

# El autoantígeno SRP72 es influenciado por interleucina-1 $\beta$ para su expresión<sup>§</sup>

Víctor E. Arana-Argáez,\* Erika A. Martínez-García,\* Beatriz T. Martín-Márquez,\*  
José F. Muñoz-Valle,\* Trinidad García-Iglesias,\*\* Vidal Delgado-Rizo,\*\*  
Mónica Vázquez-Del Mercado\*,\*\*\*

## RESUMEN

En la búsqueda de proteínas fosforiladas reconocidas por el sistema inmune como autoantígenos, se identificó en suero de pacientes con dermatomiositis, la inmunoprecipitación del complejo SRP (del inglés *signal recognition particle* o partícula de reconocimiento de señal), en especial la subunidad de 72 kDa (SRP72), la cual se encuentra fosforilada selectivamente en sus residuos de serina. Una de las posibles vías de señalización involucradas en esta modificación postraduccional es la vía de las MAPK cinasas, la cual se divide en tres cascadas de fosforilación (ERK, p38 y JNK). El objetivo del presente trabajo fue dilucidar si la interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) es responsable de aumentar la expresión de SRP72, actuando como un mecanismo inductor de autoantigenicidad. Nuestros resultados preliminares demostraron que IL-1 $\beta$  (100 pg/mL) aumenta significativamente la expresión de SRP72 en células Jurkat entre los 90-120 minutos después de realizada la activación. Por medio de inhibidores de la vía MAPK, encontramos una disminución significativa en la expresión y fosforilación de SRP72 dos horas después de inhibir estas vías, lo que nos lleva a postular que una de las vías involucradas en la fosforilación de esta proteína es MAPK cinasas.

**Palabras clave:** Dermatomiositis, SRP72, MAPK cinasas, IL-1 $\beta$ .

## INTRODUCCIÓN

La dermatomiositis (DM) es una enfermedad reumática autoinmune que afecta al tejido muscular y cutáneo y en casos severos involucra a órganos internos

## ABSTRACT

*In the search of phosphorilated proteins recognized by the immune system as autoantigens, was identified the signal recognition particle (SRP) complex, in particular the subunit of 72 kDa (SRP72) as an autoantigen phosphorilated in serine residues seen in patients with dermatomyositis. One of the possible pathways involved in this postraduction modification is the MAPK pathway. The aim of this work was to identify if IL-1 $\beta$  is able to increase the SRP72 autoantigen expression and the kinase signaling pathway involved in the phosphorylation of SRP72 by IL-1 $\beta$ . Our preliminary results show that SRP72 activation was seen 90-120 min after addition of IL-1 $\beta$  (100 pg/mL). Using MAPK inhibitors we found a diminished expression of SRP72 protein 90-120 minutes after the addition of the inhibitor. We postulate that SRP72 protein is a phosphoprotein that is able to modify its expression by MAPK inhibitors.*

**Key words:** Dermatomyositis, SRP72, MAPK cinasas, IL-1 $\beta$ .

tales como corazón y pulmones. Las manifestaciones clínicas se caracterizan principalmente por graves lesiones en los músculos de la cintura escapular y pélvica, convirtiéndose en una enfermedad altamente incapacitante y dolorosa.<sup>1-4</sup>

<sup>§</sup> Trabajo ganador del III Premio Latinoamericano a la Investigación en el Laboratorio 2008 de BioSystems.

\* Instituto de Investigación en Reumatología y del Sistema Musculoesquelético, CUCS, Universidad de Guadalajara, Jalisco, México.

\*\* Laboratorio de Inmunología, CUCS, Universidad de Guadalajara.

\*\*\* Departamento de Reumatología, División de Medicina Interna, Hospital Civil "Juan I. Menchaca", Guadalajara, Jalisco, México.

### Correspondencia:

Dra. en C. Mónica Vázquez Del Mercado. Directora, Instituto de Investigación en Reumatología y del Sistema Musculoesquelético, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Sierra Mojada Núm. 950, Edificio P, Planta Baja, 44340; Guadalajara, Jalisco, México. E-mail: dravme@hotmail.com

Recibido: 07-01-2009

Aceptado: 29-04-2009

En la búsqueda de proteínas fosforiladas reconocidas por el sistema inmune como autoantígenos, utilizando el suero de pacientes con diversas enfermedades reumáticas como DM, artritis reumatoide (AR), lupus eritematoso generalizado (LEG) y síndrome de Sjögren (SS) como sondas inmunogénicas, se encontró que en lisados de células Jurkat marcadas con  $^{35}\text{S}$ -metionina e inmunoprecipitadas, el complejo SRP es inmunoprecipitado por el suero de pacientes con DM. Estos mismos experimentos fueron realizados en lisados celulares marcados con  $^{32}\text{P}$ -ortofosfato y se encontró la exclusiva fosforilación de la subunidad SRP72 en sus residuos de serina.<sup>5</sup>

La fosforilación es la modificación postraduccional más importante a nivel celular, actuando de manera reversible (fosforilación-defosforilación) como un mecanismo regulador de la actividad proteínica celular.<sup>6,7</sup> Proteínas que sufren fosforilación y segmentación proteolítica han sido identificadas como autoantígenos en enfermedades reumáticas. Al parecer la fosforilación tiene un importante papel en los mecanismos inductores de autoantigenicidad, ya que en pacientes con LEG y SS se ha reportado la presencia de proteínas reconocidas por el sistema inmune como extrañas cuando se encuentran fosforiladas.<sup>7</sup>

Una de las hipótesis que tratan de explicar este evento, es que estas modificaciones postraduccionales podrían desenmascarar epítopes crípticos capaces de romper la tolerancia hacia moléculas propias.<sup>7,8</sup>

Las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) son una familia de enzimas involucradas en importantes mecanismos celulares como la apoptosis, crecimiento y diferenciación celular.<sup>9</sup> Las tres vías mejor caracterizadas en la cascada de señalización de las MAPK cinasas son la vía de cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2), p38 y la vía de cinasas c-Jun N-terminal (JNK), las cuales están encargadas de fosforilar residuos conservados de serina, treonina y tirosina y son activadas en respuesta a estímulos extracelulares, estrés e inflamación.<sup>10</sup> Se ha descrito que citocinas proinflamatorias como la interleucina  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) causan una activación transitoria en las vías ERK1/2, p38 y JNK en AR y osteoartritis (OA) activando los mecanismos inductores de destrucción en las articulaciones de estos pacientes.<sup>11</sup> Por otra parte, se ha reportado que la IL- $1\beta$  se encuentra elevada en tejido muscular y sangre periférica de pacientes con DM.<sup>12</sup>

Actualmente se realizan protocolos con inhibidores de la vía MAPK como una terapia alternativa en pacientes con AR y OA.<sup>13</sup> Entre estos inhibidores de la vía MAPK se encuentran: PD98059 (2'-amino-3'-metoxiflavona) y HA1077 (sal dihidroclorida, 1-[5-isoquinolinosulfonil] homopiperazina), los cuales son

inhibidores de la vía ERK1/2 a nivel de MEK cinasa y RSK2, respectivamente, y SB203580 (fluorofenil)-2-(4-metilsulfonilfenil)-5-(4-piridil)-imidazol inhibidor de la vía p38 a nivel de SAPK2a/p38 $\alpha$ .<sup>14</sup>

Sin embargo, se desconoce si la vía de las MAPK cinasas está involucrada en la fosforilación y aumento de la expresión del autoantígeno fosforilado SRP72; por lo tanto, nuestro objetivo en el presente trabajo fue dilucidar si la vía MAPK cinasas inducida por IL- $1\beta$  es responsable de catalizar esta fosforilación y aumentar la expresión de SRP72, actuando como un mecanismo inductor de autoantigenicidad.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Cultivos celulares

Células Jurkat fueron crecidas en medio RPMI-1640 complementado con suero fetal bovino al 10% (inactivado por calor a 56 °C por 1 h), 100 U/mL penicilina, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  estreptomina todos de Gibco® (Paisley, Scotland), a 37 °C y 5%  $\text{CO}_2$ . Las células fueron expandidas en frascos de 75  $\text{cm}^2$  y cosechadas a las 72 horas. Antes de iniciar cada experimento se eliminó el medio de cultivo por centrifugación a 1,000 rpm por 7 minutos a 4 °C en una centrífuga Hettich Rotanta 460R y se decantó el medio sobrenadante. Las células fueron resuspendidas en 10 mL de medio RPMI-1640 complementado y contadas en una cámara de Nuebauer. Para cada experimento se utilizaron  $1 \times 10^6$  células, las cuales fueron transferidas a un frasco de cultivo de 25  $\text{cm}^2$  con 10 mL de medio RPMI-1640 complementado. La activación metabólica de SRP72 con IL- $\beta$  humana recombinante (Upstate®, Temecula, CA, EU) fue realizada a una concentración de 100  $\text{pg}/\text{mL}$  de medio de cultivo. Los inhibidores de la vía MAPK PD98059 (2'-amino-3'-metoxiflavona. Upstate®, Temecula, CA, EU) fueron adicionados en medio fresco junto con IL- $\beta$  humana recombinante (100  $\text{pg}/\text{mL}$ ) y cosechados a los 0, 120 y 240 minutos.

### Lisis celular

Las células fueron cosechadas y lavadas con solución salina fosfato 0.15 M pH 7.4 fría y solubilizadas en solución de lisis Nonidet P-40 (NP-40 al 1%, NaCl 150 mM, Tris base 50 mM, pH 7.8, EDTA 1 mM). La solución de lisis NP-40 fue suplementada inmediatamente con inhibidor de proteasas 25x (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) y las células lisadas mecánicamente mediante una jeringa de 3 mL y posteriormente incubadas en hielo por 1 hora. Los lisados resultantes

fueron centrifugados a 13,000 g por 45 minutos en una centrífuga refrigerada (Sorvall) y la mezcla de proteínas totales resultante fue cuantificada por el método de Bradford<sup>15</sup> y utilizada inmediatamente.

### **Inmunoelectrotransferencia (WB)**

De las proteínas totales obtenidas y cuantificadas 20  $\mu$ g fueron mezcladas en solución de carga Laemmli<sup>16</sup> (Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8, glicerol 10%, duodecil sulfato de sodio 2%, azul de bromofenol al 0.025% y  $\beta$ -mercaptoetanol al 5%) en una proporción 1:8 de muestra y solución respectivamente y calentadas por 5 minutos a 95-100 °C. Las muestras fueron cargadas en un gel de electroforesis de poliacrilamida-SDS al 12% y sometido a electroforesis por 4 horas a 80 volts en solución de corrimiento (Tris-HCl 95mM, glicina 960mM y SDS 0.5%), todo esto realizado en una cámara de electroforesis vertical MiniProtean 3 de BioRad® (Hercules, CA, EU). La electroforesis resultante fue transferida a una membrana de nitrocelulosa (Millipore®, Billerica, MA, EU), por 12 horas a 30 volts. Posterior a la transferencia la membrana fue bloqueada con solución TBS (Tris-base 20 mM pH 7.6, NaCl 150mM, HCl cbp pH 7.5) el cual contenía 5% de leche descremada grado WB (BioRad®, Hercules CA, EU) por 1 hora a temperatura ambiente. La membrana fue incubada con los anticuerpos de cabra anti-SRP72 humano y anticuerpos de ratón anti GAPDH humana, diluidos 1:2,000 en solución TBS y 0.5% de leche bloqueadora (Santa Cruz Biotechnology®, Santa Cruz, CA, EU). La membrana fue lavada 4 veces con solución TBS/T (Tris base 20 mM pH 7.6, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0.1%) e incubada con el anticuerpo secundario de burro anti-IgG de cabra conjugado con peroxidasa [Anti IgG-P] (Santa Cruz Biotechnology®, Santa Cruz, CA, EU) y anticuerpos de cabra IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Upstate®, Temecula, CA, EU), diluidos 1:2,500 en solución TBS y 0.5% de leche bloqueadora, por 45 minutos a temperatura ambiente y lavada cuatro veces con solución TBS/T por 10 minutos y el anticuerpo unido fue detectado por medio de incubación por 1 minuto con Luminol (Roche Applied Science®, Mannheim, Alemania) y su posterior exposición a una placa fotográfica ultrasensible (Kodak® BioMax XAR film) por 3 minutos. La cuantificación de la quimioluminiscencia emitida por las muestras fue cuantificada por medio del programa Kodak 1D v3.5.

### **Mapeo de cinasas**

Por medio del programa NetPhosK 1.0, se realizó un mapeo de la secuencia de aminoácidos correspondien-

te al autoantígeno SRP72 para identificar la o las cinasas con un mayor índice de predicción en fosforilar a esta proteína.

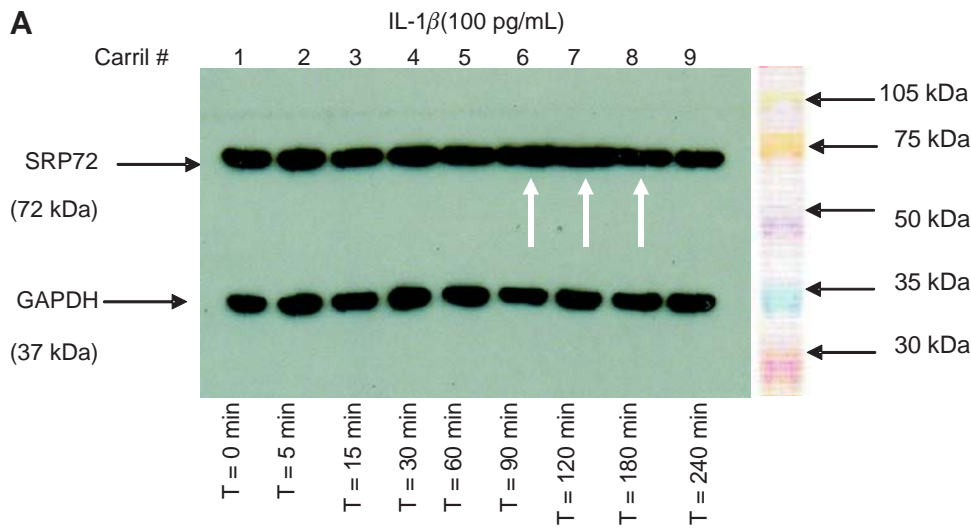
## **RESULTADOS**

### **Mapeo de cinasas**

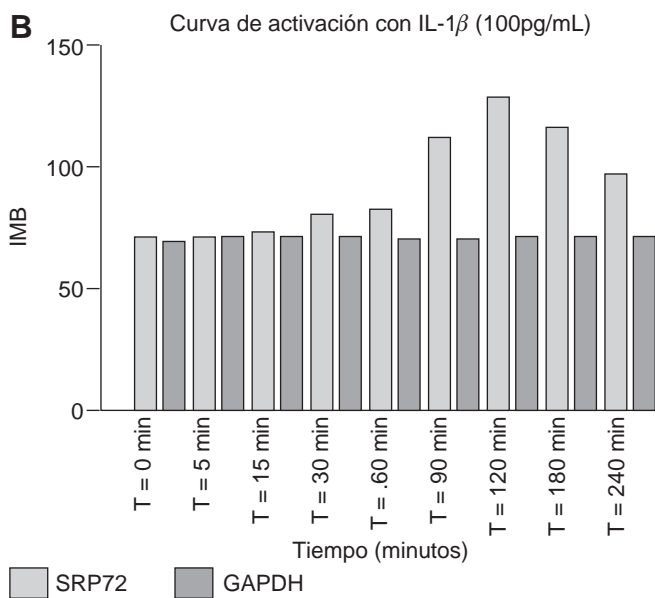
El resultado indicó la implicación de una serie de cinasas de serina y treonina, de las cuales elegimos para este trabajo experimental a las MAPK, ya que son cinasas que actúan sobre fosfoserinas. Se ha reportado que tienen efecto sobre algunas moléculas antigénicas y un índice de predicción de 0.56. Se descartaron todas las cinasas que tenían acción sobre residuos de treonina/tirosina ya que SRP72 es una proteína fosforilada exclusivamente en sus residuos de serina.<sup>5</sup>

### **IL-1 $\beta$ induce la sobreexpresión de SRP72 en células Jurkat**

Se evaluó si IL-1 $\beta$  tiene la habilidad de aumentar la expresión de SRP72 en células Jurkat, utilizando IL-1 $\beta$  recombinante a una concentración de 100 pg/mL. Los resultados obtenidos por medio de WB demuestran que IL-1 $\beta$  aumenta la expresión de SRP72, lo cual fue evidente 120 minutos después de la inducción con esta citocina (*Figura 1A*, carril 7). Este resultado fue observado por el aumento en la intensidad de la banda correspondiente a SRP72 (72 kDa). En las bandas correspondientes a los lisados celulares inducidos con IL-1 $\beta$  y obtenidos a los tiempos 0, 5, 10, 15, 30 y 60 (*Figura 1A*, carriles 1-6), se observó un aumento gradual en la intensidad de las bandas, lo que indica que la expresión de SRP72 aumentó gradualmente conforme transcurría el experimento. Las bandas obtenidas fueron analizadas mediante el programa Kodak® 1D v3.5 y reportados como intensidad media de la banda (IMB) y graficados por medio del programa Graphpad Prism v5. En la gráfica correspondiente a la activación de SRP72 con IL-1 $\beta$  (*Figura 1B*), observamos que la IMB aumenta gradualmente conforme avanza el tiempo del experimento, obteniendo una mayor intensidad a los 120 minutos (*Figura 1B*, Barra 7), lo que nos indica la sobreexpresión de SRP72 a los 120 minutos. Estos resultados demuestran que IL-1 $\beta$  induce la sobreexpresión de SRP72, 120 minutos posteriores a la activación, por lo que decidimos tratar las células con los inhibidores de la vía de MAPK cinasas y obtener muestras a los tiempos 0, 120 (activación) y 240 minutos.



**A)** Los resultados obtenidos por WB demostraron un aumento significativo en la expresión de SRP72 en células Jurkat inducidas con IL-1β, el cual fue evidente desde los 90 minutos (carril # 6), siendo más evidente a los 120 minutos posteriores a esta activación (carril # 7), disminuye a los 240 min mientras que en las células obtenidas a los tiempos 0, 5, 15, 30, 60 minutos se observa un aumento gradual en la intensidad de las bandas (carriles 1-5). Las bandas correspondientes al gen constitutivo GAPDH (37 kDa) no mostraron cambios relevantes en la intensidad de las bandas.



**B)** Estos resultados fueron analizados mediante el programa Kodak® 1D v3.5 y graficados, observando que la IMB correspondiente a SP72 (barras en gris) aumenta gradualmente conforme avanza el tiempo del experimento (Tiempos 0, 5, 15, 30 y 60 minutos), obteniendo una mayor IMB a los 90-180 minutos, mientras que las IMB correspondientes a GAPDH no presentaron cambios significativos (barras en cuadros).

**Figura 1.** IL-1β induce la sobreexpresión de SRP72 en células Jurkat.

### PD98059 inhibe la expresión de SRP72 dependiente de la vía MAPK-ERK1/2

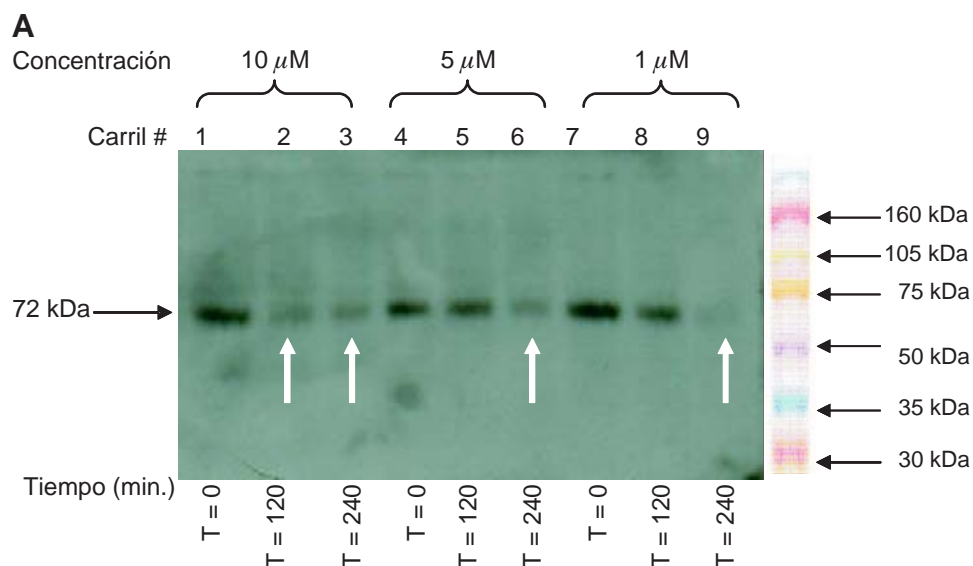
La habilidad de PD98059 de inhibir la expresión de SRP72 dependiente de la vía ERK1/2 a nivel de MEK1/2 en células Jurkat inducidas por IL-1β, se observó por medio de la IMB obtenidas por WB. En la *figura 2A* observamos la expresión de la proteína SRP72 al tiempo 0 minutos antes de ser tratadas con el inhibidor PD98059 a concentraciones de 10, 5, 1 μM (carriles 1, 4, 7), encontrando la misma intensidad en las bandas, lo que indica que SRP72 se expresa de igual manera al momento de iniciar el experimento. Sin embargo, 120 minutos posteriores a la

activación con IL-1β e inhibición con PD98059 observamos la disminución en la IMB en la muestra tratada a una concentración de 10 μM (carril 2), mientras que las bandas correspondientes a células tratadas a concentraciones de 5 y 1 μM (carriles 5 y 8) no mostraron disminución evidente en su intensidad. A los 240 minutos después de añadir el inhibidor se observó un bloqueo casi total de las bandas de las muestras tratadas a concentraciones de 10, 5 y 1 μM (carriles 3, 6, 9, respectivamente). El experimento se realizó por duplicado observándose resultados similares. Los resultados fueron analizados con el programa Kodak® 1D v3.5 y graficados (*Figura 2B*), encontrando que la IMB correspondiente a SRP72 se

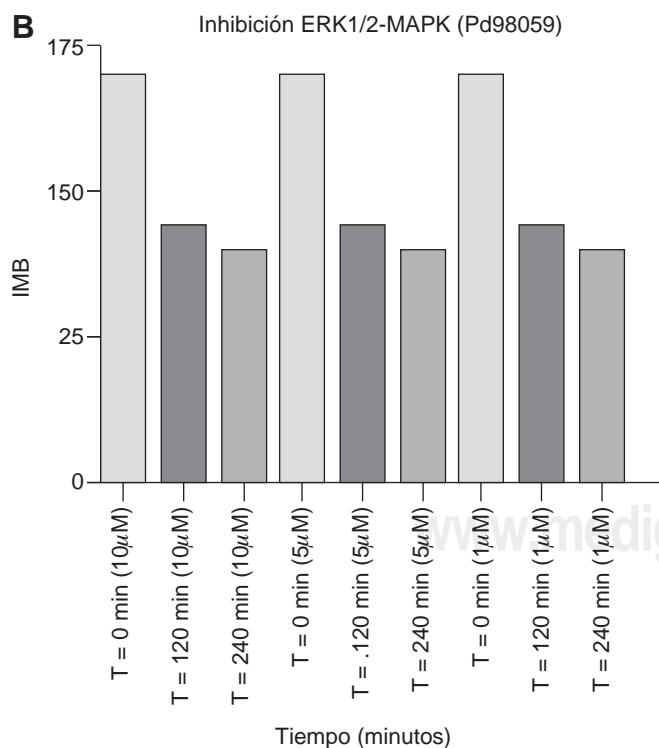


mantiene constante a los 0 minutos del experimento en todas las concentraciones del inhibidor. Sin embargo, tuvo una disminución significativa en la IMB correspondiente a la muestra tratada con PD98059 a una concentración de 10  $\mu$ M al tiempo 120 minutos ( $t = 120$  min, 10  $\mu$ M), disminución que no ocurrió en las bandas correspondientes a las concentraciones de 5 y 1  $\mu$ M. En las muestras obtenidas 240 minutos posteriores a la inhibición, la disminución fue signifi-

cativa en todas las bandas correspondientes a las muestras tratadas con PD98059 (10, 5, 1  $\mu$ M). Los resultados demostraron que la disminución en la expresión de SRP72 es dependiente de la inhibición de la vía MAPK-ERK1/2 a nivel de MEK1/2 por PD98059, desde una concentración de 10  $\mu$ M a los 120 minutos, con una inhibición casi total a los 240 minutos en las concentraciones que van desde 1, 5 y 10  $\mu$ M.



**A)** Células Jurkat activadas con IL-1 $\beta$  fueron inhibidas con PD98059 a concentraciones de 10  $\mu$ M (carriles 1-3), 5  $\mu$ M (carriles 4-6) y 1  $\mu$ M (carriles 7-9) y cosechadas a los tiempos 0 min (carriles 1, 4, 7), 120 min (carriles 2, 5, 8) y 240 min (carriles 3, 6, 9). Se observó una disminución en la intensidad de la banda correspondiente a SRP72, 120 minutos posterior a la adición de PD98059 (10  $\mu$ M) (carril #2). La disminución en la expresión fue más evidente 240 minutos después de adicionar el inhibidor a concentraciones de 10, 5 y 1  $\mu$ M (carriles 3, 6 y 9).



**B)** Los resultados fueron analizados mediante el programa Kodak® 1D v3.5 y graficados, observando una disminución en la IMB de la muestra tratada con PD98059 a una concentración de 10  $\mu$ M, 120 minutos después de adicionarse el inhibidor. La inhibición fue más evidente 240 minutos después de agregar el inhibidor PD98059 (10, 5, 1  $\mu$ M).

**Figura 2.** La inhibición de la expresión de SRP72 es dependiente de la vía MAPK-ERK1/2 a nivel de MEK quinasa.

## DISCUSIÓN

SRP72 desempeña un papel indispensable en la translocación de proteínas a través del retículo endoplásmico<sup>17</sup> y se ha descrito que se encuentra fosforilado exclusivamente en sus residuos de serina.<sup>5</sup> Sin embargo, se ha reportado que en pacientes con DM existe la pérdida de la tolerancia hacia esta proteína, desencadenando una enfermedad altamente agresiva y con baja respuesta a terapias convencionales.<sup>4,5</sup>

Hemos postulado que la hiperfosforilación de esta proteína podría originar la formación de epítopes crípticos que alteren la conformación estructural de la proteína y un aumento en la expresión de la misma por un incremento de citocinas proinflamatorias que pudieran estar involucradas en la pérdida a la tolerancia hacia SRP72 y como resultado ser reconocida por el sistema inmune como un autoantígeno.

De la misma forma, se ha reportado que IL-1 $\beta$  aumenta la expresión de algunos autoantígenos como COX-2 en enfermedades reumáticas como AR y osteoartritis de cartilago.<sup>11-14,18</sup> En el presente estudio se demostró que IL-1 $\beta$  está involucrada en el aumento significativo de la expresión de SRP72 en células Jurkat, lo cual podría inducir al sistema inmune a activar procesos autoinmunes hacia esta proteína.

Nuestros resultados nos demuestran que los inhibidores de la vía de MAPK, disminuyen significativamente la expresión inducida por IL-1 $\beta$ , y la fosforilación de SRP72 puede estar inhibida por la vía de MAPK. Estudios realizados en condrocitos demuestran el importante papel de esta vía de señalización sobre algunas moléculas.<sup>19</sup> Demostramos que la inhibición de SRP72 por el inhibidor PD98059 se produce dos horas posteriores a su adición desde una concentración de 1 a 10  $\mu$ M.

Actualmente se encuentran en desarrollo terapias experimentales con inhibidores de la vía MAPK para el tratamiento de la AR. Estos inhibidores han demostrado tener efecto antiinflamatorio y antierosivo en modelos de artritis experimental inducida, además de aliviar el dolor inflamatorio, lo cual resalta la importancia de estudiar las vías de señalización que modulan la expresión de los autoantígenos.<sup>13</sup>

Sin embargo, queda por investigar más a fondo esta vía de señalización en DM, ya que dilucidar vías de activación e inhibición de autoantígenos reportados en enfermedades reumáticas podría permitir el diseño de nuevas terapias para disminuir o evitar la pérdida de la tolerancia hacia estas moléculas.

## REFERENCIAS

- Dalakas MC, Hohlfeld R. Polymyositis and dermatomyositis. *Lancet*. 2003; 362: 971-82.
- Chinoy H, Salway F, Fertig N, Shephard N, Tait BD, Thomson W, et al. In adult onset myositis, the presence of interstitial lung disease and myositis specific/associated antibodies are governed by HLA class II haplotype, rather than by myositis subtype. *Arthritis Res Ther*. 2005; 8(1): R13.
- Lundberg IE. Cardiac involvement in autoimmune myositis and mixed connective tissue disease. *Lupus*. 2005; 14: 708-12.
- Lundberg IE. *The heart in dermatomyositis and polymyositis*. Rheumatology. (Oxford). 2006; 45 (Suppl 4): iv18-iv21.
- Utz PJ, Hottelet M, Le TM, Kim SJ, Geiger ME, van Venrooij WJ, et al. The 72-kDa component of signal recognition particle is cleaved during apoptosis. *J Biol Chem*. 1998; 273: 35362-70.
- Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the ying and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*. 1995; 80: 225-36.
- Kamachi M, Le TM, Kim SJ, Geiger ME, Anderson P, Utz PJ. Human autoimmune sera as molecular probes for the identification of an autoantigen kinase signaling pathway. *J Exp Med*. 2002; 196: 1213-25.
- Casciola-Rosen L, Nagaraju K, Plotz P, Wang K, Levine S, Gabrielson E, et al. Enhanced autoantigen expression in regenerating muscle cells in idiopathic inflammatory myopathy. *J Exp Med*. 2005; 201: 591-601.
- Inoue T, Boyle DL, Corr M, Hammaker D, Davis RJ, Flavell RA, et al. Mitogen-activated protein kinase 3 is a pivotal pathway regulating p38 activation in inflammatory arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 5484-9.
- Cowan KJ, Storey KB. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol*. 2003; 206(Pt 7): 1107-15.
- Nieminen R, Leinonen S, Lahti A, Vuolteenaho K, Jalonen U, Kankaanranta H, et al. Inhibitors of mitogen-activated protein kinases downregulate COX-2 expression in human chondrocytes. *Mediators Inflamm*. 2005; 2005: 249-55.
- Aleksza M, Szegedi A, Antal-Szalmás P, Irinyi B, Gergely L, Ponyi A, et al. Altered cytokine expression of peripheral blood lymphocytes in polymyositis and dermatomyositis. *Ann Rheum Dis*. 2005; 64: 1485-9.
- Dong C, Davis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol*. 2002; 20: 55-72.
- Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*. 2000; 351(Pt 1): 95-105.
- Bradford, MM. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-54.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-5.
- Lutcke H, Prehn S, Ashford AJ, Remus M, Frank R, Dobberstein B. Assembly of the 68- and 72-kD proteins of signal recognition particle with 7S RNA. *J Cell Biol*. 1993; 121: 977-85.
- Amin AR, Attur M, Patel RN, Thakker GD, Marshall PJ, Rediske J, et al. Super induction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis-affected cartilage. Influence of nitric oxide. *J Clin Invest*. 1997; 99: 1231-7.
- Geng Y, Valbracht J, Lotz M. Selective activation of the mitogen-activated protein kinase subgroups c-Jun NH2 terminal kinase and p38 by IL-1 and TNF in human articular chondrocytes. *J Clin Invest*. 1996; 98: 2425-30.