyl fluoride, actinomycin D, dithiothreitol, sodium orthovanadate, and bovine serum albumin were products of Sigma-Aldrich. NS-398, N-[2-(4-chlorophenyl)-5-(4-nitrophenyl)-3-methanesulfonylphenyl]butane-1-sulfonamide (PGE₂ L-N⁶-1-aminobiphenyl-3-ol) (P198759, SB203580, KT-5720) (pooled 12-myristerin, 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol, and 1,3-dipalmitoyl glycerol) from Calbiochem (La Jolla, CA), whereas IGF-1 (7982) was from Peptide Technology Meeting, PA. SDS, acrylamide, bisacrylamide, ammonium persulfate, and Bis-100 protein reagent originated from Bio-Lab Laboratories. Tris-base, EDTA, MgCl₂, CaCl₂, chloroform, Me₂SO, anhydrous ethanol (95%), methanol (95%), formaldehyde, and formalin were obtained from Fisher. rhIL-17, rhIL-1 β , rhIL-1 α , rhIL-1 γ , and rhTNF- α were purchased from R & D Systems (Minneapolis, MN). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), phenol-red-free and phenol-red-free DMEM, Trizol reagent, heat-inactivated fetal bovine serum, and anti-bovine mixture (100,000 units/ml penicillin, 100,000 μ g/ml streptomycin) were purchased from Gibco.

Specimen Selection and Cell Culture—Synovial lining cells (human synovial fibroblasts) (HSF) were isolated from synovial membranes (synoviae) and chondrocytes from articular cartilage. Both were obtained

at necropsy from donors with no history of arthritic disease (n = 10; age, 50 \pm 27). Additional experiments were conducted with specimens obtained from OA and RA patients undergoing arthroplasty who were diagnosed based on the criteria developed by the American College of Rheumatology Diagnostic Subcommittee for OA/RA (n = 10; age, 67 \pm 10–67). Human synovial fibroblasts and chondrocytes were released by sequential enzymatic digestion with 1 mg/ml Pronase (Boehringer Applied Science) for 1 h, followed by 6 h with 2 mg/ml collagenase (type IA, Sigma) at 37 °C in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 100 units/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin (35–38). Released HSF were incubated for 1 h at 37 °C in tissue culture flasks (Falcon) (T-25, Falcon, Lincoln Park, NJ), allowing the adherence of nonadherent cells possibly present in the synovial preparation, particularly from OA and RA synoviae. In addition, flow cytometric analysis (Fiji, IL) (Cellular Microscopy) using the anti-CD44 monoclonal antibody (anti-CD44 monoclonal) was conducted to confirm that no monocyte macrophages were present in the synovial preparation (36,38). The cells were seeded in tissue culture flasks and cultured until confluence in DMEM supplemented with 10% FCS and antibiotics at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air. The cells were incubated in fresh medium containing 0.5% fetal bovine serum for 24 h before the experiments, and only second or third passages HSF were used. Human monocyte macrophage cultures were prepared from the freshly drawn blood of healthy volunteers as previously described (14).

Preparation of Cell Extracts and Western Blotting—5 \times 10⁶ μ g of cellular protein extracted in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1% μ g/ml each of aprotinin, leupeptin, and p-pstatin, 1% Nonidet P-40, 1 mM sodium orthovanadate, and 1 mM NaF) or hot SDS-PAGE loading buffer from control and treated cells were subjected to SDS-PAGE through 10% gradient sodium dodecyl sulfate (18 \times 20 cm) under reducing conditions and transferred onto nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech) following blocking with 5% BSA/TBST for 2 h at room temperature, and washing the membrane was incubated overnight at 4 °C with p-tyrosine anti-human COX-2 (1:10,000) (Chemicon) (Chemical City, Ann Arbor, MI, 1:7500) dilution in TBBS containing 0.25% BSA/TBST. The second anti-rabbit antibody-horse radish peroxidase conjugated (1:1000) dilution was subsequently incubated with membrane for 1 h at room temperature, washed extensively for 20–30 min with TBBS, and then rinsed with Tris-buffered saline at room temperature. Following incubation with an ECL chemiluminescence reagent (Amersham Bioscience) the membrane were prepared for autoradiography, exposed to Kodak (Rochester, NY) X-Omat film, and subjected to a digital imaging system (Alpha G-Image 2002; Canberra Packard Canada, Mississauga, Canada) for semi-quantitative measurements. In addition to the anti-COX-2 and COX-1 (Cayman) antibodies, the following polyclonal antibodies were used: New England Biolabs Ltd., Mississauga, ON, Canada: total (independent of phosphorylation state) and anti-phospho-p38 MAPK (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²), anti-phospho-MKK3/6 (Ser^{292/296}), total and anti-phospho-I β (Ser³²), anti-phospho-ATF-2 (Thr^{42/43}), anti-phospho-CREB1 (Ser¹³³), anti-phospho-Jun (Ser⁷³), anti-phospho-I κ B (Ser³⁰⁶), anti-phospho-Mnk1 (Thr^{187/191}), total and anti-phospho-I κ B (Ser³⁰⁶), total and anti-phospho-p44/42 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴), and total and anti-phospho-STAT3 (Ser⁷²⁷).

Northern Blot Analysis of mRNA—Total cellular RNA was isolated (1 \times 10⁶ cells = 10–20 μ g of RNA) using the Trizol (Invitrogen) reagent (generally 1 μ g of total RNA) as described on 1.2% agarose formaldehyde gel and transferred electrophoretically (30 V overnight at 4 °C) to Hybond-N⁺ nylon membrane (Amersham Bioscience) in 0.5% Tris-acetic acid/EDTA buffer, pH 7. After prehybridization for 24 h, the hybridizations were carried out at 50–55 °C for 24–36 h, followed by high stringency washing at 68 °C in 0.1 \times SSPE/0.1% SDS. The following probes labeled with digoxigenin-dUTP by random priming were used for hybridization: human COX-2 cDNA (1.8 kb) (Cayman Chemical) (notably cloned into the EcoRV site of pCDNA3.1-Invitrogen) that was released by *Pst*I and *Xho*I digestion resulting in a 1.2 kb cDNA fragment and a 788-bp *Pst*I/*Xho*I fragment from GAPDH cDNA (1.2 kb, American Type Culture Collection, Rockville, MD) that was initially cloned into a *Pst*I/*Pst*I PPR22 vector. This latter probe served as a control of RNA loading because GAPDH is constitutively expressed in cells used in these experiments. All of the blots were subjected to a digital imaging system (Alpha G-Image 2002; Canberra Packard Canada) for semi-quantitative measurements and changes in COX-2 expression were always considered as a ratio: COX-2/GAPDH mRNA.

Transfection Experiments—Transient transfection experiments were conducted in 6-well or 12-well cluster plates as previously described (31,38). Transfections were conducted using the FuGENE 6™ (Boehringer Applied Science) or LipofectAMINE 2000™ reagents (Invitrogen) method

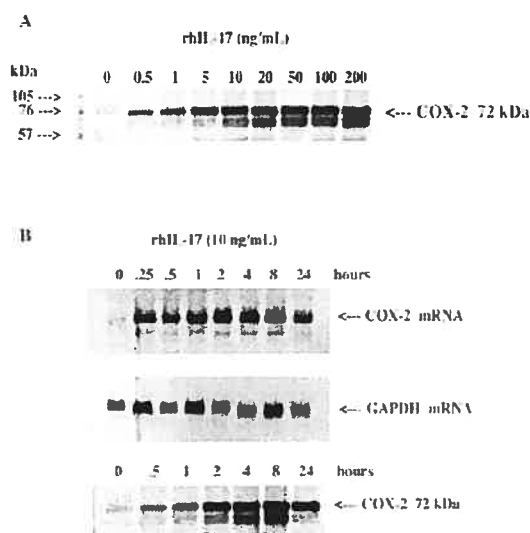


Fig. 1. Dose response (A) and time course (B) of rhIL-17 stimulation of COX-2 protein and COX-2 mRNA. Culture 1 equivalent primary articular HC (1.2×10^6 cells in 6-well culture plates) were pre-incubated for 24 h in DMEM supplemented with 1% FCS plus antibiotics at 37°C to assure confluency and quiescence. The cells were then treated with increasing concentrations of rhIL-17 (0, 200 ng/ml) for 24 h, and for varying time periods (0–24 h). (A) 50 μ g of protein was extracted for protein or RNA. 50 μ g of protein was analyzed for COX-2 protein by Western blotting using a specific polyclonal anti-COX-2 antiserum, whereas 5 μ g of total RNA were analyzed for COX-2 mRNA by Northern hybridization using a specific digoxigenin-labeled cDNA probe as described under “Experimental Procedures.”

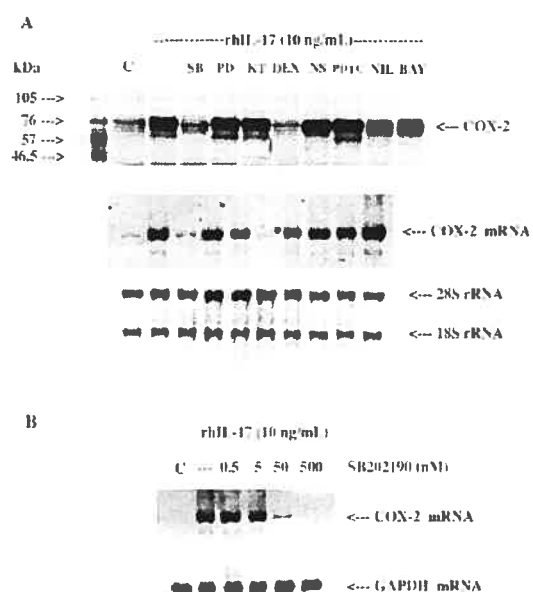


Fig. 2. rhIL-17 stimulation of COX-2 protein and mRNA was blocked by SAPK/p38 MAPK inhibitor (A) in a dose-dependent fashion (B). Quiescent HC were treated with 10 ng/ml rhIL-17 or with 10 ng/ml (50 μ M) of rhIL-17 for 24 h in the presence of either SB202190 (SB, 1 μ M), PD184352 (PD, 50 μ M), KT5720 (KT, 2 μ M), or a PKA inhibitor, dibutyryl cAMP (DEX, 100 nM), NS-398 (NS, 100 nM), or a p38 MAPK inhibitor, PD184352 (PD, 50 μ M), or a MEK1/2 inhibitor, KT-5720 (KT, 2 μ M), or a PKC inhibitor, dibutyryl cAMP (DEX, 100 nM), or a protein kinase C inhibitor, LY294002 (LY, 100 μ M), or an estrogen receptor antagonist, ICI 164,384 (ICI, 1 μ M), or an inositol trisphosphate synthase inhibitor, and Bay 11-7082 (BAY, 5 μ M), or an IKK inhibitor. In B, the cells were incubated with or without rhIL-17 in the absence or presence of increasing concentrations of SB202190. Monolayers were extracted for protein or RNA. 50 μ g of protein was analyzed for COX-2 protein by Western blotting using a specific polyclonal anti-COX-2 antiserum as described under “Experimental Procedures,” whereas 5 μ g of total RNA were analyzed for COX-2 mRNA and GAPDH mRNA by Northern hybridization using specific digoxigenin-labeled cDNA probes.

for each according to the manufacturer's protocol with cells at 0 or and 20, 40, or 80% confluence. The cells were re-exposed to culture medium with 1% FCS for 2 h prior to the addition of the biological factors. Transfection efficiencies were controlled in all experiments by co-transfection with 0.5 μ g of pCMV- β -gal, a β -galactosidase reporter vector under the control of CMV promoter (Stratagene, La Jolla, CA). A COX-2 promoter (-290 to +34)-LUC plasmid was kindly provided by Dr. Stephen Prescott (University of Utah) (29), and site-directed mutagenesis was performed with the *Bac261* COX-2 promoter fragment (-115 to +21) using the QuikChange™ (Stratagene) kit and involved modifying the ATF-CRE site at bp -53/-54 (CA → TC) and the NF- κ B site at bp -215/-216 (CC → GG). Chimeric luciferase reporter plasmids fused with the human COX-2 mRNA 3'-UTR (1451 bp), AU-rich elements (-429 bp) which the first 116 bp contain an AU-cluster, the 3'-UTR minus the AU-rich element cluster, or a construct completely devoid of the COX-2 3'-UTR but containing the SV40 poly(A) signal (49). The plasmids are designated LUC-3'-UTR, LUC-ARE, LUC-ARE, LUC- Δ 3'-UTR, respectively, and were a kind gift of Dr. D. Dixon (University of Utah).

In our signal transduction pathway reporting systems (Stratagene), a reporter plasmid containing the 17-bp (5'-GGATTC) DNA-binding element (EAS) fused to a TATA box upstream from the luciferase gene (pE1-LUC) was co-transfected with a construct containing the transcription domains of transcription factors (e.g., ATF-2 and c-Jun) fused to GAL4 DNA-binding domain and driven by a CMV promoter (e.g., pEA-ATF-2). In addition, plasmids (Stratagene) harboring NF- κ B or mitogen-activated response element enhancer elements fused to a TATA box upstream from the luciferase gene were used to assess transcription processive activation by IL-17 in the cell phenotypes tested. Finally, wild-type and mutant MKK38 expression plasmids (Stratagene) were co-expressed to determine the role of COX-2 expression. The luciferase values, expressed as enhanced relative light units, were measured in a Lumat LB 9597 luminometer (EG&G Stirling) (30) and normalized to the level of β -galactosidase activity optical density at 450 nm after 24 h of media treatment and cellular protein (by mechanical acid precipitation) (30).

RT-PCR for Luciferase and GAPDH—The oligonucleotide primers for PCR were prepared with the aid of a DNA synthesizer (Cyclo-Med, Research Inc., Montreal, Canada) and used at a final concentration of 20 μ M/ml. The sequences for the luciferase primers were as follows: 5'-ATGGATTACAGCGATTTCAGT-3' and 5'-AAGCTTCTAGAAAACAGCTTTC-3' (antisense) for the luciferase fragment of 387 bp (39). The sequences for the GAPDH (which is used as a standard of quantitation) primers were 5'-CAGAACATCATCTCTCT-3' which corresponds to position 691–721 bp of the published sequence, and 5'-GCTTGACAAAATGGGTGTTGAG-3' from positions 901–922 bp for an amplified product of 518 bp (35). Two μ g of total RNA, extracted with the Trizol reagent, was reverse transcribed and then subjected to PCR as previously described (31). RT and PCR assays were carried out with the enzymes and reagents of the GeneAmp RNA PCR kit manufactured by PerkinElmer Life Sciences. Both the RT and PCR reactions were done in a GeneAmp Controller (Amersham Biosciences).

The amplification process was conducted over 10–50 cycles to define the linear range of product amplification. The first cycle consisted of a denaturation step at 95°C for 1 min, followed by annealing and elongation at 60°C for 30 s, and 72°C for 1.5 min, respectively. All subsequent cycles were conducted under the same conditions, with the exception of the last cycle, when the elongation step was extended to 7 min. We found a linear range of luciferase 3'-UTR cycle log cycle numbers between 1 and 17, as such we chose 11–13 cycles depending on the type of experiment.

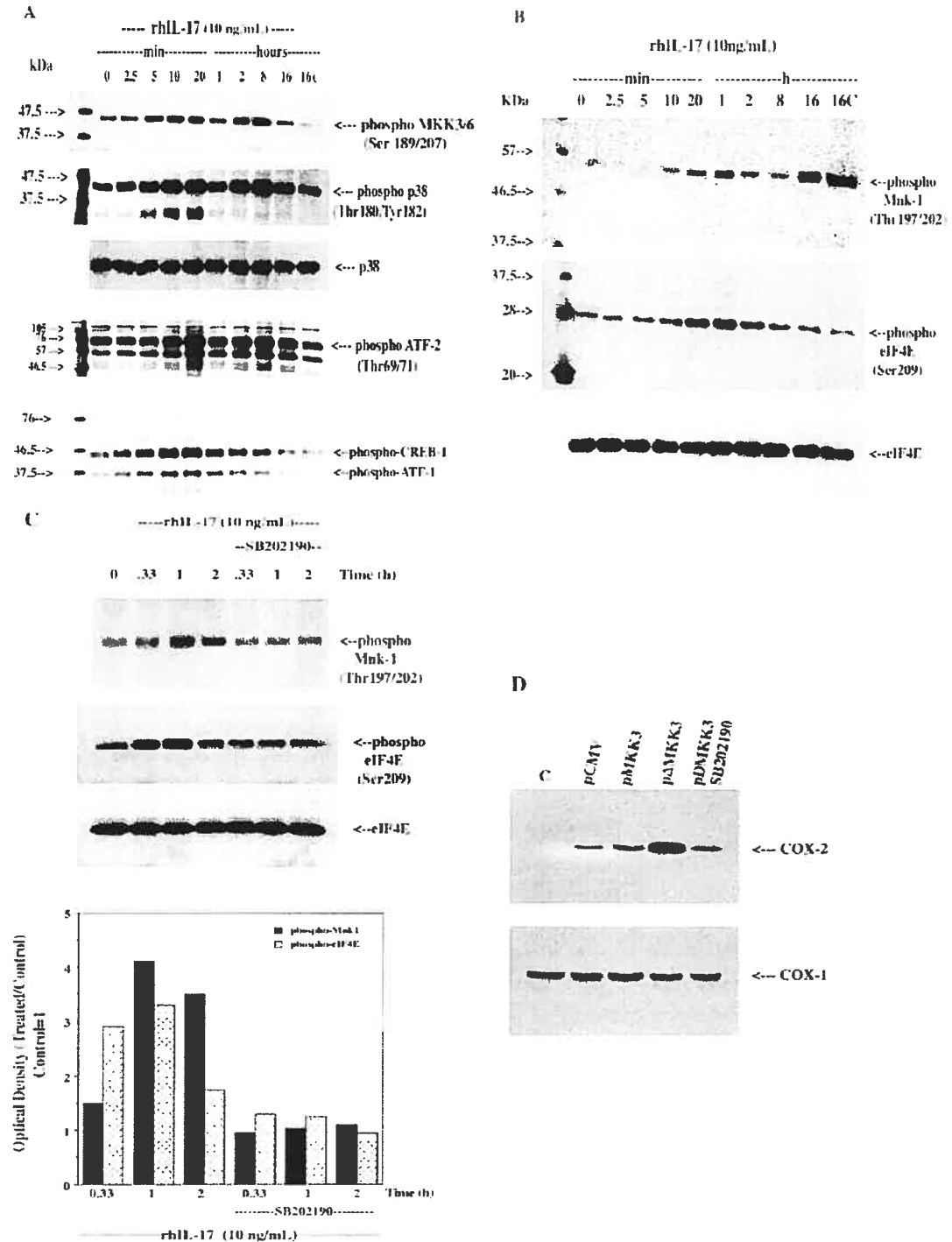


FIG 3. Time course of SAPK2/p38 MAPK cascade activation by rhIL-17. **A** and **B** (upper) in HeLa cells (1 × 10⁶) during time periods up to 16 h. **IF-4E** in a control with 10 ng/ml (57 μM) rhIL-17 (*top panel*). Monoclonal antibodies for protein and 20 μg were analyzed for total and phospho-SAPK2/p38 MAPK intermediates by Western blotting using anti-phospho-p38 MAPK

The PCR products were analyzed and verified by electrophoresis on 1.5% agarose gels in a Tris-borate-EDTA buffer system as previously described [34]. All gel photos were subjected to a digital imaging system (also used for semi-quantitative measurements) and the results were expressed as a ratio of luciferase/GAPDH PCR fragments.

Extraction of Nuclear Proteins and EMSA Experiments.—Confluent control and treated cells in 24-well cluster plates (4.5×10^6 cells/well) were completely scraped into 1.5 ml of ice-cold phosphate-buffered saline and pelleted by brief centrifugation. The nuclear extracts were prepared as previously described [36].

Double-stranded oligonucleotides containing wild-type and mutant sequences were from Invitrogen, annealed in 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 M NaCl, 10 mM EDTA buffer at 95 °C for 10 min, cooled for 1–2 h at room temperature, and finally end-labeled with γ - 32 P-ATP using T4 polynucleotide kinase (Promega, Madison, WI). The sense sequences of the oligonucleotides tested were as follows: NF- κ B (COX-2): 5'-CAAGAGAGTGGGAGCTACCGCTCTGTGGTCC-3', NF- κ B mut: 5'-CAAGAGAGTGGGAGCTACCGCTCTGTGGTCC-3', ATF-2/CRE (COX-2): 5'-GGGCGGAAAGAAAAGCAAGTCATTTCGTCAACATGGGCTTGGCG-3', ATF-2/CRE mut: 5'-GGGCGGAAAGAAAAGCAAGTCATTTCGTCAACATGGGCTTGGCG-3', NF- κ B: 5'-CTAAGGCTTGGCGCAATCTATATTCG-3', and NF- κ B mut: 5'-CTAAGGCTTGGCGCAATCTATATTCG-3'. Binding buffer consisted of 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 0.5 mM dithiothreitol, 0.1 mM DTT, 1 mM MgCl₂, F-activated and 2.5 μ g of poly(dI-dC). The binding reactions were conducted with 15 μ g of nuclear extract (\pm 1 μ g c-EBP α / β or γ 8 antibodies in supershift analysis) and 100,000 cpm of 32 P-labeled oligonucleotide probes at 22 °C for 20 min in a final volume of 10 μ l. The binding complexes were resolved on 4.5% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis through 8% gels in a Tris-borate buffer system, after which the gels were fixed, dried, and prepared for autoradiography.

Statistical Analysis.—All of the results were expressed as the means \pm S.D. or the means and the coefficient of variation of three to five separate experiments as indicated. The transfection experiments were performed in triplicate. Statistical treatment of the data was performed parametric (Student's *t* test) or by nonparametric (Mann-Whitney) analysis if Gaussian distribution of the data could not be confirmed. Significance was acknowledged when the probability that the Null Hypothesis was satisfied at $<5\%$.

RESULTS

Recombinant Human IL-17 Induction of COX-2 mRNA Expression and Synthesis: Time and Dose Dependence.—To better characterize the properties of IL-17 cell signaling, we performed both dose-response and time course studies on the induction of the COX-2 gene. As shown in Fig. 1A, the EC₅₀ for rhIL-17-dependent COX-2 protein synthesis in our HC culture system was ~ 10 ng/ml ($n = 3$), and as such, this concentration was chosen for all subsequent experimentation unless otherwise indicated. Time-course studies revealed that increases in COX-2 mRNA expression reached 2.1-fold at 15 min and greater than 7-fold after 2 h, attained steady state at 4–8 h, and thereafter declined very gradually for the next 16 h as shown in Fig. 1B. In fact, COX-2 mRNA was detectable within 5 min after rhIL-17 treatment (data not shown). The induction of COX-2 protein was perceptible within 30 min following stimulation with rhIL-17 and thereafter followed a pattern of biosynthesis closely resembling COX-2 mRNA expression. Similar experiments conducted with HSF and human macrophages yielded identical results (data not shown). The rhIL-17-stimulated PGE₂ release profile indicated that cyclooxygenase levels were increased after 1 h and by 21 h more than 30 ng/10⁶ cells were detected ($n = 3$).

SAPK2/p38 MAPK Activity and rhIL-17-dependent Regulation of COX-2 Gene Expression.—Previous studies in our laboratory and others demonstrate that IL-17 may signal through activation of MAPK (α , β , p44/2 MAPKs) and/or NF- κ B cascades, although it is presently unclear how the COX-2 gene responds [12, 14, 20]. To delineate post-receptor signaling pathways activated by IL-17, we chose, as a first approach, to use cell-permeable chemical inhibitors. As shown in Fig. 2A, SB202190 (SB), SAPK2 α / β /p38 α / β MAPK inhibitor, suppressed rhIL-17-induced COX-2 mRNA and protein synthesis by $\sim 90\%$ ($87 \pm 9\%$, mean \pm S.D., $n = 4$). PGE₂ release was suppressed by greater than 95% (data not shown). The MEK1/2 inhibitor PD8059, and the *l*-lysine kinase inhibitor, Bay 11-7802, were without significant effect, whereas the PKA inhibitor KT-5720 had a modest albeit inconsistent inhibitory activity. The clinically useful anti-inflammatory steroid, dexamethasone completely suppressed rhIL-17-induced COX-2 mRNA and protein synthesis, whereas pyrroloindole-carbamate, and L-Ascorbyl-2-phosphate, inhibitors of reactive oxygen radicals and nitric oxide production respectively, were seemingly without effect (Fig. 2A). We previously reported that IL-1 induction of the COX-2 gene was mediated by a PGE₂-dependent feedback mechanism and as such could be abrogated by co-medicating IL-1 with a pro-inflammatory COX-2 inhibitor like NS-398 [34]. The present data show that NS-398 does not block to any significant degree the rhIL-17 induction of the COX-2 gene (Fig. 2A). Identical results were obtained with HSF in culture (data not shown).

Given the apparent role of SAPK2/p38 in the induction of COX-2 by rhIL-17, we endeavored to determine the degree of sensitivity of the inductive process to SB202190 by carefully controlled dose-response studies. As shown in Fig. 2B, the inhibitor blocked rhIL-17 stimulation of steady-state levels of COX-2 mRNA in a dose-dependent fashion, and the IC₅₀ calculated by plotting the log optical density COX-2/GAPDH mRNA versus the concentration of SB202190, was 36 ± 1 nM ($n = 3$).

Cell Signaling by rhIL-17 Is Restricted to the SAPK2/p38 MAPK Cascade.—To pursue further the results obtained with regard to rhIL-17 and SAPK2/p38 activation, we performed additional investigative experimentation. As shown in Fig. 3A, rhIL-17 triggered a bi-phasic pattern of MKK36 (Ser^{189/207}), and SAPK2/p38 phosphorylation with the initial phase reaching a zenith at 20 min and then falling to essentially control levels within the next 40 min (*i.e.* 1 h post-stimulation). The second phase was initiated within the next 60 min (*i.e.* 2 h post-stimulation) and attained a maximum at 8 h. There were no changes in the cellular protein level of SAPK2/p38 (Fig. 3A). In addition, ATF-2, a transcription factor whose transcriptional activity is modulated by phosphorylation at Thr⁶⁹ and Thr⁷¹ by SAPK2/p38 (11), was phosphorylated at the latter sites in a time course essentially identical to that of SAPK2/p38/MKK36 (Fig. 3A). A similar pattern was observed with CREB-1/ATF-1 (Ser¹³³) phosphorylation following IL-17 stimulation, although the second phase was less evident. Fragmentation of both SAPK2/p38 and ATF-2 was observed in the initial phosphorylation phase. The downstream kinases MAPK-APK2 and MSK1

(Thr¹⁸⁹/Tyr¹⁹²), anti-phospho-MKK36 (Thr¹⁸⁹/Tyr¹⁹²), anti-phospho-Mnk1 (Thr^{189/207}), anti-phospho-IF-4E (Ser²⁰⁷), anti-phospho-CREB-1 (Ser¹³³), and anti-phospho-ATF-2/Thr^{69/71}. In C, the cells were treated with 10 ng/ml (50 pmol/l) of rhIL-17 in the absence or presence of 0.1 μ M of SB202190 for 0, 1, and 2 h, after which time the cell extracts were prepared for Western blotting (top panel) using anti-phospho-Mnk1 (Thr^{189/207}), anti-phospho-IF-4E (Ser²⁰⁷), and total anti-IF-4E. Bottom panel, densitometric scanning was performed on Western blots using a range of two dilutions with a coefficient of variation of 11.7%. In D, the cells were plated at 10⁶ cells/ml in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 100 units/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin and transfected with 50 ng each of pCMV-p38/MKK36, Δ MKK36, or Δ MKK36 in the presence of 0.1 μ M of SB202190. The cells were lysed after 24 h and COX-2 and COX-1 were analyzed by Western blotting using specific antisera as described under Experimental Procedures.

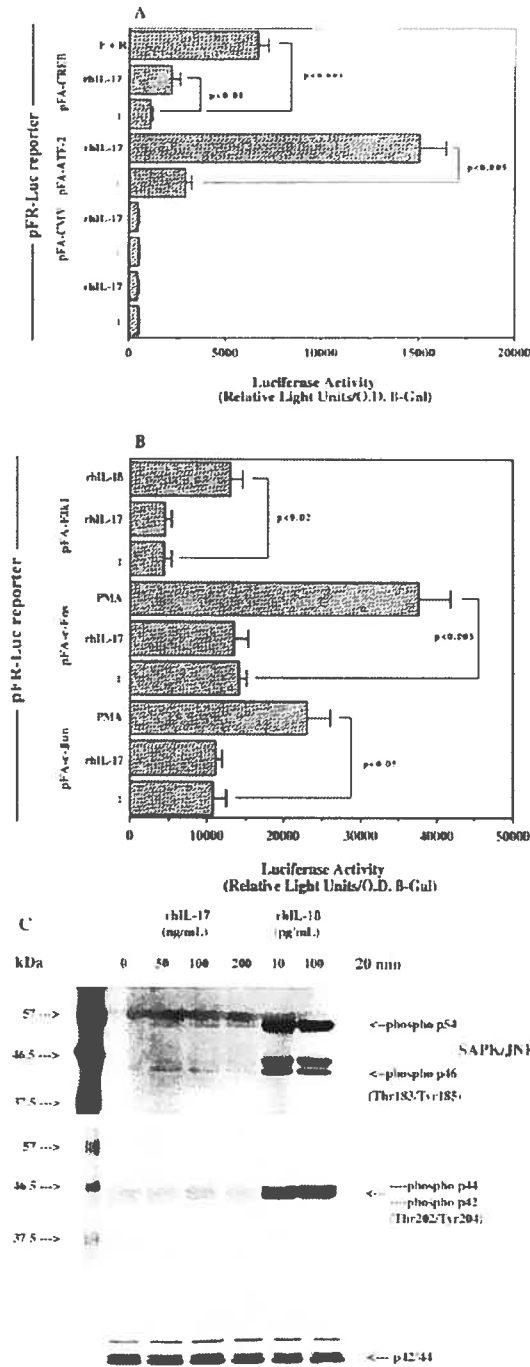


Fig. 1. rhIL-17 stimulation of ATF-2/CREB-1 transactivation. HSF1 was plated in 12-well cluster plates at 30% confluence in complete

medium and then cotransfected with 1 μ g of pFR-Luc reporter, 0.5 μ g of pCMV- β -gal, and 50 ng each of pFA-CMV, pFA-ATF2, pFA-CREB-1 (A), pFA-c-Jun, pFA-c-Fos, or pFA-ELK1 (B) as described under "Experimental Procedures." After 24 h, the cells were stimulated for 6 h with or without rhIL-17 (10 ng/ml) or forskolin (10 μ M) alone and rolipram (100 μ M) alone, phorbol 12-myristate 13-acetate (200 nmol/l) or rhIL-1 β (100 pg/ml) as indicated in Fig. 3. The cells were lysed, and the luciferase activity, β -gal activity, and protein content were determined as described under "Experimental Procedures." The values are expressed as the mean \pm S.D. of three determinations in triplicate of luciferase activity (relative light units) divided by β -gal activity (optical density). Probabilities (p) were determined by Student's *t* test. In C, equivalent IC was treated for 20 min with rhIL-17 (100 ng/ml) or rhIL-1 β (100 pg/ml). Monolayers were extracted for protein, and 50 μ g were analyzed for total and phosphorylated ERK1/2 (p42/44) or phospho-JNK (p38) by Western blotting using specific rabbit polyclonal anti-

sera were not phosphorylated by rhIL-17 treatment, although the proinflammatory cytokine rhIL-1 β phosphorylated both (data not shown). The MAPK signal-integrating kinase-1 (Sik1) and its putative substrate, the eukaryotic initiation factor 4E (eIF-4E), were avidly phosphorylated by rhIL-17 at Thr^{197/202} and Ser²⁰⁹, respectively (Fig. 3B). The latter rhIL-17-induced post-translational modifications were substantially blocked in the presence of SB202190 (Fig. 3C). Finally, overexpression of a constitutively activated MKK3 construct (p Δ MKK3) stimulated COX-2 protein synthesis, an effect completely abrogated by SB202190 (Fig. 3D). To confirm whether rhIL-17 could increase the transactivational capacity of ATF-2, we conducted experiments in which a luciferase reporter construct harboring 7 \times -flanking GAL1 DNA-binding element (45 \times) was co-transfected with a chimeric plasmid containing the N-terminal (1-96) ATF-2 transactivation domain fused to GAL1 DNA-binding domain and driven by a CMV promoter. When the cells were then incubated with rhIL-17 for 6 h, a 5.3 \pm 0.7 increase (*n* = 3, mean \pm S.D.) in luciferase activity was observed (Fig. 4A), an effect completely blocked by co-transfections with SB202190 (control, 2898 \pm 312 RLU; SB202190, 2689 \pm 675 RLU). This response was quite specific because when co-transfections were performed with chimeric constructs containing the transactivation domain of c-Jun (1-223), c-Fos (296-313), or Elk-1 (307-428), no increases in luciferase activity were observed following rhIL-17 stimulation. In contrast, phorbol 12-myristate 13-acetate potently stimulated transactivation by c-Fos and c-Jun, whereas rhIL-1 β activated the transactivational capacity of Elk-1 (Fig. 4B). Interestingly, rhIL-17 stimulated reporter transactivation by CREB by a modest but statistically significant 2.1 \pm 0.2, whereas the combination of forskolin (adenylylate cyclase activator) and rolipram (cAMP-dependent phosphodiesterase type IV inhibitor) provoked a 6.2 \pm 0.5 (*n* = 3, mean \pm S.D.) increase (Fig. 4A). The absence of induction by rhIL-17 of c-Jun, c-Fos, or Elk-1 transactivational activity was supported by the observations that the cytokine had little or no effect (in contrast to rhIL-1 β) on the phosphorylation activity of the signaling intermediates ERK1/2 and JNK, which are known to phosphorylate and increase the transactivational capacity of the latter transcription factors [2, 43] (Fig. 4C).

Many studies have suggested that the IL-17 signal is transduced by the JAK/STAT and NF- κ B cascades in a variety of cell types [2, 20, 25]. To address this issue in the context of our cell culture models and the control of COX-2 gene expression, we measured the phosphorylation/activation state of critical intermediates and performed transactivational analysis with reporter constructs. As shown in Fig. 5A, rhIL-17 weakly stimulated the phosphorylation of I κ B α , which reached a maximum after 10 min with no measurable change in total cellular I κ B α . In contrast, TNF- α , a prototypical proinflammatory cytokine

medium and then cotransfected with 1 μ g of pFR-Luc reporter, 0.5 μ g of pCMV- β -gal, and 50 ng each of pFA-CMV, pFA-ATF2, pFA-CREB-1 (A), pFA-c-Jun, pFA-c-Fos, or pFA-ELK1 (B) as described under "Experimental Procedures." After 24 h, the cells were stimulated for 6 h with or without rhIL-17 (10 ng/ml) or forskolin (10 μ M) alone and rolipram (100 μ M) alone, phorbol 12-myristate 13-acetate (200 nmol/l) or rhIL-1 β (100 pg/ml) as indicated in Fig. 3. The cells were lysed, and the luciferase activity, β -gal activity, and protein content were determined as described under "Experimental Procedures." The values are expressed as the mean \pm S.D. of three determinations in triplicate of luciferase activity (relative light units) divided by β -gal activity (optical density). Probabilities (p) were determined by Student's *t* test. In C, equivalent IC was treated for 20 min with rhIL-17 (100 ng/ml) or rhIL-1 β (100 pg/ml). Monolayers were extracted for protein, and 50 μ g were analyzed for total and phosphorylated ERK1/2 (p42/44) or phospho-JNK (p38) by Western blotting using specific rabbit polyclonal anti-

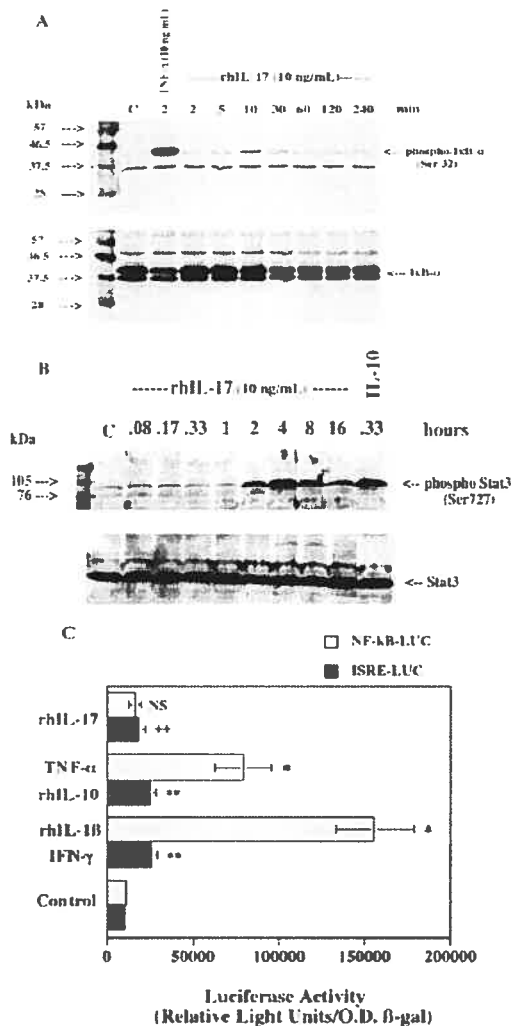


Fig. 5. Role of NF- κ B and JAK/STAT cascades as mediators of rhIL-17 induction of the COX-2 gene. Quiescent confluent IIC were treated with 10 ng/ml of rhIL-17 from 0 to 240 min or for 2 min with 10 ng/ml of TNF- α (A). Alternatively, the cells were exposed to 10 ng/ml of rhIL-17 for 0–36 h or with rhIL-10 (1 ng/ml) for 20 min (B). Monolayers were extracted for protein and prepared for Western blotting and probed with specific anti-phospho-I κ B α and anti-I κ B α (A) or anti-phospho-STAT3 and anti-STAT3 (B) antibodies as indicated. The blots are representative of three separate experiments that gave essentially identical results. In C, the cells were transfected with 1 μ g each of either 5 \times NF- κ B-tata-LUC or 5 \times interferon-stimulated response element-tata-LUC and 0.5 μ g of pCMV- β -gal as described under “Experimental Procedures.” The cells were then exposed to either rhIL-17 (10 ng/ml), rhTNF- α (10 ng/ml), rhIL-10 (1 ng/ml), or interferon- γ (1 ng/ml) for 6 h. The cells were lysed and prepared for measurement of luciferase activity, β -gal activity, and protein content as described under “Experimental Procedures.” The values are expressed as the mean \pm S.D. of four determinations in triplicate of luciferase activity or β -gal activity (units/OD β -gal activity optical density). Probability *p* values were performed by Student’s *t* test.

and potent activator of the NF- κ B cascade potently induced I κ B α phosphorylation in less than 2 min with a concomitant reduction in total I κ B α of more than 50%. Interleukin-17 stim-

ulated a time-dependent phosphorylation of the transcription factor STAT3 (but not STAT1) with detectable Ser⁷²⁷ phosphorylation observed between 1–2 h, a zenith at 4 h, and gradual decay thereafter. The prototype STAT inducer IL-6 caused a similar magnitude of phosphorylation but much sooner (after 20 min) (Fig. 5B). Furthermore, although TNF- α stimulated a 7–10-fold increase in luciferase activity in cells transfected with a reporter construct harboring five tandem NF- κ B consensus sequences, rhIL-17 had no statistically significant effect (Fig. 5C). However, when identical protocols were repeated in transiently transfected HSE, rhIL-17 increased reporter activity by 1.78 \pm 0.31-fold (n = 4 determinations) 6 h post-stimulation, rhIL-10, interferon- γ and rhIL-17 all increased luciferase activity to a significant degree in cells transfected with a reporter construct harboring five interferon-stimulated response element tandem sequences (Fig. 5C).

COX-2 Promoter Studies. To examine for elements of transcriptional control of the COX-2 gene via rhIL-17-stimulated SAPK2/p38 signaling, we conducted transient transfection analyses with a 116-bp *hSca3961* site human COX-2 promoter construct harboring enhancer elements (-11, -45) for critical transcription factors including a ATF/CRE site (-58 to -73). We observed that rhIL-17 (10 ng/ml) stimulated a human COX-2 promoter-luciferase reporter construct by 1.76 \pm 0.11 (mean \pm S.D., n = 3, 5-fold) (Fig. 6A). SB202190 abolished the induction completely (control, 11,739 \pm 1,452 versus rhIL-17, 20,630 \pm 1,291; rhIL-17 + SB202190, 7,635 \pm 987 RLU). Companion experiments with a ATF/CRE mutant plasmid (see “Transfection Experiments” under “Experimental Procedures”) revealed that the reporter activity was considerably lower than wild-type promoter plasmid (mutant, 6,722 \pm 911 versus wild type (control), 11,739 \pm 1,452 RLU, mean \pm S.D., n = 3) and was refractory to rhIL-17 (control, 6,722 \pm 911 versus rhIL-17, 6,915 \pm 753 RLU, mean \pm S.D., n = 3). To assess the role of ATF-2 in transcriptional activation of the COX-2 promoter, we used a previously described assay strategy (16) in which the chimeric plasmid containing the N-terminal (1–95) transactivation domain of ATF-2 fused to the GAL4 DNA-binding domain was over-expressed prior to rhIL-17 stimulation. As can be seen in Fig. 6A, rhIL-17 induction of luciferase activity was completely suppressed, and indeed luciferase activity was observed to be below control values. Forced expression of other transcription factor-GAL4 chimeras were without effect with the exception of pEA-CREB, where 39.2 \pm 3.15% of rhIL-17-stimulated luciferase activity was blocked (Fig. 6A).

Mutating the more proximal NF- κ B site (-223/-214) in the human COX-2 promoter construct was without effect in terms of basal and IL-17-stimulated luciferase activity (control, 10,639 \pm 1,975 versus rhIL-17, 18,332 \pm 2,070 RLU, 1.72 \pm 0.13-fold increase, n = 3; compare with wild type, see above) when transfections were performed with human chondrocytes. However, when HSE were used with the same protocol, basal reporter activity was reduced but not the level of rhIL-17 induction (control, 8,117 \pm 1,121 versus rhIL-17, 14,968 \pm 2,114 RLU, 1.85 \pm 0.14-fold increase).

EMSA experiments using ³²P-labeled ATF/CRE (COX-2) oligonucleotides indicated a high level of endogenous nuclear protein binding that was increased with rhIL-17 treatment (Fig. 6B, upper panel). Basal and induced binding was displaced by adding 10-fold excess cold oligonucleotide but not by the mutant oligonucleotide (see above ATF/CRE mutant COX-2 promoter studies). Furthermore, the addition of SB202190 abrogated induced and, to a large extent, basal oligonucleotide binding. Confirming promoter studies, rhIL-17 stimulation of human chondrocytes produced no increases in ³²P-labeled NF- κ B (COX-2) oligonucleotide binding in contrast to TNF- α

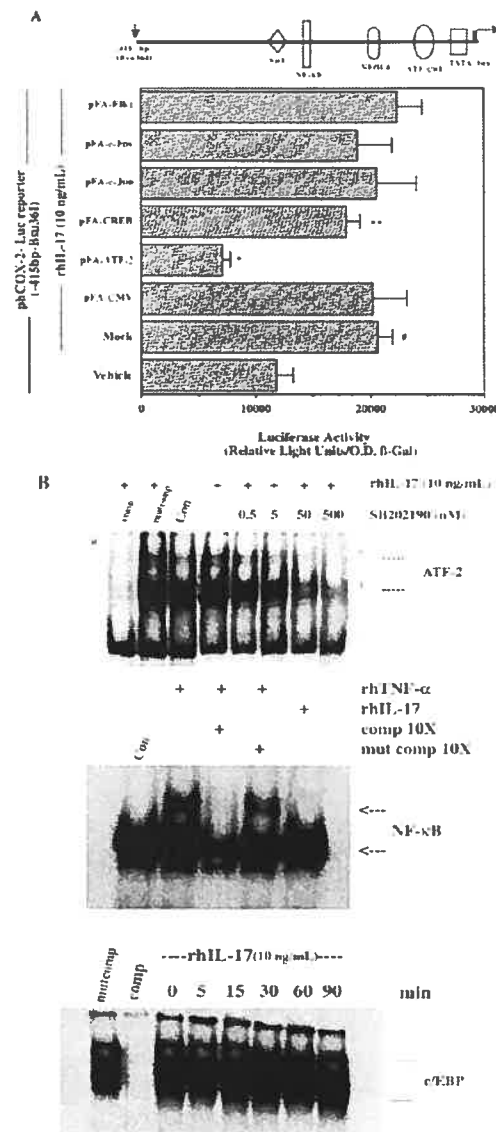


Fig. 6. rhIL-17 induction of the COX-2 promoter is dependent on SAPK2/p38 MAPK activation and ATF-2 transactivation. **(A)** EMSA profiles of rhIL-17-stimulated DNA binding protein (B) HSF were plated in 12-well cluster plates at 75–100 cells/well in complete medium and the reporter construct with 1 μ g of a human COX-2 promoter construct containing a portion of the proximal promoter fused to a luciferase reporter construct (β gal381 fragment –115–146 COX-2 3' UTR reporter) (5 μ g) of pCMV- β gal and 70 ng each of pFA-CMV, pFA-ATF-2, pFA- κ Bm, pFA- κ Bm, pFA-C/ER, and pFA-CMV as described under "Experimental Procedures." After 24 h, the cells were stimulated for 6 h with rhIL-17 (10 ng/ml) and lysis, and the luciferase activity, β -gal activity, and protein content were determined as described under "Experimental Procedures." The values are expressed as the mean \pm S.D. of three to five determinations in triplicate. Luciferase activity or relative light units derived by β -gal activity (optical density). Prebinding assays were performed by Student's *t* test. In **(B)** nuclear extracts were prepared from human chondrocytes treated by vehicle (*Con*) controls and 17 μ g of protein was incubated with

(Fig. 6B, middle panels). The human COX-2 promoter harbors a proximal NF- κ B site that binds cEBP transcription factors as either homodimers or heterodimers with other transcription factors (e.g., NF- κ B) and can increase transcriptional activation (11, 15). Time course studies revealed that rhIL-17 increased NF- κ B binding after 30 min, reached a zenith after 60 min, and thereafter declined so that at 90 min binding to the oligonucleotide was similar to control (Fig. 6B, lower panels). Super-shifts with antibodies to the different isoforms of cEBP (see "Experimental Procedures") confirmed the presence of cEBP β only (data not shown).

Interleukin-17 Stabilizes COX-2 mRNA.—Judging by the accumulated data (see above), it is unlikely that IL-17 modifies steady-state COX-2 mRNA expression in our cell culture models exclusively at the transcriptional level. As such, we examined post-transcriptional mechanisms involving strictly message stabilization and protein synthesis. As a first approach, we employed classical techniques involving measuring COX-2 mRNA in transcriptionally arrested cells (actinomycin D) in the absence or presence of rhIL-17. We had previously reported (54) that when HSF are activated with rhIL-1 β for 3–4 h (steady state) followed by wash-out and a fresh change of medium, the elevated levels of COX-2 mRNA declined rapidly such that within 2 h the levels were similar to control (non-stimulated) cells ($t_{1/2} = 0.85$ h). However, if PGE $_2$ was added to fresh medium in the presence of actinomycin D, COX-2 mRNA levels remained elevated ($t_{1/2} = 11$ h) (54). Similarly, as represented in Fig. 7, rhIL-17 stabilized COX-2 mRNA and increased its half-life to 5.8 h (based on multiple linear regressions of optical density of COX-2 mRNA *versus* time; $n = 3$, $r = 1.1-0.995$). The stabilizing effect was abrogated by coin-cubations with SB202190. We included PGE $_2$ in these experiments as a positive control and for purposes of comparison.

As mentioned earlier, the COX-2 mRNA has multiple copies of the Shaw-Kamen AU-rich sequences that are believed to influence message stability. Recent studies (10, 17) have provided evidence that the AU-rich elements (in the first 116 bp of the 3' UTR) may mediate COX-2 mRNA instability, whereas we recently reported that proximal but also distal sequences mediate PGE $_2$ -dependent stabilization (34). To determine whether rhIL-17-dependent COX-2 mRNA stabilization was manifested through the 3' UTR sequences, we transfected HSF with CMV-driven chimeric expression constructs containing luciferase cDNA (reporter) fused 3' to the human COX-2 3' UTR (Luc/3' UTR), AU-rich region (Luc+ARE), AU-deleted region (Luc Δ ARE/3' UTR), or complete removal of the 3' UTR region (Luc Δ 3' UTR). As shown in Fig. 8A, cells transfected with Luc Δ 3' UTR were refractive to any kind of modulation. However, rhIL-17 increased luciferase activity 3–14-fold ($n = 5$) in cells transfected with Luc/3' UTR and Luc Δ ARE/3' UTR constructs but not with Luc+ARE. If the cells were washed out, and fresh medium was added, luciferase activity decreased dramatically after 1 h. The latter decrease could be mitigated with the addition of rhIL-17, a response that was apparently SAPK2/p38-mediated as the induction was abrogated by coin-cubations with SB202190. We obtained similar results with PGE $_2$, included as a positive control, with the sole difference being that the ARE-rich region of the 3' UTR is also sensitive to exogenous stimulation (Fig. 8A).

Although COX-2 mRNA stabilization and protein synthesis are closely coupled in our cell culture models, we verified

⁵⁴Plotted in ATF-2/ER (top panels), NF- κ B (middle panels), or NF- κ B (bottom panels) oligonucleotide for 20 min at 22°C. The binding reaction mixtures were subject to EMSA analysis as described under "Experimental Procedures."

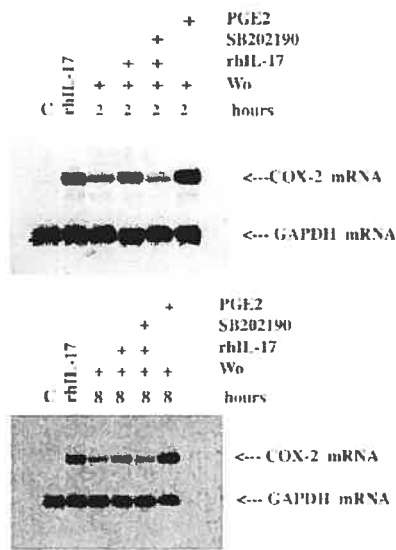


Fig. 7. rhIL-17 stabilizes COX-2 mRNA: role of SAPK2/p38 MAPK. Quiescent HSF were treated with *in vitro* (C) or with 10 ng/ml of rhIL-17 for 6 h (steady state) after which time cells were washed out and treated with a medium (P) (1 μ M/ml) for 30 min, and then fresh medium was added containing either vehicle (Wo), rhIL-17 (10 ng/ml), rhIL-17 + SB202190 (1 μ M), or PGE₂ (100 ng/ml) for 2 h, an additional 2 (short) or 8 h (long) of stimulation. Media/livers were extracted for RNA at each time point, and 5 μ g of total RNA were analyzed for COX-2 mRNA and GAPDH mRNA by Northern hybridization using specific digoxigenin-labeled cDNA probes.

whether our reporter system (i.e., luciferase protein activity) and mRNA exhibited similar coordination. As shown in Fig. 8B, in cells transfected with Luc3'-UTR and stimulated with rhIL-17, luciferase mRNA decayed rapidly under wash-out conditions but was stabilized with the addition of rhIL-17. Densitometric scanning analysis ($n = 4$) revealed a $t_{1/2}$ for luciferase mRNA of under wash-out conditions of about 0.78 h ($\alpha = 2.15 \pm 1.38\%$) and $t_{1/2}$ in the presence of rhIL-17 of ~ 6.2 h ($\alpha = 2.1 \pm 0.19\%$). As shown in Fig. 8B, the addition of SB202190 blocked the stabilizing effect of rhIL-17.

DISCUSSION

The preponderance of data suggests that IL-17 is integrated into the immune and inflammatory response at a much higher level of hierarchy than previously thought. In inflammatory diseases like RA, T-cells infiltrate the synovial membrane, and tissue pathogenesis occurs through complex cell-cell and cell-humoral interactions [48–50]. In this model, T-cells initiate the inflammatory cascade by producing, among other factors, IL-17, which provokes resident target cells to produce pro-inflammatory cytokines, chemokines, adhesion molecules, matrix destructive metalloproteinases, acute phase proteins, lipid mediators, and free radicals.

Normally not expressed in quiescent connective tissue cells or monocytes, the elevated levels of COX-2 mRNA, COX-2 protein, and PGE₂ release observed in arthritis-affected synovial membranes have also been associated etiologically with the disease process [29, 30, 51]. It has been suggested that the synovium, whether in a disease or normal state, is a PGE₂-dependent tissue and that COX-2 behaves as a "master control gene" [51, 52]. Thus, understanding the mechanisms responsible for dysregulating COX-2 expression is of considerable clinical

concern, and the role of IL-17 in this regard takes on added significance from a therapeutic perspective.

To our knowledge, this is the first report associating IL-17 action with post-transcriptional/translational control of any target gene, although the SAPK/p38 pathway is connected with both levels of control, as was shown previously [33, 34, 47, 53]. The biphasic pattern of MKK3/6/SAPK/p38/ATF-2 phosphorylation induced by rhIL-17 was observed previously with rhIL-1 β , and the second phase was attributed to ambient accumulation of PGE₂ [34]. A bifurcation of the IL-17-induced signaling pathway to Mnk1 occurs in a slower time frame (maximum 1 h) than MKK3/6/SAPK/p38/ATF-2 but is coincident with the Ser²⁰⁹ phosphorylation of the CAP (N⁷-methylguanosine-binding protein, eIF-4E). The latter post-translational modifications of both Mnk1 and eIF-4E were apparently p38 MAPK-dependent and suggested a link between IL-17 action and translational control. However, because the role of eIF-4E phosphorylation in translational control mechanisms is unclear [54–56], and more targeted experimentation is required, such a suggestion would be premature. Perhaps paradoxically, phosphorylation of eIF-4E is sometimes associated with a global inhibition of protein synthesis observed during cell stress or serum deprivation [57–59]. This would provide a reasonable explanation for the conspicuous phosphorylation of eIF-4E after 16 h in our quiescent cultures (i.e., serum) both in control and rhIL-17-treated wells (Fig. 3B).

Previous studies, using transformed cell lines for the most part, emphasized the role of proximal, AU-rich containing sequences in mediating COX-2 mRNA instability [60–63]. Pro-inflammatory cytokines, through SAPK/p38 activation, increase steady-state levels of COX-2 mRNA by stimulating the production of cognate RNA-binding proteins (e.g., HuR) that mitigate, through sequence-specific binding, mRNA degradation (Ref. 60; reviewed in Ref. 61). The precise mechanisms, however, remain ill-defined. We find that distal sequences were exclusively reactive to the stabilizing effects of IL-17 both in terms of mRNA stabilization and protein synthesis in our primary cell culture models. Indeed, the absence of the AU-rich element (12^U nucleotides) had no effect on IL-17-dependent stabilization. Thus, the IL-17-modulated RNA-binding protein repertoire is likely to be different from that of other cytokines. In transient transfections of HSF with expression constructs of known RNA-binding proteins (AUF1, HuR, and tristetraprolin), only tristetraprolin destabilized distal COX-2 3'-UTR reporter constructs [65].² Interestingly, tristetraprolin is targeted by SAPK/p38 for phosphorylation [66], which may alter its RNA binding properties and function.

There are a number of cis-elements found in the promoter region of the COX-2 gene that may exert transcriptional control of which ATF/CRE, c/EBP β (–132–121), and both NF- κ B sites (–223–214 and –145–127) are the best studied [44, 45, 66]. In our cell culture models, mutating the ATF/CRE site alone, is apparently sufficient to abrogate IL-17 induction of COX-2 promoter activity and also to reduce basal promoter activity compared with wild type. In many cell types, the ATF/CRE site is activated by homodimers and heterodimers of c-Jun, c-Fos, and ATF/CREB family members subsequent to serum, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, or growth factor stimulation [65, 67]. However, rhIL-17 does not stimulate the transactivating capacities of Fos/Jun proteins but clearly favors those of ATF-2 and CREB-1. Decay ATF-2 overexpression reduced all of the induced (partial reduction with CREB-1) and some of the basal COX-2 promoter activity, although this does not neces-

² W. H. Faour, A. Mancini, G. W. H. Lee, and J. A. Di Battista, unpublished observations.

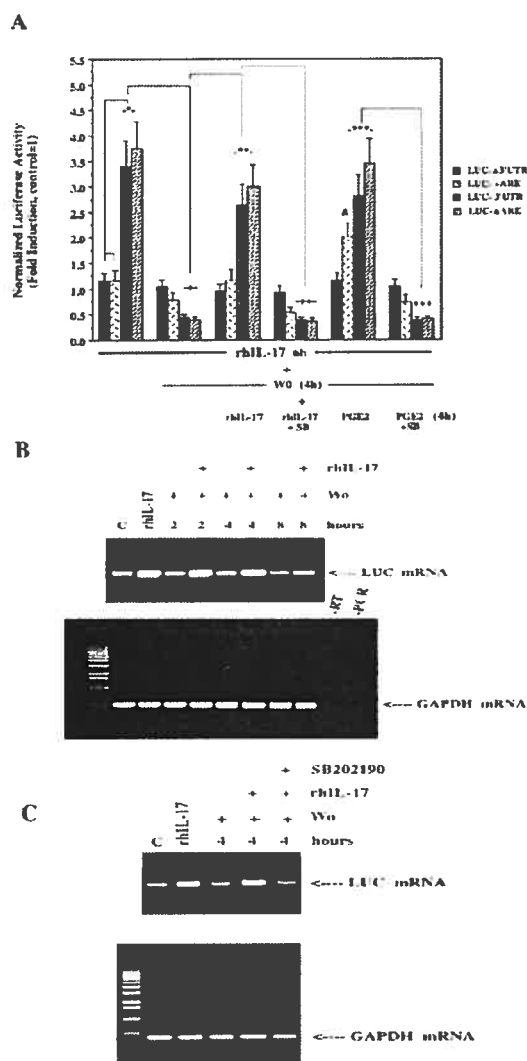


FIG. 8. rhIL-17-dependent stabilization of COX-2 mRNA and increased translation is mediated by the distal portion of COX-2 3'-UTR. HSF were plated in 12-well filter plates at 39–40% confluence in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 100 units/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin. One μ g of LUC- Δ 3'-UTR, LUC- Δ ARE, LUC- Δ ARE, or LUC- Δ UTR and 0.7 μ g of pCMV- β -gal were transfected as described under "Experimental Procedures." Following a change in medium containing 1% FCS for 2 h, the transfected cells were treated with vehicle (control) or with 10 ng/ml of rhIL-17 for 6 h, rinsed, and treated with actinomycin D (1 μ g/ml) for 30 min, and then a fresh medium was added containing either vehicle (Wo), rhIL-17 (10 ng/ml), rhIL-17 (10 ng/ml) + SB202190 (SB) (1 μ M) and/or actinomycin D (1 μ g/ml) (the relevance of the presence of SB202190+SB, 10 μ M) for an additional 4 h (A). The cells were rinsed, and the luciferase activity, β -gal activity, and protein content were determined as described under "Experimental Procedures." The values are expressed as the mean \pm S.D. of three determinations in triplicate of butyrate activity relative light units divided by β -gal activity (optical density). Probabilities (*p*) were calculated by Student's *t* test: $p < 0.001$, $p < 0.0012$, $p < 0.0021$ versus control; $p < 0.0016$, $p < 0.0008$ versus rhIL-17; $p < 0.0009$ & $p < 0.002$ versus LUC- Δ ARE + rhIL-17. In B, HSF were plated in complete medium and then transfected with 1 μ g of LUC-3'-UTR

study mean that ATF-2 homodimers exclusively transactivate the COX-2 promoter at the ATF/CRE, such results could be obtained if ATF-2-containing heterodimers were binding. Judging by our EMSA studies, there is considerable basal binding activity at the COX-2 ATF/CRE site, which is not surprising given that ATF-2 is expressed constitutively at significant levels both in its native and, to a lesser extent, phosphorylated forms in our cell cultures (see also Ref. 11). Induced binding by IL-17 was modest (although significant), and this may be a reflection of the fact that IL-17 activation of the COX-2 promoter was less than 2-fold. More focused experiments would be required to identify IL-17 induced ATF/CRE-binding transactivating proteins.

As indicated above, several recent studies imply that the IL-17 signal is transduced by the NF- κ B signaling cascade in a number of different cell types (reviewed in Ref. 7). In the present context, NF- κ B may mediate transcriptional induction of the COX-2 gene by IL-17 in bovine chondrocytes (20). In contrast, we showed here that in human chondrocytes/synovial fibroblasts, IL-17-dependent activation of NF- κ B is delayed and modest compared with TNF- α and is not related temporally to COX-2 transcription, mRNA stabilization, or protein synthesis. Basal COX-2 promoter activity was not affected when the proximal NF- κ B site was mutated in transfections using human chondrocytes, nor did the mutation abrogate IL-17 induced COX-2 promoter activity. The situation differed somewhat in HSF, because IL-17 can mildly stimulate NF- κ B transactivation activity, although the mutation in the COX-2 proximal site did not compromise IL-17 induction of the COX-2 promoter. Furthermore, using stably transfected HSF overexpressing dominant-negative mutants of TRAF-2, TRAF-6, or I κ B- α , IL-17 activation of a NF- κ B reporter was abrogated to varying degrees but not the expression of COX-2 mRNA.³ Taken together, our data support the notion that the NF- κ B signaling pathway does not play an important role in mediating a response in chondrocytes to the IL-17 signal. In support, IL-17 induction of the COX-2 gene in human macrophages is indirect (delayed) and is dependent on IL-17-induced TNF- α release, which in a feedback reaction (autocrine) activates NF- κ B (14). Similar results were reported in osteoblasts where IL-17 induction of inducible nitric oxide synthase was mediated by NF- κ B but only in combination with TNF- α and not with IL-17 alone (68).

Despite studies demonstrating that IL-17 can activate ERK and JNK pathways in chondrocytes (20), we could not, under carefully controlled conditions, reproduce these data in human chondrocytes or synovial fibroblasts. Our experiments with transactivation reporter systems show that downstream transcription factors such as Elk1, c-Jun, or c-Fos were not activated in our connective tissue cell culture models. Admittedly most of the previously reported studies were performed with nonhuman cell types, and thus species differences may be implicated, although it is possible that cell phenotype may also

³W. H. Faour, A. Manera, Q. W. He, and J. A. Di Battista, manuscript in preparation.

Following a change in medium containing 1% FCS for 2 h, the transfected cells were treated with vehicle or with 10 ng/ml of rhIL-17 for 6 h, rinsed, and treated with actinomycin D (1 μ g/ml) for 30 min, and then a fresh medium was added containing either vehicle (Wo) or rhIL-17 (10 ng/ml) for an additional 2, 4, or 8 h. In C, rinsed and actinomycin D-treated cells were incubated with vehicle (Wo) or rhIL-17 (10 ng/ml) in the absence or presence of SB202190 (1 μ M) for an additional 4 h. Microarrays were extracted for RNA, and 1 μ g of total RNA was analyzed for luciferase mRNA and GAPDH mRNA by RT-PCR as described under "Experimental Procedures." Representative RT-PCR gels are shown ($n = 3$).

be important. For example, we showed that the cytokine could activate ERK1/2 in human monocyte/macrophage cultures, although this occurred only after 1–2 h of stimulation and did not coincide with COX-2 induction (12). This of course does not exclude the regulation of other target genes, and in this regard IL-17 is known to promote monocyte differentiation (7, 17). Furthermore, IL-17 is a potent stimulator of T-cell proliferation and differentiation, suggesting that in cells of lymphoid and myeloid origin, the mitogenic activity of the cytokine may be manifested through the MAPK pathway (7, 17, 69).

In summary, IL-17 is a widely acknowledged regulator of the immune and inflammatory response regulating directly key target genes like COX-2. The mechanisms controlling the COX-2 gene delineated in the present study involve highly coordinated regulation of both DNA-binding (transcriptional) and RNA-binding (post-transcriptional) proteins and may provide a modular paradigm for the control of other IL-17 target genes. Interleukin-17 could prove to be an excellent therapeutic target in the clinical management of inflammatory diseases like RA using, for example, soluble IL-17 receptor preparations.

REFERENCES

- Rouvier E, Luciani M F, Mattioli M G, Denizot F, and Golstein P (1993) *J Immunol* 150, 5445–5456
- Yeo Z, Painter S L, Farrelow W C, Ulrich D, Masloff B M, Spriggs M K, and Armitage R J (1995) *J Immunol* 155, 5483–5487
- Fioroz F, Djessouf A, Choumarat P, Flor-Ruano S, Att Yehia S, Mast C, Pin J, Garrone P, Garcia E, Sacland S, Blanchard D, Gulland C, De Mahapatra B, Royer E, Goldstein P, Bancheton J, and Le Coupez S (1996) *J Exp Med* 183, 2693–2699
- Lo J, Wei-Hsien H, Marozak M, Corpuz R T, Baklanov D T, Foster J S, Goldfarb A D, Yansura D G, Vanden R L, Wood W L, and Gurney A L (2001) *J Biol Chem* 276, 1660–1664
- Shi Y, Ulrich S J, Zhang J, Connolly K, Grzeszczewski K J, Barber M C, Wang W, Wathen K, Holte V, Felton C L, Olsen H, Riben S M, Kiyazov I, Cho Y H, Kao V, Wilkinson K A, Carroll J A, and Elmer R (2000) *J Biol Chem* 275, 19167–19176
- Li H, Chen J, Huang A, Stinson J, Holden S, Foster J, Dowd P, Gurney A L, and Wood W L (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 773–778
- Azcaral S, and Gurney A L (2002) *J Leukocyte Biol* 71, 1–8
- Ye P, Rodriguez F H, Krasny S, Stocking K L, Schurz J, Schwarzenberger P, Oliver P, Huang W, Zhang P, Zhang J, Shellin J E, Bagby G J, Nelson S, Charrier K, Peschon J J, and Kolls J K (2001) *J Exp Med* 191, 519–527
- Chabalaud M, Gornow P, Dayer J-M, Guerne P-A, Fostier F, and Miossec P (2000) *Cytokine* 12, 1092–1099
- Cui L, Yin J P, Sivasubramanian A, Hogue D A, Hillan K J, Mori J S, and Filvaroff E H (2001) *Cytokine* 16, 10–21
- Zolotareva M, Kor A, Lutszykiewicz G, Ksiezopolska-Pietrzak K, Klimczak E, Chwalinska-Sadowska H, and Maslinska W (2000) *J Immunol* 164, 2832–2838
- Jeanneau D V, Martel-Pelletier J, Di Battista J A, Mincou F, Jolicoeur F C, Benckouar M, and Pelletier J P (2000) *Arthritis Rheum* 43, 1134–1144
- Kotaka S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishigama S, Saito S, Inoue K, Kumatori N, Gillespie M T, Martin T J, and Suda T (1996) *J Clin Invest* 99, 1345–1352
- Jeanneau D V, Di Battista J A, Martel-Pelletier J, Jolicoeur F C, He Y, Zhang M, Mincou F, and Pelletier J P (1998) *J Immunol* 160, 3513–3521
- Lian M, Leland J, Chung K F, and Linker A (2001) *Br J Pharmacol* 133, 290–297
- Witonski J, Pawlarczyk K, Broborowicz A, Schronen A, Kozlan-Pawlarczyk M, Wisniewska J, Pabloncka A, Friesz H, Gahl G M, Frey U, and Jorres A (2000) *J Immunol* 165, 5514–5521
- Cui X-Y, Gonnard C P, Jr, Justice L, Narula S K, and Fawcett J S (1998) *Immunol Lett* 62, 51–58
- Chabalaud M, Fostier F, Taupin J L, and Miossec P (1995) *J Immunol* 154, 409–414
- Allouari C, Cheani A, and Giridharan G (1999) *J Immunol* 162, 494–502
- Shukun-Barak T, Quach J, and Litz M (1998) *J Biol Chem* 273, 27467–27473
- Yamamura Y, Gupta R, Morita Y, He X, Pan R, Endress J, Friberg A, Chung K, and Fox D A (2001) *J Immunol* 168, 2270–2275
- Attur M G, Patel R N, Abramson S B, and Amin A R (1997) *Arthritis Rheum* 40, 1050–1053
- Yeo Z, Spriggs M K, Derry J M J, Stocking K L, Park L S, VandenBos T, Zappone J, Painter S L, and Armitage R J (1997) *Cytokine* 9, 791–800
- Shin H C K, Benberon S, Escuillat S, and Guenouon M (1998) *Cytokine* 11, 257–266
- Subramanian S V, Cooper R S, and Alamyah S E (1999) *Biochem Biophys Res Commun* 262, 14–19
- Schwander R, Yamaguchi K, and Cao Z (2000) *J Exp Med* 191, 1233–1239
- Awane M, Androz P G, Li D J, and Reinacker H C (1999) *J Immunol* 162, 5337–5344
- DeWitt D L (1991) *Biochim Biophys Acta* 1083, 121–134
- Wu K K (1996) *J Lab Clin Med* 128, 242–247
- DuBois R N, Abramson S B, Crofford L, Gupta R A, Simon L S, Van de Putte L B, and Lipsky P E (1998) *FASEB J* 12, 1063–1073
- Ryzek R P, Rayssacche C, MacKenzie-Bravo H, Dorfman K, Mattioli M G, and Bravo R (1992) *Cell Growth Differ* 3, 443–450
- Newton R J, Seybold J, Kunitz L M, Bergman M, and Barnes P J (1998) *J Biol Chem* 273, 32312–32321
- Dean J L, E, Brook M, Clark A R, and Saklatvala J (1999) *J Biol Chem* 274, 264–269
- Faour W H, He Y, He Q W, de Lathuraz M, Quintana M, Manenti A, and Di Battista J A (2001) *J Biol Chem* 276, 31720–31731
- Altman R D, Asch E, Bloch D A, Bole G, Borenstein D, Brandt K (1986) *Arthritis Rheum* 29, 1039–1049
- Di Battista J A, Zhang M, Martel-Pelletier J, Fernandes J C, Ahmed-Dine N, and Pelletier J P (1999) *Arthritis Rheum* 42, 157–166
- Ahmed-Dine N, Di Battista J A, Pelletier J P, Cloutier J M, Kionsa K, Dupuis M, and Martel-Pelletier J (1997) *J Rheumatol* 24, 1985–1994
- Kakajdzic T, Faour W H, He Q W, Faloni H, Martel-Pelletier J, Pelletier J P, and Di Battista J A (2002) *Arthritis Rheum* 45, 494–506
- Kulcherson W, Jones D A, Matsunaga N, Givshan J, McIntyre T M, Zimmerman G A, White R L, and Prescott S M (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4816–4820
- Dixon D A, Kaplan C D, McIntyre T M, Zimmerman G A, and Prescott S M (2000) *J Biol Chem* 275, 11750–11757
- Fuchs S, Tappin I, and Rouzi Z (2000) *J Biol Chem* 275, 12350–12354
- Leppa S, and Bismans D (1999) *Oncogene* 18, 6153–6162
- Chang L, and Karin M (2001) *Nature* 410, 37–40
- Appelby S B, Bishimaki A, Neilson K, Narko K, and Hla T (1994) *Biochem J* 302, 723–727
- Smith W, DeWitt D L, and Garavito R M (2000) *Annu Rev Biochem* 69, 145–182
- He Q W, He Y, Faour W, and Di Battista J A (2001) *Osteoarthritis Cart* 9B, 89
- Lian M, Maktani K R, Finch A, Bower G, Saklatvala J, and Clark A R (2000) *Mol Cell Biol* 20, 4265–4274
- Dayer J-M, and Burger D (1999) *Arthritis Res* 1, 17–20
- Firestein G S (1996) *Arthritis Rheum* 39, 1781–1790
- Weyand C M, and Goronzy J J (1997) *J Med* 75, 772–785
- Crofford L J, Wilker R L, Ristimaki A P, Sano H, Remmers E F, Epps H R, and Hla T (1994) *J Clin Invest* 93, 1095–1101
- He Q W, Pelletier J P, Martel-Pelletier J, Laufer S, and Di Battista J A (2002) *J Rheumatol* 29, 546–553
- Kyrnikis J M, and Averchi J (2001) *Physiological Rev* 81, 807–809
- Proulx G C, and Proulx C G (2002) *Eur J Biochem* 269, 5350–5359
- Proulx C G (2002) *Eur J Biochem* 269, 5358–5349
- Rought B, and Gingras A C (1996) *Int J Biochem Cell Biol* 31, 43–57
- Fraser C S, Pain V M, and Morley S J (1999) *Biochem J* 342, 519–526
- Wang X, Flynn A, Waskiewicz A J, Webb B L J, Fryer R G, Baines I A, Cooper J A, and Proud C G (1998) *J Biol Chem* 273, 9373–9377
- Morley S J, and Nawroth S (2002) *J Biol Chem* 277, 32855–32859
- Mahant K R, Brook M, Dean J L, Sully G, Saklatvala J, and Clark A R (2001) *Mol Cell Biol* 21, 6461–6469
- Chen C Y, Cherril R, Ong S E, Chan E L, Rajanaharaj R, Prugin G J M, Steerklin G, Moroni C, Mann M, and Karin M (2001) *Cell* 107, 451–461
- Newton R, Seybold J, Lin S F, and Barnes P (1997) *Biochem Biophys Res Commun* 231, 85–89
- Gao Q, Liu P H, Ben-Av P, and Hla T (1998) *Biochem Biophys Res Commun* 242, 508–512
- Becchiangua A, Coriani M C, Capucceoli S, and Nicolini A (2003) *J Cell Physiol* 195, 356–372
- Sawada H, Dixon D A, Oates J A, and Bostand O (2003) *J Biol Chem* 278, 13928–13935
- Xie W, and Herschman H R (1996) *J Biol Chem* 271, 31742–31748
- Xie W, and Herschman H R (1995) *J Biol Chem* 270, 27522–27528
- Van Berwijlen R L, Papapoulos S E, and Lwik C W G M (2001) *Bone* 28, 378–386
- Lian M, Cui Z H, Hoshino H, Lovell J, Sjostrand M, Gronert D C, Skogh B E, and Linkin A (1999) *J Immunol* 162, 2347–2352

DISCUSSION :

L'inflammation est la conséquence de l'endommagement tissulaire et son rôle est de diriger les facteurs plasmatiques et les cellules du système immunitaire au site des lésions dans le but d'éliminer l'infection et réparer le tissu endommagé. Dans les conditions pathologiques comme l'inflammation chronique et l'arthrite rhumatoïde, l'infiltration des cellules du système immunitaire précède le dommage tissulaire. Durant la réponse inflammatoire, les cellules résidentes et infiltrantes sont sujettes aux effets d'une collection diverse de stimuli qui produit un changement drastique dans le patron d'expression des gènes inflammatoires. Le réseau des cytokines (cytokine network) est un système homéostatique essentiel pour l'équilibre métabolique au niveau de la jonction articulaire. Une interprétation correcte du niveau d'une cytokine dans un fluide biologique donné doit prendre en considération le niveau des autres cytokines et/ou de leurs inhibiteurs biologiques et le niveau de leurs récepteurs. Donc le niveau des cytokines et des composantes inflammatoires doit être bien régulé afin de livrer une fonction biologique normale. Toute perturbation touchant cet équilibre en faveur de l'augmentation ou de la diminution de ce niveau va avoir des conséquences métaboliques anormales et par la suite pathologiques. En effet les ARNm codant pour des produits pro-inflammatoires sont très instables et leur demi-vie est sujette à des variations marquées dépendant des stimuli extracellulaires. La régulation de la stabilité de l'ARNm est un processus clé dans la régulation de l'expression des gènes. Ainsi les éléments adénosine uridine-riche (AREs) qui se trouvent dans la partie 3'-UTR de la plupart des gènes inflammatoires et facteurs de croissance promeuvent une dégradation rapide de l'ARNm en question. La cyclooxygénase-2 est un gène précoce qui est parmi les gènes les plus rapidement induits durant une réaction inflammatoire. C'est un enzyme inductible essentiel pour la synthèse des médiateurs inflammatoires, les prostaglandines, dont leurs rôles n'épargnent aucune fonction biologique de l'organisme. Malgré l'importance physiologique de cette enzyme et qui a été mise en évidence depuis longtemps grâce

aux inhibiteurs sélectifs de COX-2. il est encore investigué le mode de régulation de l'expression du gène COX-2.

Il est bien connu que les cytokines pro-inflammatoires induisent fortement l'expression du gène COX-2 et que cette induction ainsi que le niveau élevé de la protéine COX-2 et de la prostaglandine E₂ secrétée soient étroitement liés à la gravité et à la chronicité des maladies inflammatoires. Donc il est d'importance clinique considérable de découvrir le mode de régulation de ce gène vu que l'implication clinique dépasse les maladies arthritiques et pourrait s'appliquer à toutes les maladies d'origine, ou ayant une composante, inflammatoire comme le cancer et certaines maladies neurologiques. Le gène COX-2 a été démontré son importance comme étant un « master control gene », en effet le métabolisme de la membrane synoviale est particulièrement PGE₂ dépendant. Son mode de régulation vient d'être élucidé et les mécanismes régulant son expression deviennent de plus en plus clair. La présence des sites enhancers NF-κB et ATF/CRE dans le promoteurs de COX-2 suggère un modèle de régulation transcriptionnel, par contre la découverte des séquences AU-riche dans la partie 3'-UTR de son ARNm appuyait un modèle de régulation post-transcriptionnelle. En se basant sur nos résultats, nous proposons que le gène COX-2 est régulé majoritairement d'une façon post-transcriptionnelle avec une composante transcriptionnelle mineure. Ce modèle a pour composantes : a) les séquences promotrices ATF/CRE et les séquences AU-riche dans la partie non transcrite de l'ARNm. b) La voie de signalisation p38 MAPK qui régule d'une façon spécifique les facteurs de transcription ATF/CREB et les protéines liant spécifiquement l'ARNm (HuR, TTP,...). La p38 MAPK joue un rôle primordial dans la régulation de la demi-vie des gènes dont l'ARNm contient des séquences AU-riche. Cette kinase activée par les stress inflammatoires est capable de stabiliser les ARNms de COX-2 et IL-6 et une autre grande variété de gènes impliqués dans l'inflammation. Une fois inhibée, l'expression de COX-2 est complètement abolie. Nous avons été capable de reproduire ces résultats déjà publiés, et nous avons démontré que dans notre système cellulaire la p38 MAPK joue un rôle clé et primordial dans la régulation de

l'expression et de la stabilité de l'ARNm de COX-2. L'effet moléculaire de la p38 se traduit par la transactivation du promoteur COX-2 via les facteurs de transcription cibles, et sur la stabilité de l'ARNm via les séquences AU-riche. Il est bien connu d'après les résultats publiés que IL-1 β stabilise le message de COX-2 en activant la p38 MAPK. Selon ce modèle, l'inhibition de la p38 par un inhibiteur sélectif abolit complètement l'expression de l'ARNm et la synthèse protéique de COX-2. Ce rôle clé de la p38 s'avère important aussi dans le cas où d'autres stimulateurs comme LPS stabilisent l'ARNm de COX-2 via cette voie. Nous avons démontré que l'activation prolongée de la p38 MAPK dans les cellules incubées avec IL-1 β est due grâce à l'accumulation localisée de la PGE₂. Cette activation spécifique de la p38 stabilise le message de COX-2 et augmente la synthèse protéique de COX-2. Il est d'importance biologique considérable de connaître que la PGE₂ régule sa propre synthèse dans un système cellulaire très sensible aux fluctuations inflammatoires. L'induction de l'ARNm de COX-2 par IL-1 β est déjà établie, mais ce qui était inconnu était à savoir si cette modulation était strictement PGE₂ dépendante. Donc, la présence de la PGE₂ dans le milieu ambiant est suffisante pour stabiliser et augmenter le niveau de l'ARNm de COX-2, de la protéine de COX-2 et par la suite la sécrétion de la PGE₂. Dans ces conditions, la PGE₂ contribue à la formation d'une boucle rétro-positive responsable de l'activation prolongée de la p38 MAPK et de la stabilisation de l'ARNm de COX-2. Il est à noter que malgré que cette stabilisation soit médiée majoritairement par la p38 MAPK, d'autres kinases peuvent participer à cette régulation. La PGE₂ augmente l'AMPc cytoplasmique et active par la suite la PKA. Nos résultats montrent que PKA participe minoritairement à ce phénomène de stabilisation. Ceci est déterminé en utilisant des analogues à l'AMPc ou des inhibiteurs pharmacologiques de la PKA. Dans les deux cas déjà mentionnés, nous avons observé une légère stabilisation par rapport au cas contrôle et une diminution de 20% du niveau de l'ARNm respectivement. Les mécanismes moléculaires concernant la contribution exacte de cette voie nécessitent des études plus poussées et détaillées. L'activité biologique de la PGE₂ est transmise aux cellules via différents types de récepteurs. Dans notre système cellulaire la transmission du signal

stabilisateur se fait par le sous-type de récepteur EP₄. Ainsi les analogues synthétiques aux autres sous types de récepteurs n'avaient aucun effet, par contre les anticorps anti-EP₄ bloquaient la stabilisation. La signalisation de la PGE₂ via EP₄ peut être spécifique dans le sens où l'activation d'autres sous-types de récepteurs peuvent avoir des effets moléculaires différents, par exemple le sous-type EP₃ est couplé au protéinus Gi. Ces résultats sont en concordance parfaite avec la transmission du signal par l'intermédiaire de EP₄, car les analogues chimiques de l'AMPc peuvent participer au phénomène de stabilisation, et dans notre système cellulaire l'augmentation de l'AMPc via EP₄ est un ajout dans le même sens de la boucle rétro-positive.

La régulation de la transcription du gène COX-2 se fait au niveau d'une séquence d'ADN d'à peu près 2300 bpb en amont du site d'initiation de la transcription. Cette séquence contient des sites enhancers potentiels impliqués dans la transcription de COX-2. Elle inclut un site TATA, un motif c/EBP, 2 sites AP-2, 3 sites SP-1, 2 sites NF-κB, un site CRE et un site Ets-1, mais elle ne contient pas de sites AP-1. Malgré que la structure promotrice potentielle de COX-2 soit bien connue, la régulation de son expression au niveau transcriptionnel demeure obscure. Le rôle de chaque site dans ce contexte n'est pas encore élucidé. Ces sites modulent la transcription à des niveaux différents et d'une façon tissu spécifique. Ainsi l'induction de l'expression de COX-2 dans les cellules du stroma de l'endomètre et les macrophages murins se fait par l'intermédiaire du site c/EBP (Caivano et al., 2001). Les études de transfections faites dans notre laboratoire montrent que le site ATF/CRE joue un rôle majeur dans la transactivation de COX-2, par contre les sites NF-κB n'ont aucun rôle à cet égard. Pour mieux mettre en évidence la composante transcriptionnelle du mécanisme de régulation, nous avons cotransfecté des plasmides surexprimant des kinases appartenant à la voie des MAPKs avec des plasmides possédant le promoteur de COX-2 lié à la luciférase. Les résultats montrent que l'activité transcriptionnelle de IL-1β est le double de celui du cas contrôle, et à un niveau similaire à celui obtenu avec la surexpression de MEK3. Cette voie présente

un synergisme quand elle est co-surexprimée avec PKA. L'activité de la luciférase obtenue ne dépassait pas le triple de celui du cas contrôle du gène rapporteur. Cette activité est complètement abolie suite à l'incubation des cellules avec un inhibiteur de la p38 (SB202190), par contre, la stimulation avec la PGE₂ ou la pré-incubation des cellules avec NS-398 en présence de IL-1 β n'avait aucun effet sur l'activité promotrice de COX-2.

Le contexte physiologique est très important pour comprendre le phénomène moléculaire régulant l'expression de COX-2. Normalement l'élévation du niveau de COX-2 soit en terme d'ARNm et de protéine corrèle avec la présence d'une grande population de cellules T dont l'effet se traduit par la sécrétion d'une cytokine pro-inflammatoire dérivée exclusive des cellules T, l'interleukine-17. Cette cytokine occupe actuellement une place primordiale dans la hiérarchie des cytokines pro-inflammatoires, et elle a été trouvée responsable de la stimulation des macrophages à sécréter de grandes quantités de TNF- α et de IL-1 β . IL-17 est une cytokine dont les effets moléculaires ne sont pas encore entièrement élucidés. De grands efforts ont été faits dans le but de clarifier le mode de signalisation de IL-17 et la façon par laquelle cette cytokine régule l'expression des gènes cibles, dont la majorité sont de nature inflammatoire. Dans ce contexte, COX-2 représente une cible de choix. Les études que nous avons établie démontrent que IL-17 régule posttranscriptionnellement le gène COX-2 et d'une façon p38 MAPK dépendante. L'effet moléculaire de IL-17 se résume par une régulation directe : a) de la transcription de COX-2 via le facteur de transcription ATF-2, b) de la stabilité de l'ARNm via les séquences AU-riche située dans sa partie 3'-UTR et c) de la régulation de la traduction en phosphorylant MNK1 et le facteur d'initiation eIF4E. L'induction de l'expression de COX-2 dans les cellules synoviocytes par IL-17 était claire et évidente. IL-17 stimulaient rapidement et fortement et pour une durée >24h la synthèse de l'ARNm de COX-2 de la protéine COX-2 et la sécrétion de la PGE₂. L'expression et la synthèse protéique de COX-2 étaient sensibles aux inhibiteurs de la p38 MAPK. Même en présence de IL-17, le niveau de l'ARNm de COX-2 et de la protéine de COX-2 baisse considérablement si

la p38 est inhibé. Les inhibiteurs pharmacologiques ciblant d'autres MAPKs n'avaient aucun effet, ce qui suggérait que IL-17 induit l'expression de COX-2 en activant spécifiquement la p38 MAPK. Cette hypothèse est abordée en détail, et les études de western blot montrent un patron d'activation exclusif de la voie p38 MAPK selon la cascade MKK_{3/6}/SAPK/p38/ATF-2. Par contre IL-17 était incapable d'activer les voies SAPK/JNK et NF- κ B. Par contre, la voie STAT est activée tardivement (>2h) suggérant que cette voie n'est pas impliquée dans l'induction rapide de l'ARNm de COX-2. Une concordance parfaite existe entre le patron d'activation de cette cascade qui se manifeste par un pic d'activation maximale après 20 minute et 8h de stimulation des différentes composantes de cette voie. Ces résultats montrent que IL-17 activait uniquement les intermédiaires de signalisation appartenant seulement à la voie p38. Cette induction de l'expression de COX-2 via la p38 MAPK est spécifique vu que la surexpression d'une forme active de MMK3 induit l'expression de COX-2 et cette induction était sensible à SB. Une bifurcation importante de cette voie aboutit à l'activation de Mnk-1 et par la suite eIF4E. Mnk-1 est une kinase clé dans l'initiation de la traduction car elle active par phosphorylation le facteur d'initiation eIF4E nécessaire pour le recrutement du ribosome à la coiffe et l'initiation de la traduction. L'activation de Mnk-1 et eIF4E coïncide avec le patron d'activation de la cascade p38 MAPK. Il est important de noter que la régulation de la traduction au moins d'une part est p38 spécifique, ainsi l'activation de ces intermédiaires de la traduction est sensible à l'effet inhibiteur de SB. L'inhibition de la p38 provoque une chute significative de la phosphorylation de Mnk-1 et eIF4E. Notre étude a également permis de démontrer l'importance de la régulation transcriptionnelle de COX-2 par les facteurs ATF/CRE. L'activation de la cascade p38 suggérait une activation spécifique des facteurs de transcription cibles. Les facteurs de transcription, appartenant à la famille bZIP leucine zipper, sont une cible de choix. Dans notre système cellulaire, les études de transfections faites avec des plasmides contenant le promoteur de COX-2 lié à la luciférase montrent que, seul les mutations introduites dans le site ATF/CRE inhibent la transactivation du promoteur de COX-2 et réduit même son activité basale. De même la surexpression des leurres

moléculaires de ATF-2 réduit considérablement l'activité promotrice basale et induite du promoteur de COX-2. IL-17 ne stimule pas l'activité transcriptionnelle de la famille des dimères c-Jun/c-fos, comme il a été démontré par la surexpression des leurs moléculaires des facteurs de transcription (c-Jun, c-fos, Elk-1), sauf les facteurs CREB et ATF-2 étaient sensible à cette surexpression voir même à l'effet inhibiteur de SB. Ce dernier réduisait considérablement la liaison du dimère ATF-2/CREB à son site de liaison comme démontré par retardement sur gel. En résumé tous ces résultats montrait que la transactivation de COX-2 par IL-17 se fait exclusivement par l'intermédiaire du site ATF/CRE avec un contrôle direct par la voie p38 MAPK.

Le rôle de NF- κ B est encore un sujet de débat. Plusieurs chercheurs ont montré que l'induction de la transcription de COX-2 nécessite l'intervention du facteur de transcription NF- κ B en se liant à son site spécifique situé dans le promoteur de COX-2. Il est très difficile de spécifier le rôle de NF- κ B dans ce contexte, car ce facteur est régulé selon plusieurs niveaux incluant une série de phosphorylation et une intervention du protéasome, une translocation nucléaire et à la fin une liaison spécifique à l'ADN et une modification locale de la conformation chromatinienne. Ces étapes majeures dans la régulation de l'activité de NF- κ B rendent difficile la spécification de son rôle transactivateur. Bref, l'obtention d'un NF- κ B compétent au niveau transcriptionnel nécessite plus qu'une translocation nucléaire et une liaison à l'ADN. Au niveau technique, l'inhibition de la voie NF- κ B induit une apoptose et une mortalité cellulaire ce qui rend difficile l'interprétation des résultats. La totalité des études faites et qui suggèrent une implication essentielle de la voie NF- κ B sont basées sur des études de transfections avec des plasmides contenant des sites NF- κ B. Donc ces études sont faites en dehors du contexte chromatinien. Dans le cas de IL-1 β malgré que cette cytokine soit un puissant inducteur de la voie NF- κ B, il était étonnant que cette voie de signalisation ne soit pas impliquée dans la régulation transcriptionnelle de COX-2. La situation avec IL-17 est différente vue que IL-17 n'active pas cette voie, ou une très légère activation est

observée après 10 minutes de stimulation comparativement à celle obtenue avec TNF- α après 2 minutes de stimulation, cette activation se traduit par une phosphorylation rapide et spécifique de I κ B- α . L'implication exacte de NF- κ B dans la transcription a été étudiée en détails dans notre système cellulaire, soit en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques de IKK ou en surexprimant des dominants mutants des TRAFs. L'inhibition de la voie de IKK avec Bay (inhibiteur pharmacologique spécifique) ne réduisait pas le niveau d'ARNm de COX-2. La surexpression de dominant mutant de TRAF2, TRAF6 ou I κ B- α ne bloquait pas l'expression induite de COX-2 par IL-1 β ou IL-17. Par contre ces mutants dominants étaient capables de bloquer l'activité du gène rapporteur contrôlé par des sites NF- κ B. Ce phénomène écartant l'implication de NF- κ B comme contributeur essentiel à la transcription de COX-2 se poursuit sur d'autres types cellulaires. Il a été démontré que les macrophages stimulées par IL-17 induisent tardivement l'expression de COX-2, et cette expression dépend principalement du TNF- α secrétée dans le milieu ambiant par les macrophages activées (Jovanovic et al., 1998). Finalement, il est possible que l'activation de cette voie et son implication dans la transcription de COX-2 soit cytokine spécifique. Dans le cas des cellules stimulées avec TNF- α le niveau de l'ARNm est significativement plus bas que celui obtenu dans le cas où les cellules sont stimulées avec IL-1 β . Par contre la pré-incubation des cellules avec NS n'a aucun effet, et l'addition de PGE₂ a un effet additif sur le niveau de l'ARNm qui devient comparable au cas de IL-1 β . Il est important à noter que TNF- α a un très faible effet sur l'activation de la p38 MAPK. En conclusion la participation de la voie NF- κ B dans la régulation de la transcription de COX-2 est un élément mineur, dont le rôle essentiel est joué par le facteur de transcription ATF/CREB.

En se basant sur les résultats que nous avons obtenu nous proposons que la composante de régulation la plus importante soit la composante post-transcriptionnelle. La partie transcriptionnelle n'explique qu'une partie du phénomène gérant l'expression de COX-2 et est insuffisante pour obtenir cette expression massive et prolongée de son ARNm. Nos résultats montrent clairement


que la stimulation des synoviocytes avec IL-1 β ou IL-17 induit fortement l'expression de l'ARNm de COX-2, cette induction n'est pas compatible avec le niveau d'activité faible du promoteur de COX-2 et démontrée dans notre système cellulaire. Par contre les voies de signalisation probables (p38 MAPK) impliquées dans la régulation transcriptionnelle de COX-2 montrent un patron d'activation comparable avec le profil d'induction de l'ARNm de COX-2. Ce qui suggère que, ces voies de signalisation agissent préférentiellement de façon post-transcriptionnelle. L'examen détaillé de ce phénomène dans les cellules pré-incubées avec l'actinomycine D (inhibiteur de la transcription) montrent que le niveau de l'ARNm de COX-2 dans ces cellules diminue fortement pour devenir comparable au cas contrôle non stimulé après 2h d'incubation. Par contre, l'addition de IL-17 ou de la PGE₂ stabilise le message de COX-2 pour 8h et 13h respectivement. Dans ces mêmes conditions l'inhibition de la p38 MAPK par SB diminue considérablement le niveau de l'ARNm et réduit fortement sa demi-vie. De même, le patron de biosynthèse protéique de COX-2 est en concordance parfaite avec celui de l'ARNm correspondant. De la même façon la synthèse protéique de COX-2 est sensible à l'inhibition de la p38 MAPK par SB. Ainsi l'addition de IL-17 ou IL-1 β aux cellules pré-incubées avec de l'actinomycine D prévient la dégradation rapide de la protéine et augmente significativement sa demi-vie. Donc il est clair d'après les résultats de cette expérience que l'effet biologique de ces deux cytokines se manifeste plutôt en régulant post-transcriptionnellement le gène COX-2

Comme déjà mentionné, la régulation post-transcriptionnelle passe par les séquences AU-riche de la partie 3'-UTR de l'ARNm de COX-2. La présence de ces sites et leurs contributions à la modulation de la demi-vie des ARNm des gènes inflammatoires est bien établie, mais le mécanisme est encore mal connu. Le même cas se pose en étudiant la régulation du gène COX-2. La fusion du gène β -globine stable avec la partie 3'-UTR de l'ARNm de COX-2 déstabilise ce gène et modifie profondément sa demi-vie. De même que la fusion du gène de la luciférase avec la partie 3'-UTR de COX-2 rend la stabilité de ce gène sensible à l'activité biologique

de la p38 MAPK et des cytokines pro-inflammatoires tel que, IL-1 β ou IL-17. D'ailleurs ces expériences faites avec les plasmides chimères résultants de la fusion des gènes stables avec des séquences AU-riche, ont généré les mêmes résultats en transfections transitoires. La même conclusion a été retenue dans le cas où c'était une transfections stables ou transitoires démontrant ainsi l'importance des séquences AU-riche dans la régulation de la demi-vie des ARNm. Nous avons été capables de démontrer que les séquences AU-riche distales sont primordialement impliquées dans la régulation de la stabilité de l'ARNm de COX-2 dans la cas de IL-17 ou IL-1 β . Par contre les séquences proximales étaient réfractaires et les gènes fusionnés avec ses séquences ne présentaient pas de changements au niveau de la stabilité de leur message. Les séquences distales sont des sites primaires pour des protéines liant spécifiquement l'ARNm et régulant sa stabilité. Sauf la surexpression de TTP déstabilisait l'ARNm de COX-2, mais pas d'autres protéines e.g. HuR, AUF1, suggérant que le mode de régulation de l'activité de ces protéines est cytokine spécifique. Il est important à noter que TTP est phosphorylée par la p38 ce qui peut altérer ses fonctions de liaison à l'ARN. Dans d'autres systèmes cellulaires les séquences proximales AU-riche de la partie 3'-UTR de COX-2 étaient la cible pour des complexes protéiques liant spécifiquement l'ARN. En conclusion, il est clair d'après ces résultats que le gène COX-2 est régulé post-transcriptionnellement via sa partie 3'-UTR dont les séquences AU-riche joue un rôle essentiel dans le recrutement des protéines liant spécifiquement l'ARN. Cette régulation spécifique de la stabilité nécessite une implication absolue de la p38 MAPK comme modulateur essentiel de la demi-vie des ARNm ayant des séquences AU-riche.

CONCLUSION :

Les dérivés lipidiques de l'acide arachidonique, les prostaglandines, jouent un rôle primordial dans la physiologie normale et pathologique des tissus. La synthèse des ces médiateurs inflammatoires dépend des conditions de stress locales en réponse à l'activité biologique de plusieurs cytokines pro-inflammatoires tel que IL-1 β et IL-17. La régulation de l'expression de la cyclooxygénase-2, l'enzyme clé de la synthèse des prostaglandines, a pris une place primordiale dans la recherche médicale compte tenu des applications thérapeutiques impliquant directement cet enzyme ne cessent de s'élargir. Donc il est évident que les mécanismes moléculaires régulant son expression soient d'importance clinique considérable. Ainsi, le réseau de cytokine (cytokine network) régulant la pathologie des maladies arthritiques s'intercale au niveau de l'expression de COX-2. Son expression devient un marqueur pathologique de la maladie au niveau de l'articulation. Cette interaction entre cytokines pro-inflammatoires vs expression de COX-2 représente l'élément critique sur laquelle est basée la thérapie anti-COX-2. Notre laboratoire a été le premier à démontrer que les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-17 régulent post-transcriptionnellement l'expression du gène COX-2. Il était bien apprécié depuis longtemps que l'explication de la plupart des maladies passe absolument par la composante transcriptionnelle du gène en question. D'après ce qu'on a trouvé et publié nous suggérons que la composante post-transcriptionnelle représente l'élément majeur de l'étiologie des maladies arthritiques. Ainsi la fluctuation énorme du niveau des facteurs pro ou anti-inflammatoires observé chez les patients OA nécessite une régulation rapide et puissante des gènes et par la suite une modulation post-transcriptionnelle. À cet égard, étant un gène inflammatoire, COX-2 représente un système modèle pour étudier les mécanismes moléculaires par lesquelles IL-1 β et IL-17 régulent l'expression de leurs gènes cibles. En se basant sur les études faites dans notre laboratoire, nous proposons un phénomène globale de régulation par lequel les cytokines pro-inflammatoires plus particulièrement IL-1 β et IL-17 régulent l'expression de leurs gènes cibles. Dans ce contexte, la composante post-



transcriptionnelle occupe une place prépondérante par rapport à la composante transcriptionnelle liée à la régulation, COX-2 et à cet égard, est un exemple type et l'application directe de ce modèle qui se poursuit sur tous les facteurs inflammatoires du système. Ainsi la présence des séquences AU-riche dans la partie 3'-UTR de la plupart des ARNms des cytokines pro-inflammatoires e.g., TNF- α , renforce le modèle de régulation que nous proposons. Il reste à démontrer et identifier à quel degré ce modèle peut s'appliquer, les composantes et les facteurs régulateurs de ce modèle, et la spécificité tissulaire du modèle proposé

LISTES DES RÉFÉRENCES

Aigner,T., McKenna,L. (2002). **Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage.** *Cell Mol Life Sci* 59, 5-18

Akiba,H., Nakano,H., Nishinaka,S., Shindo,M., Kobata,T., Atsuta,M., Morimoto,C., Ware,C.F., Malinin,N.L., Wallach,D., Yagita,H., and Okumura,K. (1998). **CD27, a Member of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Activates NF-kappa B and Stress-activated Protein Kinase/c-Jun N-terminal Kinase via TRAF2, TRAF5, and NF-kappa B-inducing Kinase.** *Journal of Biological Chemistry* 273, 13353.

Altman,R., Asch,E., Bloch,D., Bole,G., Borenstein,D., Brandt.K., Christy,W., Cooke,T.D., Greenwald,R., Hochberg.M., and . (1986). **Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association.** *Arthritis Rheum.* 29, 1039-1049.

Anderson,J.S.J. and Parker,R. (1998). **The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex.** *The EMBO Journal* 17, 1497.

Arenzana-Seisdedos,F., Turpin,P., Rodriguez,M., Thomas,D., Hay,R.T., Virelizier,J.L., and Dargemont,C. (1997). **Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm.** *J Cell Sci* 110, 369.

Asahara H,A.M. and Ogawa N,N.S.I.H. (1995). **High DNA-binding activity of transcription factor NF-kappa B in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis.** *Biochem Mol Biol Int* 37, 827-32.

Barnett,J., Chow,J., Ives,D., Chiou,M., Mackenzie,R., Osen,E., Nguyen.B., Tsing,S., Bach.C., Freire,J., and . (1994). **Purification, characterization and selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system.** *Biochim. Biophys. Acta* 1209, 130-139.

Beelman CA,S.A. and Caponigro G,L.T.H.L.F.D.P.R. (1996). **An essential component of the decapping enzyme required for normal rates of mRNA turnover.** *Nature* 382, 642-646.

Beelman,C.A. and Parker,R. (1994). **Differential effects of translational inhibition in cis and in trans on the decay of the unstable yeast MFA2 mRNA.** Journal of Biological Chemistry 269, 9687.

Bellus,G.A., McIntosh,I., Smith,E.A., Aylsworth,A.S., Kaitila,I, Horton,W.A., Greenhaw,G.A., Hecht,J.T., Francomano,C.A. (1995) **A recurrent mutation in the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor 3 causes hypochondroplasia.** Nat Genet 10, 357-9

Benderdour M and Tardif G,P.J.D.B.J.R.P.R.P.M.-P.J. (2002). **Interleukin 17 (IL-17) induces collagenase-3 production in human osteoarthritic chondrocytes via AP-1 dependent activation: differential activation of AP-1 members by IL-17 and IL-1beta.** J Rheumatol 29, 1262-1272.

Berberich,I., Shu,G., Siebelt,F., Woodgett,J.R., Kyriakis,J.M., and Clark,E.A. (1996). **Cross-linking CD40 on B cells preferentially induces stress-activated protein kinases rather than mitogen-activated protein kinases.** The EMBO Journal 15, 92.

Bergstrom,S., Danielsson,H., and Samuelsson,B. (1964). **The enzymatic formation of prostaglandin E2 from arachidonic acid prostaglandins and related factors 32.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 90, 207-210.

Bird,T.A., Kyriakis,J.M., Tyshler,L., Gayle,M., Milne,A., and Virca,G.D. (1994). **Interleukin-1 activates p54 mitogen-activated protein (MAP) kinase/stress-activated protein kinase by a pathway that is independent of p21ras, Raf-1, and MAP kinase kinase.** Journal of Biological Chemistry 269, 31836.

Boeck,R., Tarun,S., Jr., Rieger,M., Deardorff,J.A., Mnller-Auer,S., and Sachs,A.B. (1996). **The Yeast Pan2 Protein Is Required for Poly(A)-binding Protein-stimulated Poly(A)-nuclease Activity.** Journal of Biological Chemistry 271, 432.

Bond,M., Fabunmi,R.P., Baker,A.H., and Newby,A.C. (1998). **Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-[kappa]B.** FEBS Letters 435, 29-34.

Bondeson,J., Foxwell,B., Brennan,F., and Feldmann,M. (1999). **Defining therapeutic targets by using adenovirus: Blocking NF-kappa B inhibits both inflammatory and destructive mechanisms in rheumatoid synovium but spares anti-inflammatory mediators.** PNAS 96, 5668.

Boulton TG,N.S. and Robbins DJ,I.N.R.E.M.S.D.R.P.N.C.M.Y.G. (1991). **ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF.** *Cell* 65, 663-675.

Boulton TG,Y.G. and Gregory JS,S.C.M.C.H.J.C.M. (1990). **An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control.** *Science* 249, 64-67.

Bourne,H.R., Sanders.D.A., and McCormick,F. (1991). **The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism.** *Nature* 349, 117-127.

Bouvier.M., Hausdorff.W.P., De Blasi,A., O'Dowd,B.F., Kobilka,B.K., Caron,M.G., and Lefkowitz.R.J. (1988). **Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization.** *Nature* 333, 370-373.

Brandt KD (1986). **Workshop on etiopathogenesis of osteoarthritis.** *J. Rheumatol.* 13, 1126-1160.

Brown,C.E. and Sachs,A.B. (1998). **Poly(A) Tail Length Control in Saccharomyces cerevisiae Occurs by Message-Specific Deadenylation.** *Mol. Cell. Biol.* 18, 6548.

Burr,G.O. (1930). **On the Nature and Role of the Fatty Acids Essential in Nutrition.** *J. Biol. Chem.* 86, 587-621.

Byers,P.D., Maroudase,A., Oztop,F., Stockwell,R.A., and Venn,M.F. (1977). **Histological and biochemical studies on cartilage from osteoarthrotic femoral heads with special reference to surface characteristics.** *Connect. Tissue Res.* 5, 41-49.

Caivano,M. and Cohen,P. (2000). **Role of mitogen-activated protein kinase cascades in mediating lipopolysaccharide-stimulated induction of cyclooxygenase-2 and IL-1 beta in RAW264 macrophages.** *J. Immunol.* 164, 3018-3025.

Caivano,M., Gorgoni,B., Cohen,P., and Poli,V. (2001). **The Induction of Cyclooxygenase-2 mRNA in Macrophages Is Biphasic and Requires both CCAAT Enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta) and C/EBPdelta Transcription Factors.** *Journal of Biological Chemistry* 276, 48693-48701.

Capdevila,J.H., Morrow,J.D., Belosludtsev,Y.Y., Beauchamp,D.R., DuBois,R.N., and Falck,J.R. (1995). **The catalytic outcomes of the constitutive and the mitogen inducible isoforms of prostaglandin H2 synthase are markedly affected by glutathione and glutathione peroxidase(s).** *Biochemistry* 34, 3325-3337.

Caponigro,G. and Parker,R. (1995). **Multiple functions for the poly(A)-binding protein in mRNA decapping and deadenylation in yeast.** *Genes and Development* 9, 2421.

Carballo,E., Cao,H., Lai,W.S., Kennington,E.A., Campbell,D., and Blackshear,P.J. (2001). **Decreased Sensitivity of Tristetraprolin-deficient Cells to p38 Inhibitors Suggests the Involvement of Tristetraprolin in the p38 Signaling Pathway.** *Journal of Biological Chemistry* 276, 42580.

Carballo,E., Lai,W.S., and Blackshear,P.J. (1998). **Feedback Inhibition of Macrophage Tumor Necrosis Factor- α Production by Tristetraprolin.** *Science* 281, 1001.

Carpenter,L., Cordery,D., and Biden,T.J. (2001). **Protein Kinase Cdelta Activation by Interleukin-1beta Stabilizes Inducible Nitric-oxide Synthase mRNA in Pancreatic beta -Cells.** *Journal of Biological Chemistry* 276, 5368-5374.

Chabaud,M., Garnero,P., Dayer,J.M., Guerne,P.A., Fossiez,F., and Miossec,P. (2000). **CONTRIBUTION OF INTERLEUKIN 17 TO SYNOVIUM MATRIX DESTRUCTION IN RHEUMATOID ARTHRITIS.** *Cytokine* 12, 1092-1099.

Chen,C.Y. and Shyu,A.B. (1995). **AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation.** *Trends Biochem. Sci.* 20, 465-470.

Chen,J.K., Wang,D.W., Falck,J.R., Capdevila,J., and Harris,R.C. (1999). **Transfection of an active cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase indicates that 14,15-epoxyeicosatrienoic acid functions as an intracellular second messenger in response to epidermal growth factor.** *J. Biol. Chem.* 274, 4764-4769.

Coleman,R.A., Smith,W.L., and Narumiya,S. (1994). **International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes.** *Pharmacol. Rev.* 46, 205-229.

Crofford,L.J., Lipsky,P.E., Brooks,P., Abramson,S.B., Simon,L.S., and van de Putte,L.B. (2000). **Basic biology and clinical application of specific cyclooxygenase-2 inhibitors.** *Arthritis Rheum.* 43, 4-13.

Deak,M., Clifton,A.D., Lucocq,L.M., and Alessi,D.R. (1998). **Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB.** EMBO J. *17*, 4426-4441.

Dean,J.L., Brook,M., Clark,A.R., and Saklatvala,J. (1999). **p38 Mitogen-activated Protein Kinase Regulates Cyclooxygenase-2 mRNA Stability and Transcription in Lipopolysaccharide-treated Human Monocytes.** Journal of Biological Chemistry *274*, 264-269.

Dehlin,E., Wormington,M., Korner,C.G., and Wahle,E. (2000). **Cap-dependent deadenylation of mRNA.** The EMBO Journal *19*, 1079.

DeLise,A.M., Fischer,L., Tuan,R.S. (2000). **Cellular interactions and signaling in cartilage development.** Osteoarthritis Cartilage *8*, 309-34

Dennis,E.A. (1994). **Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2.** J. Biol. Chem. *269*, 13057-13060.

Derijard B,H.M. and Wu IH,B.T.S.B.D.T.K.M.D.R. (1994). **JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain.** Cell *76* , 1025-1037.

Dewitt,D.L. (1999). **Cox-2-selective inhibitors: the new super aspirins.** Mol. Pharmacol. *55*, 625-631.

DINARELLO,C.A. (1998). **Interleukin-1{beta}, Interleukin-18, and the Interleukin-1{beta} Converting Enzyme.** Ann NY Acad Sci *856*, 1-11.

DINARELLO,C.A. (2000). **Proinflammatory Cytokines.** Chest *118*, 503-508.

egrave, s,G., rin,S., Grall,D., Bonino,F., Smith,A., Anjuere,F., Auberger,P., and gur,J. (1999). **Defective Thymocyte Maturation in p44 MAP Kinase (Erk 1) Knockout Mice.** Science *286*, 1374.

Fanger,G.R., Johnson,N.L., and Johnson,G.L. (1997). **MEK kinases are regulated by EGF and selectively interact with Rac/Cdc42.** The EMBO Journal *16*, 4961.

Faour,W.H., He,Y., He,Q.W., de Ladurantaye,M., Quintero,M., Mancini,A., and Di Battista,J.A. (2001). **Prostaglandin E(2) regulates the level and stability of cyclooxygenase- 2 mRNA through activation of p38 mitogen-activated protein**

kinase in interleukin-1 beta-treated human synovial fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 276. 31720-31731.

Faour,W.H., Mancini,A., He,Q.W., and Di Battista,J.A. (2003). **T-cell-derived Interleukin-17 Regulates the Level and Stability of Cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA through Restricted Activation of the p38 Mitogen-activated Protein Kinase Cascade: ROLE OF DISTAL SEQUENCES IN THE 3'-UNTRANSLATED REGION OF COX-2 mRNA.** *Journal of Biological Chemistry* 278. 26897-26907.

Fell,HB. (1925). **The histogenesis of cartilage and bone in the long bones of the embryonic fowl.** *J Morphol* 40, 417-451

Ford,L.P., Watson,J., Keene,J.D., and Wilusz,J. (1999). **ELAV proteins stabilize deadenylated intermediates in a novel in vitro mRNA deadenylation/degradation system.** *Genes Dev.* 13, 188-201.

Fukunaga,R. and Hunter,T. (1997). **MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates.** *EMBO J.* 16, 1921-1933.

Funk,C.D., Funk,L.B., Kennedy,M.E., Pong,A.S., and Fitzgerald,G.A. (1991). **Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment.** *FASEB J.* 5, 2304-2312.

Gao,M., Wilusz,C.J., Peltz,S.W., and Wilusz,J. (2001). **A novel mRNA-decapping activity in HeLa cytoplasmic extracts is regulated by AU-rich elements.** *The EMBO Journal* 20, 1134.

Ge,B., Gram,H., Di Padova,F., Huang,B., New,L., Ulevitch,R.J., Luo,Y., and Han,J. (2002). **MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha.** *Science* 295, 1291-1294.

Ghosh S,M.M. and Kopp EB. (1998). **NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses.** *Annu Rev Immunol* 16, 225-260.

Gilston V,J.H. and Soo CC,C.A.B.S.K.C.B.P.M.C.B.D.W.P. (1997). **NF-kappa B activation in human knee-joint synovial tissue during the early stage of joint inflammation.** *Biochem Soc Trans* 25. 518S.

Gingras AC,R.B. and Sonenberg N (1999). **eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation.** *Annu Rev Biochem* 68, 913-963.

Glover,S., Bayburt,T., Jonas,M., Chi,E., and Gelb,M.H. (1995). **Translocation of the 85-kDa Phospholipase A[IMAGE] from Cytosol to the Nuclear Envelope in Rat Basophilic Leukemia Cells Stimulated with Calcium Ionophore or IgE/Antigen.** *Journal of Biological Chemistry* 270, 15359.

Graabaek,P.M. (1982). **Ultrastructural evidence for two distinct types of synoviocytes in rat synovial membrane.** *J. Ultrastruct. Res.* 78, 321-339.

Gray,H.a.G.C.M. (1973). **Gray's Anatomy: Anatomy of the Human Body.** In *Gray's Anatomy*, Lea & Febiger, ed. Philadelphia, Lea & Febiger).

Gupta S.C.D. and Derijard B,D.R. (1995). **Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway.** *Science* 267, 389-393.

Gupta,S., Barrett,T., Whitmarsh,A.J., Cavanagh,J., Sluss,H.K., Derijard,B., and Davis,R.J. (1996). **Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors.** *The EMBO Journal* 15, 2760.

Habener JF (1990). **Cyclic AMP response element binding proteins: a cornucopia of transcription factors.** *Mol Endocrinol* 4, 1087-1094.

Hall,R.A., Premont,R.T., and Lefkowitz,R.J. (1999). **Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm.** *J. Cell Biol.* 145, 927-932.

Hallberg,B., Rayter,S.I., and Downward,J. (1994). **Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation.** *Journal of Biological Chemistry* 269, 3913.

Hamm,H.E. (1998). **The many faces of G protein signaling.** *J. Biol. Chem.* 273, 669-672.

Han,J., Jiang,Y., Li,Z., Kravchenko,V.V., and Ulevitch,R.J. (1997). **Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation.** *Nature* 386, 296-299.

Han,J., Lee,J.D., Bibbs,L., and Ulevitch,R.J. (1994). **A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells.** *Science* 265, 808-811.

Hausdorff,W.P., Caron,M.G., and Lefkowitz.R.J. (1990). **Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function.** *FASEB J.* 4, 2881-2889.

Hazuda,D.J., Lee,J.C., and Young,P.R. (1988). **The kinetics of interleukin 1 secretion from activated monocytes. Differences between interleukin 1 alpha and interleukin 1 beta.** *Journal of Biological Chemistry* 263, 8473-8479.

Hebert,T.E., Moffett,S., Morello,J.P., Loisel,T.P., Bichet,D.G., Barret,C., and Bouvier,M. (1996). **A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation.** *J. Biol. Chem.* 271, 16384-16392.

Hemler,M.E. and Lands,W.E. (1980). **Evidence for a peroxide-initiated free radical mechanism of prostaglandin biosynthesis.** *Journal of Biological Chemistry* 255, 6253.

Hochberg MC (1995). **Guidelines for the medical management of osteoarthritis. Part II. Osteoarthritis of the knee.***American College of Rheumatology. Arthritis Rheum* 38, 1541-1546.

Hoon,M.A., Adler,E., Lindemeier,J., Battey,J.F., Ryba,N.J., and Zuker,C.S. (1999). **Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity.** *Cell* 96, 541-551.

Hsu H and Shu HB,P.M.G.D. (1996). **TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways.** *Cell* 84, 299-308.

Hsu,C.L. and Stevens,A. (1993). **Yeast cells lacking 5'-->3' exoribonuclease 1 contain mRNA species that are poly(A) deficient and partially lack the 5' cap structure.** *Mol. Cell. Biol.* 13, 4826.

Hutton CW (1989). **Osteoarthritis: the cause not result of joint failure?** *Ann Rheum Dis* 48, 958-961.

Ikeda,E., Achen,M.G., Breier,G., and Risau,W. (1995). **Hypoxia-induced Transcriptional Activation and Increased mRNA Stability of Vascular Endothelial Growth Factor in C6 Glioma Cells.** *Journal of Biological Chemistry* 270, 19761-19766.

Jiang,Y., Gram,H., Zhao,M., New,L., Gu,J., Feng,L., Di Padova,F., Ulevitch,R.J., and Han,J. (1997). **Characterization of the structure and function of the fourth**

member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. *J. Biol. Chem.* 272, 30122-30128.

Jovanovic,D.V., Di Battista,J.A., Martel-Pelletier,J., Jolicoeur.F.C., He,Y., Zhang,M., Mineau,F., and Pelletier,J.P. (1998). **IL-17 Stimulates the Production and Expression of Proinflammatory Cytokines, IL- β and TNF- α , by Human Macrophages.** *J Immunol* 160, 3513-3521.

Kallunki,T., Su,B., Tsigelny,I., Sluss,H.K., Derijard,B., Moore,G., Davis,R., and Karin,M. (1994). **JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation.** *Genes and Development* 8, 2996.

Karin M,B.-N.Y. (2000). **Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity.** *Annu Rev Immunol* 18, 621-663.

Karin,M., Liu,Z.g., and Zandi.E. (1997). **AP-1 function and regulation.** *Current Opinion in Cell Biology* 9, 240-246.

Karthein,R., Dietz,R., Nastainczyk,W., and Ruf,H.H. (1988). **Higher oxidation states of prostaglandin H synthase. EPR study of a transient tyrosyl radical in the enzyme during the peroxidase reaction.** *Eur. J. Biochem.* 171, 313-320.

Kennedy,I., Coleman,R.A., Humphrey,P.P., Levy,G.P., and Lumley,P. (1982). **Studies on the characterisation of prostanoid receptors: a proposed classification.** *Prostaglandins* 24, 667-689.

Kerkhoff,E. and Rapp,U.R. (2001). **The Ras-Raf relationship: an unfinished puzzle.** *Advances in Enzyme Regulation* 41, 261-267.

Khaselev,N. and Murphy.R.C. (1999). **Susceptibility of plasmenyl glycerophosphoethanolamine lipids containing arachidonate to oxidative degradation.** *Free Radic. Biol. Med.* 26, 275-284.

Kiefer,J.R., Pawlitz,J.L., Moreland,K.T., Stegeman,R.A., Hood,W.F., Gierse,J.K., Stevens,A.M., Goodwin,D.C., Rowlinson,S.W., Marnett,L.J., Stallings,W.C., and Kurumbail,R.G. (2000). **Structural insights into the stereochemistry of the cyclooxygenase reaction.** *Nature* 405, 97-101.

Klareskog,L., Forsum,U., Kabelitz,D., Ploen,L., Sundstrom,C., Nilsson,K., Wigren,A., and Wigzell,H. (1982). **Immune functions of human synovial cells. Phenotypic and T cell regulatory properties of macrophage-like cells that express HLA-DR.** *Arthritis Rheum.* 25, 488-501.

Koenig,J.A. and Edwardson,J.M. (1997). **Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors**. Trends Pharmacol. Sci. *18*, 276-287.

Kolakowski,L.F., Jr. (1994). **GCRDb: a G-protein-coupled receptor database**. Receptors. Channels *2*, 1-7.

Korner,C.G. and Wahle,E. (1997). **Poly(A) Tail Shortening by a Mammalian Poly(A)-specific 3'-Exoribonuclease**. Journal of Biological Chemistry *272*, 10448.

Korner,C.G., Wormington,M., Muckenthaler,M., Schneider,S., Dehlin,E., and Wahle,E. (1998). **The deadenylating nuclease (DAN) is involved in poly(A) tail removal during the meiotic maturation of Xenopus oocytes**. The EMBO Journal *17*, 5427.

Kosher,R.A., Kulyk,W.M., and Gay,S.W. (1986). **Collagen gene expression during limb cartilage differentiation**. J. Cell Biol. *102*, 1151-1156.

Kuettner KE, Goldberg VM. Introduction. In: **Kuettner KE, Goldberg VM, eds. Osteoarthritic Disorders**. American Academy of Orthopaedic Surgeons , xxi-xxv. 1995.

Ref Type: Report

Kujubu,D.A., Fletcher,B.S., Varnum,B.C., Lim,R.W., and Herschman,H.R. (1991). **TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue**. J. Biol. Chem. *266*, 12866-12872.

Kulmacz,R.J., Pendleton,R.B., and Lands,W.E. (1994). **Interaction between peroxidase and cyclooxygenase activities in prostaglandin-endoperoxide synthase. Interpretation of reaction kinetics**. J. Biol. Chem. *269*, 5527-5536.

Kulyk,W.M., Upholt,W.B., Kosher,R.A. (1989). **Fibronectin gene expression during limb cartilage differentiation**. Development *106*, 449-55

Kurumbail,R.G., Stevens,A.M., Gierse,J.K., McDonald,J.J., Stegeman,R.A., Pak,J.Y., Gildehaus,D., Miyashiro,J.M., Penning,T.D., Seibert,K., Isakson,P.C., and Stallings,W.C. (1996). **Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents**. Nature *384*, 644-648.

Kurzrok R,L.C. (1930). **Biochemical studies of human semen. the acton of semen on the human uterus**. Pro. Soc. Exp. Biol. Med. *28*, 268-272.

Kyriakis JM.B.P. and Nikolakaki E,D.T.R.E.A.M.A.J.W.JR. (1994). **The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases.** *Nature* 369, 156-160.

Kyriakis,J.M. and Avruch,J. (1990). **pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L- lysine.** *Journal of Biological Chemistry* 265, 17355.

Kyriakis,J.M. and Avruch,J. (1996). **Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation.** *J. Biol. Chem.* 271, 24313-24316.

Kyriakis,J.M. and Avruch,J. (2001). **Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation.** *Physiol Rev.* 81, 807-869.

LaGrandeur,T.E. and Parker,R. (1998). **Isolation and characterization of Dcp1p, the yeast mRNA decapping enzyme.** *The EMBO Journal* 17, 1487.

Landino,L.M., Crews,B.C., Timmons,M.D., Morrow,J.D., and Marnett,L.J. (1996). **Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 15069-15074.

Lands,W.E., Sauter,J., and Stone,G.W. (1978). **Oxygen requirement for prostaglandin biosynthesis.** *Prostaglandins Med.* 1, 117-120.

Lasa,M., Mahtani,K.R., Finch,A., Brewer,G., Saklatvala,J., and Clark,A.R. (2000). **Regulation of Cyclooxygenase 2 mRNA Stability by the Mitogen-Activated Protein Kinase p38 Signaling Cascade.** *Mol. Cell. Biol.* 20, 4265.

Lee,J.C., Laydon,J.T., McDonnell,P.C., Gallagher,T.F., Kumar,S., Green,D., McNulty,D., Blumenthal,M.J., Heys,J.R., Landvatter,S.W., and . (1994). **A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis.** *Nature* 372, 739-746.

Levy E (1993). **Socioeconomic costs of oosteoarthritis in France.** *Revue de rhumatisme* 60, 63S-67S.

Levy,G.N. (1997). **Prostaglandin H synthases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and colon cancer.** *FASEB J.* 11, 234-247.

Li,P., Sanz,I., O'Keefe,R.J., and Schwarz,E.M. (2000). **NF- κ B Regulates VCAM-1 Expression on Fibroblast-Like Synoviocytes.** *J Immunol* 164, 5990.

Lin,L.L., Wartmann,M., Lin,A.Y., Knopf,J.L., Seth,A., and Davis,R.J. (1993). **cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase.** *Cell* 72, 269-278.

Liu ZG.H.H. and Goeddel DV,K.M. (2003). **Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death.** *Cell* 87, 565-76.

Loll,P.J., Picot,D., and Garavito,R.M. (1995). **The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase.** *Nat. Struct. Biol.* 2, 637-643.

LUHESHI,G.N. (1998). **Cytokines and Fever: Mechanisms and Sites of Action.** *Ann NY Acad Sci* 856, 83-89.

Luong,C., Miller,A., Barnett,J., Chow,J., Ramesha,C., and Browner,M.F. (1996). **Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2.** *Nat. Struct. Biol.* 3, 927-933.

Makarov SS,J.W. and Olsen JC,W.J.M.K.R.C.H.J. (1997). **NF-kappa B as a target for anti-inflammatory gene therapy: suppression of inflammatory responses in monocytic and stromal cells by stable gene transfer of I kappa B alpha cDNA.** *Gene Ther* 4, 846-852.

Malkowski,M.G., Ginell,S.L., Smith,W.L., and Garavito,R.M. (2000). **The Productive Conformation of Arachidonic Acid Bound to Prostaglandin Synthase.** *Science* 289, 1933.

Malkowski,M.G., Thuresson,E.D., Lakkides,K.M., Rieke,C.J., Micielli,R., Smith,W.L., and Garavito,R.M. (2001). **Structure of Eicosapentaenoic and Linoleic Acids in the Cyclooxygenase Site of Prostaglandin Endoperoxide H Synthase-1.** *Journal of Biological Chemistry* 276, 37547.

Marshall,C.J. (1995). **Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation.** *Cell* 80, 179-185.

Martel-Pelletier J and Mineau F,J.D.D.B.J.P.J. (2001). **Mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappaB together regulate interleukin-17-induced nitric oxide production in human osteoarthritic chondrocytes: possible role of transactivating factor mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase (MAPKAPK).** *Arthritis Rheum* 42, 2399-2409.



McGeer,P.L. and McGeer.E.G. (1999). **Inflammation of the brain in Alzheimer's disease: implications for therapy.** *J. Leukoc. Biol.* 65, 409-415.

McLaughlin,M.M., Kumar,S., McDonnell,P.C., Van Horn,S., Lee,J.C., Livi,G.P., and Young,P.R. (1996). **Identification of Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase-activated Protein Kinase-3, a Novel Substrate of CSBP p38 MAP Kinase.** *Journal of Biological Chemistry* 271, 8488.

Merlie.J.P., Fagan,D., Mudd,J., and Needleman,P. (1988). **Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase).** *J. Biol. Chem.* 263, 3550-3553.

Miagkov,A.V., Kovalenko.D.V., Brown,C.E., Didsbury,J.R., Cogswell,J.P., Stimpson,S.A., Baldwin.A.S. and Makarov,S.S. (1998). **NF-kappa B activation provides the potential link between inflammation and hyperplasia in the arthritic joint.** *PNAS* 95, 13859.

Miyamoto S.V.I. (1995). **Rel/NF-kappa B/I kappa B story.** *Adv Cancer Res* 66, 255-92.

Miyazawa,K., Mori,A., Miyata,H., Akahane,M., Ajisawa,Y., and Okudaira,H. (1998). **Regulation of Interleukin-1beta -induced Interleukin-6 Gene Expression in Human Fibroblast-like Synoviocytes by p38 Mitogen-activated Protein Kinase.** *Journal of Biological Chemistry* 273, 24832.

Morita,I., Schindler,M., Regier,M.K., Otto,J.C., Hori,T., Dewitt,D.L., and Smith,W.L. (1995). **Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2.** *J. Biol. Chem.* 270, 10902-10908.

Morrow,J.D., Zackert,W.E., Yang,J.P., Kurhts,E.H., Callewaert,D., Dworski,R., Kanai,K., Taber,D., Moore,K., Oates,J.A., and Roberts,L.J. (1999). **Quantification of the major urinary metabolite of 15-F2t-isoprostane (8- iso-PGF2alpha) by a stable isotope dilution mass spectrometric assay.** *Anal. Biochem.* 269, 326-331.

Moseley,T.A., Haudenschild,D.R., Rose,L., and Reddi,A.H. (2003). **Interleukin-17 family and IL-17 receptors.** *Cytokine & Growth Factor Reviews* 14, 155-174.

Moses,H.L., Serra.R. (1996). **Regulation of differentiation by TGF-beta.** *Curr Opin Genet Dev* 6, 581-6

Mosior, M., Six, D.A., and Dennis, E.A. (1998). **Group IV Cytosolic Phospholipase A2 Binds with High Affinity and Specificity to Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Resulting in Dramatic Increases in Activity.** *Journal of Biological Chemistry* 273, 2184.

Mow, V.C., Ratcliffe, A., and Poole, A.R. (1992). **Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures.** *Biomaterials* 13, 67-97.

Mueller, M.J., Andberg, M., and Haeggstrom, J.Z. (1998). **Analysis of the molecular mechanism of substrate-mediated inactivation of leukotriene A4 hydrolase.** *J. Biol. Chem.* 273, 11570-11575.

Muir, H. (1995). **The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules.** *Bioessays* 17, 1039-48

Munroe, D.G. and Lau, C.Y. (1995). **Turning down the heat: new routes to inhibition of inflammatory signaling by prostaglandin H2 synthases.** *Chem. Biol.* 2, 343-350.

Nabors, L.B., Gillespie, G.Y., Harkins, L., and King, P.H. (2001). **HuR, a RNA Stability Factor, Is Expressed in Malignant Brain Tumors and Binds to Adenine- and Uridine-rich Elements within the 3' Untranslated Regions of Cytokine and Angiogenic Factor mRNAs.** *Cancer Res* 61, 2154-2161.

Narumiya, S., Sugimoto, Y., and Ushikubi, F. (1999). **Prostanoid receptors: structures, properties, and functions.** *Physiol Rev.* 79, 1193-1226.

Natoli, G., Costanzo, A., Ianni, A., Templeton, D.J., Woodgett, J.R., Balsano, C., and Levrero, M. (1997). **Activation of SAPK/JNK by TNF Receptor 1 Through a Noncytotoxic TRAF2-Dependent Pathway.** *Science* 275, 200.

Neininger, A., Kontoyiannis, D., Kotlyarov, A., Winzen, R., Eckert, R., Volk, H.D., Holtmann, H., Kollias, G., and Gaestel, M. (2002). **MK2 Targets AU-rich Elements and Regulates Biosynthesis of Tumor Necrosis Factor and Interleukin-6 Independently at Different Post-transcriptional Levels.** *Journal of Biological Chemistry* 277, 3065.

Nobel Prize. Samuelsson, Vane and Bergstrom were awarded the Nobel prize in medicine or physiology in 1982 and EJ Corey was awarded it in chemistry in 1990. 1982. Ref Type: Report

O'Hara.B.P., Urban,J.P., and Maroudas,A. (1990). **Influence of cyclic loading on the nutrition of articular cartilage.** *Ann. Rheum. Dis.* *49*, 536-539.

Ono,K. and Han,J. (2000). **The p38 signal transduction pathway: activation and function.** *Cell Signal.* *12*, 1-13.

Otto,J.C., Dewitt,D.L., and Smith,W.L. (1993). **N-glycosylation of prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 and their orientations in the endoplasmic reticulum.** *Journal of Biological Chemistry* *268*, 18234.

Otto,J.C. and Smith,W.L. (1996). **Photolabeling of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 with 3- trifluoro-3-(m-[125I]iodophenyl)diazirine as a probe of membrane association and the cyclooxygenase active site.** *J. Biol. Chem.* *271*, 9906-9910.

Pace-Asciak,C.R., Reynaud,D., Demin,P., and Nigam,S. (1999). **The hepxilins. A review.** *Adv. Exp. Med. Biol.* *447*, 123-132.

Pages,G., Lenormand,P., L'Allemain,G., Chambard,J., Meloche,S., and Pouyssegur,J. (1993). **Mitogen-Activated Protein Kinases p42mapk and p44mapk are Required for Fibroblast Proliferation.** *PNAS* *90*, 8319.

Pahl HL (1999). **Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors.** *Oncogene* *18*, 6853-6866.

Patrono,C. (1994). **Aspirin as an antiplatelet drug.** *N. Engl. J. Med.* *330*, 1287-1294.

Pearson,G., Robinson,F., Beers Gibson,T., Xu,B., Karandikar,M., Berman,K., and Cobb,M.H. (2001). **Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions.** *Endocr Rev* *22*, 153.

Peng,S.S., Chen,C.Y., and Shyu,A.B. (1996). **Functional characterization of a non-AUUUA AU-rich element from the c- jun proto-oncogene mRNA: evidence for a novel class of AU-rich elements.** *Mol. Cell Biol.* *16*, 1490-1499.

Peng,S.S., Chen,C.Y., Xu,N., and Shyu,A.B. (1998). **RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein.** *EMBO J.* *17*, 3461-3470.

Picot,D. and Garavito,R.M. (1994). **Prostaglandin H synthase: implications for membrane structure.** *FEBS Lett.* *346*, 21-25.

Picot,D., Loll,P.J., and Garavito,R.M. (1994). **The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1.** *Nature* 367, 243-249.

Pierce,K.L. and Regan,J.W. (1998). **Prostanoid receptor heterogeneity through alternative mRNA splicing.** *Life Sci.* 62, 1479-1483.

Probst,W.C., Snyder,L.A., Schuster,D.I., Brosius,J., and Sealfon,S.C. (1992). **Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily.** *DNA Cell Biol.* 11, 1-20.

Proudfoot,N. (2000). **Connecting transcription to messenger RNA processing.** *Trends in Biochemical Sciences* 25, 290-293.

Radhika,V. and Dhanasekaran,N. (2001). **Transforming G proteins.** *Oncogene* 20, 1607-1614.

Raingeaud,J., Gupta,S., Rogers,J.S., Dickens,M., Han,J., Ulevitch,R.J., and Davis,R.J. (1995). **Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen- activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine.** *J. Biol. Chem.* 270, 7420-7426.

Rajagopalan,L.E., Westmark,C.J., Jarzembowski,J.A., and Malter,J.S. (1998). **hnRNP C increases amyloid precursor protein (APP) production by stabilizing APP mRNA.** *Nucl. Acids. Res.* 26, 3418-3423.

Redini,F. (2001). **Structure and regulation of articular cartilage proteoglycan expression.** *Pathol Biol* 49, 364-75

Reinhard,C., Shamon,B., Shyamala,V., and Williams,L. (1997). **Tumor necrosis factor alpha -induced activation of c-jun N-terminal kinase is mediated by TRAF2.** *The EMBO Journal* 16, 1080.

Rooney,M., Condell,D., Quinlan,W., Daly,L., Whelan,A., Feighery,C., and Bresnihan,B. (1988). **Analysis of the histologic variation of synovitis in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum.* 31, 956-963.

Rouvier,E., Luciani,M.F., Mattei,M.G., Denizot,F., and Golstein,P. (1993). **CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene.** *J Immunol* 150, 5445-5456.

Russell,M., Lange-Carter,C.A., and Johnson,G.L. (1995). **Direct Interaction between Ras and the Kinase Domain of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Kinase (MEKK1)**. *Journal of Biological Chemistry* 270, 11757.

Rutault,K., Hazzalin,C.A., and Mahadevan,L.C. (2001). **Combinations of ERK and p38 MAPK Inhibitors Ablate Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha) mRNA Induction. EVIDENCE FOR SELECTIVE DESTABILIZATION OF TNF-alpha TRANSCRIPTS**. *Journal of Biological Chemistry* 276, 6666.

Samuelsson,B. (1983). **Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation**. *Science* 220, 568-575.

Schwartz,D.C. and Parker,R. (1999). **Mutations in Translation Initiation Factors Lead to Increased Rates of Deadenylation and Decapping of mRNAs in Saccharomyces cerevisiae**. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5247.

Schwartz,D.C. and Parker,R. (2000). **mRNA Decapping in Yeast Requires Dissociation of the Cap Binding Protein, Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E**. *Mol. Cell. Biol.* 20, 7933.

Serhan,C.N., Takano,T., and Maddox,J.F. (1999). **Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 and stable analogs on lipoxin A4 are potent inhibitors of acute inflammation. Receptors and pathways**. *Adv. Exp. Med. Biol.* 447, 133-149.

Shalom-Barak,T., Quach,J., and Lotz,M. (1998). **Interleukin-17-induced Gene Expression in Articular Chondrocytes Is Associated with Activation of Mitogen-activated Protein Kinases and NF-kappa B**. *Journal of Biological Chemistry* 273, 27467-27473.

Shapiro,P.S., Evans,J.N., Davis,R.J., and Posada,J.A. (1996). **The Seven-transmembrane-spanning Receptors for Endothelin and Thrombin Cause Proliferation of Airway Smooth Muscle Cells and Activation of the Extracellular Regulated Kinase and c-Jun NH(2)-terminal Kinase Groups of Mitogen-activated Protein Kinases**. *Journal of Biological Chemistry* 271, 5750.

Shiang,R., Thompson,L.M., Zhu,Y.Z., Church,D.M., Fielder,T.J., Bocian,M., Winokur,S.T., Wasmuth,J.J. (1994). **Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia**. *Cell* 78, 335-42

Siebenlist U.F.G. and Brown K (1994). **Structure, regulation and function of NF-kappa B**. *Annu Rev Cell Biol* 10, 405-455.

Sims,J.E. (2002). **IL-1 and IL-18 receptors, and their extended family.** Current Opinion in Immunology *14*, 117-122.

Smith WL (1994). **Prostaglandin endoperoxyde synthase, In: Signal H. Metal ions in biological systems** 163-199.

Smith,W.L. and Dewitt,D.L. (1996). **Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2.** Adv. Immunol. *62*, 167-215.

Smith,W.L., Garavito,R.M., and DeWitt,D.L. (1996). **Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases)-1 and -2.** Journal of Biological Chemistry *271*, 33157.

Smythies,J. (1996). **On the functional of neuromelanin.** Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci. *263*, 487-489.

Snyder,F. (1995). **Platelet-activating factor: the biosynthetic and catabolic enzymes.** Biochem. J. *305 (Pt 3)*, 689-705.

Stanton,L.A., Underhill,T.M., Beier,F. (2003). **MAP kinases in chondrocyte differentiation.** Dev Biol *263*, 165-75

Starnes,T., Robertson,M.J., Sledge,G., Kelich,S., Nakshatri,H., Broxmeyer,H.E., and Hromas,R. (2001). **Cutting Edge: IL-17F, a Novel Cytokine Selectively Expressed in Activated T Cells and Monocytes, Regulates Angiogenesis and Endothelial Cell Cytokine Production.** J Immunol *167*, 4137-4140.

Stokoe,D., Campbell,D.G., Nakielny,S., Hidaka,H., Leever,S.J., Marshall,C., and Cohen,P. (1992). **MAPKAP kinase-2; a novel protein kinase activated by mitogen-activated protein kinase.** EMBO J. *11*, 3985-3994.

Tan,L., Peng,H., Osaki,M., Choy,B.K., Auron,P.E., Sandell,L.J., Goldring,M.B. (2003). **Egr-1 mediates transcriptional repression of COL2A1 promoter activity by interleukin-1beta.** J Biol Chem *278*, 17688-700

Tay,A., Squire,J.A., Goldberg,H., and Skorecki,K. (1994). **Assignment of the human prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) gene to 1q25 by fluorescence in situ hybridization.** Genomics *23*, 718-719.

Taylor.G.A., Thompson.M.J., Lai,W.S., and Blackshear,P.J. (1995). **Phosphorylation of Tristetraprolin, a Potential Zinc Finger Transcription**

Factor, by Mitogen Stimulation in Intact Cells and by Mitogen-activated Protein Kinase in Vitro. *Journal of Biological Chemistry* 270, 13341.

Thuresson,E.D., Malkowski,M.G., Lakkides,K.M., Rieke,C.J., Mulichak,A.M., Ginell,S.L., Garavito,R.M., and Smith,W.L. (2001). **Mutational and X-ray crystallographic analysis of the interaction of dihomo-gamma -linolenic acid with prostaglandin endoperoxide H synthases.** *J. Biol. Chem.* 276, 10358-10365.

Tickle,C. and Munsterberg,A. (2001). **Vertebrate limb development--the early stages in chick and mouse.** *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 476-481.

Todd,J.L., Tanner,K.G., and Denu,J.M. (1999). **Extracellular Regulated Kinases (ERK) 1 and ERK2 Are Authentic Substrates for the Dual-specificity Protein-tyrosine Phosphatase VHR. A NOVEL ROLE IN DOWN-REGULATING THE ERK PATHWAY.** *Journal of Biological Chemistry* 274, 13271.

Tracey KJ and Cerami A (1993). **Tumor necrosis factor, other cytokines and disease.** *Annu Rev Cell Biol* 9, 317-343.

Tsai,A., Kulmacz,R.J., and Palmer,G. (1995). **Spectroscopic evidence for reaction of prostaglandin H synthase-1 tyrosyl radical with arachidonic acid.** *J. Biol. Chem.* 270, 10503-10508.

Tucker M,V.-S.M. and Staples RR,C.J.D.C.P.R. (2001). **The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in Saccharomyces cerevisiae.** *Cell* 104, 377-386.

Urban,J.P., Maroudas,A., Bayliss,M.T., and Dillon,J. (1979). **Swelling pressures of proteoglycans at the concentrations found in cartilaginous tissues.** *Biorheology* 16, 447-464.

Vandenabeele,P., Declercq,W., Beyaert,R., and Fiers,W. (1995). **Two tumour necrosis factor receptors: structure and function.** *Trends in Cell Biology* 5, 392-399.

Vane,J.R. (1971). **Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs.** *Nat. New Biol.* 231, 232-235.

Vincenti MP,C.C. and Brinckerhoff CE. (1998). **Nuclear factor kappaB/p50 activates an element in the distal matrix metalloproteinase 1 promoter in interleukin-1beta-stimulated synovial fibroblasts.** *Arthritis Rheum* 41, 1987-1994.

Von Euler US (1934). *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol* 175, 78.

Wang E and Ma WJ,A.C.S.D. (1997). **Posttranscriptional regulation of protein expression in human epithelial carcinoma cells by adenine-uridine-rich elements in the 3'-untranslated region of tumor necrosis factor-alpha messenger RNA.** *Cancer Res* 57, 5426-5433.

Wang SW,P.J. and Wathen ST,K.S.L.H.M.C. (1999). **Cytokine mRNA decay is accelerated by an inhibitor of p38-mitogen-activated protein kinase.** *Inflamm Res* 48, 533-538.

Wang,X.S., Diener,K., Manthey,C.L., Wang,S., Rosenzweig,B., Bray,J., Delaney,J., Cole,C.N., Chan-Hui,P.Y., Mantlo,N., Lichenstein,H.S., Zukowski.M. and Yao,Z. (1997). **Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated protein kinase.** *J. Biol. Chem.* 272, 23668-23674.

Wang,X.Z. and Ron,D. (1996). **Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase.** *Science* 272, 1347-1349.

Waskiewicz,A.J., Flynn,A., Proud,C.G., and Cooper,J.A. (1997). **Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2.** *EMBO J.* 16, 1909-1920.


Wells SE,H.P. and Vale RD,S.A. (1998). **Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors.** *Mol Cell* 2, 135-140.

Whiteside,S.T. and Israel,A. (1997). **I[kappa]B proteins: structure, function and regulation.** *Seminars in Cancer Biology* 8, 75-82.

WIDMANN,C.H.R.I., GIBSON,S.P.E.N., JARPE,M.B., and Johnson,G.L. (1999). **Mitogen-Activated Protein Kinase: Conservation of a Three-Kinase Module From Yeast to Human.** *Physiol. Rev.* 79, 143.

Wilkinson,L.S., Pitsillides,A.A., Worrall,J.G., and Edwards,J.C. (1992). **Light microscopic characterization of the fibroblast-like synovial intimal cell (synoviocyte).** *Arthritis Rheum.* 35, 1179-1184.

William J Koopman (1996). **Pathology of osteoarthritis.** In *Arthritis and Allied Conditions, a text book of rheumatology*, p. 1945.



Winzen,R., Kracht,M., Ritter,B., Wilhelm,A., Chen,C.Y., Shyu,A.B., Muller,M., Gaestel,M., Resch,K., and Holtmann,H. (1999). **The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism.** *The EMBO Journal* 18, 4969.

Xiao,G., Chen,W., and Kulmacz,R.J. (1998). **Comparison of structural stabilities of prostaglandin H synthase-1 and -2.** *J. Biol. Chem.* 273, 6801-6811.

Xie,W.L., Chipman,J.G., Robertson,D.L., Erikson,R.L., and Simmons,D.L. (1991). **Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 2692-2696.

Yan M.D.T. and Deak JC,K.J.Z.L.W.J.T.D. (2003). **Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1.** *Nature* 372, 798-800.

Yelin E.C.L. (1995). **The economic cost and social and psychological impact of musculoskeletal conditions.** *National Arthritis Data Work Groups. Arthritis Rheum* 38, 1351-1362.

Yokomizo,T., Izumi,T., Chang,K., Takuwa,Y., and Shimizu,T. (1997). **A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis.** *Nature* 387, 620-624.

Yokoyama,C., Takai,T., and Tanabe,T. (1988). **Primary structure of sheep prostaglandin endoperoxide synthase deduced from cDNA sequence.** *FEBS Lett.* 231, 347-351.

Yokoyama,C. and Tanabe,T. (1989). **Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase and primary structure of the enzyme.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165, 888-894.

Zhengbin.Y., Timour,M., Painter,S., Fanslow,W., and Spriggs,M. (1996). **Complete nucleotide sequence of the mouse CTLA8 gene.** *Gene* 168, 223-225.

Zohn,I.E., Yu,H., Li,X., Cox,A.D., and Earp,H.S. (1995). **Angiotensin II stimulates calcium-dependent activation of c-Jun N- terminal kinase.** *Mol. Cell. Biol.* 15, 6160.

