ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ-ΡΕΥΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΤΜΗΜΑ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΑΝΔΡΕΑΣ Π. ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
στις ``Κλινικές και Κλινικοεργαστηριακές Ειδικότητες``

Διδακτορική Διατριβή

**«Ο ρόλος κυτταροκινών και βιοχημικών οδών ενδοκυττάριας
σηματοδότησης στην παθογένεια των φλεγμονωδών αρθρίτιδων»**

Γεώργιος Δ. Καλλιόλιας
Ιατρός-Ρευματολόγος

ΠΑΤΡΑ 2009

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Ανδρέας Π. Αντωνόπουλος

Καθηγητής

Νικόλαος Ζούμπος

Καθηγητής

Σταμάτης-Νικόλαος Κ. Λιόσης

Επίκουρος Καθηγητής

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Ανδρέας Π. Αντωνόπουλος

Καθηγητής

Νικόλαος Ζούμπος

Καθηγητής

Φωτεινή Παληογιάννη

Καθηγήτρια

Σταμάτης-Νικόλαος Κ. Λιόσης

Επίκουρος Καθηγητής

Μαρίνα Καρακάντζα

Επίκουρη Καθηγήτρια

Αλέξανδρος Σπυριδωνίδης

Επίκουρος Καθηγητής

Έλενα Σολωμού

Λέκτορας

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής:

Τον **Dr Lionel B. Ivashkin** (Professor of Medicine and Immunology, Weill Medical College of Cornell University), για την καθοριστική συμβολή του στη διαμόρφωση της επιστημονικής μου σκέψης. Τον θεωρώ μέντορά μου και τον ευχαριστώ γιατί μου αφιέρωσε χρόνο και ενέργεια για να με διδάξει τα μυστικά της επιστημονικής έρευνας και της Ανοσολογίας. Μου παρείχε όλη την υλικοτεχνική υποδομή για την ολοκλήρωση της διατριβής μου και μου έδωσε την ευκαιρία να συμμετάσχω ενεργά σε ένα υψηλού επιπέδου ακαδημαϊκό περιβάλλον. Δεν ξεχνώ ότι χάρη σε αυτόν έγινε πραγματικότητα το όνειρο να εργαστώ σε ένα ερευνητικό κέντρο πρώτης γραμμής.

Τον **κ. Ανδρέα Αντωνόπουλο**, επιβλέποντα καθηγητή της παρούσας διατριβής, γιατί με δίδαξε τις αρχές της Ρευματολογίας και με ώθησε να ασχοληθώ με την διερεύνηση των μηχανισμών που οδηγούν στις φλεγμονώδεις αρθροπάθειες. Τον ευχαριστώ επίσης γιατί μου έμαθε να κατανοώ τα ρευματικά νοσήματα μέσα από το ευρύ πρίσμα της Εσωτερικής Παθολογίας και να ερμηνεύω την παθογένειά τους στα πλαίσια μιας συνολικής προσέγγισης του ανθρώπινου οργανισμού.

Τον **κ. Σταμάτη-Νικόλαο Λιόση**, Επίκουρο Καθηγητή και συν-επιβλέποντα στην παρούσα διατριβή, γιατί είναι ο κύριος “υπεύθυνος” για την πορεία που έχω χαράξει στην επιστημονική μου καριέρα. Με μύησε στη βασική έρευνα και με ενθάρρυνε στην απόφασή μου να διεκπεραιώσω την παρούσα διατριβή στο εργαστήριο του Dr. Ivashkin. Τέλος τον ευχαριστώ γιατί υπό την καθοδήγησή του έγιναν η συγγραφή της πρώτης μου επιστημονικής εργασίας και

της πρώτης μου ερευνητικής πρότασης. Μάλιστα αυτή η ερευνητική πρόταση ήταν και η αρχική διατύπωση της ιδέας πάνω στην οποία βασίστηκε η παρούσα διατριβή.

Την Rachael Gordon (Research Assistant), για την πολύτιμη βοήθεια στη διεκπεραίωση πειραμάτων.

Τον Dr. Jong Dae Ji (Associate Professor, Division of Rheumatology, College of Medicine, Korea University, Seoul), με τον οποίο μοιραστήκαμε τις επιστημονικές μας ανησυχίες και τον ίδιο πάγκο για 2 χρόνια.

Την Dr. Zhao Baohong (PhD) και την Dr. Kyung-Hyun Park-Min (PhD) γιατί με δίδαξαν τις τεχνικές που σχετίζονται με την οστεοκλαστογένεση.

Την Dr. Xiaoyu Hu (Assistant Professor, Weill Medical College of Cornell University) για τις συμβουλές και τις εποικοδομητικές συζητήσεις.

Όλους τους ρευματολόγους του Hospital for Special Surgery για την παροχή του μεγάλου αριθμού των αρθρικών υγρών που απαιτήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Τους ευχαριστώ επίσης γιατί μου επέτρεψαν να έχω πρόσβαση στις κλινικές πληροφορίες των ασθενών τους ώστε να συσχετίσω τα ευρήματα της έρευνάς μου με την κλινική εικόνα των ασθενών.

Όλα τα παρόντα και παρελθόντα μέλη του εργαστηρίου του Dr. Ivashkin για την συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα που δημιούργησαν.

Τη σύζυγό μου Ματίνα για την υπομονή, την υποστήριξη και την αγάπη της, στη διάρκεια των τριών δύσκολων χρόνων που περάσαμε μαζί στη Νέα Υόρκη.

Η παρούσα εργασία έγινε εφικτή χάρη σε γενναιόδωρη χορηγία, της τάξεως των 150.000\$, από το Arthritis Foundation, New York Chapter (Stavros S. Niarchos International Fellowship Exchange Program). Επίσης, σημαντική ήταν και η συμβολή μιας υποτροφίας ύψους 8.800 Euro από την Ελληνική Ρευματολογική Εταιρία (ΕΡΕ).

Πίνακας περιεχομένων

	Σελίδα
1. Εισαγωγή	1-29
1.1. ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗΣ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ	2-17
1.1.1. Η Ρευματοειδής Αρθρίτιδα ως πρότυπο των φλεγμονωδών αρθροπαθειών.	2
1.1.2. Κλινική εικόνα της ρευματοειδούς αρθρίτιδας.	3-4
1.1.3. Ιστοπαθολογία του αρθρικού υμένα στη Ρευματοειδή Αρθρίτιδα.	5
1.1.4. Παθογένεια της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας.	6-17
1.1.4.1. Το γενικό μοντέλο της αυτοανοσίας.	6
1.1.4.2. Ο ρόλος των γενετικών παραγόντων στην παθογένεια της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας.	7-8
1.1.4.3. Ο ρόλος των κυτταροκινών στην παθογένεια της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας.	9-12
1.1.4.3.1. Η θεωρία του δικτύου των κυτταροκινών.	11-12
1.1.4.4. Η παθογένεια των οστικών διαβρώσεων.	13-17
1.2. INTERLEUKINΗ 27 (IL-27)	18-29
1.2.1. Δομή της IL-27.	18-19
1.2.2. Ο μεμβρανικός υποδοχέας της IL-27.	20-21
1.2.3. Μονοπάτια ενδοκυττάριας σηματοδότησης της IL-27.	22-23
1.2.4. Οι βιολογικές δράσεις της IL-27.	24-29
1.2.4.1. Προφλεγμονώδεις λειτουργίες της IL-27.	24-25
1.2.4.2. Αντιφλεγμονώδεις λειτουργίες της IL-27.	26-27
1.2.4.3. Ο αιτιοπαθογενετικός ρόλος της IL-27 στη Ρευματοειδή Αρθρίτιδα.	28-29
2. Στόχοι της παρούσας διατριβής	30-32
3. Υλικά και Μέθοδοι	33-42
3.1. Κυτταροκαλλιέργειες.	34
3.2. Απομόνωση ανθρώπινων μονοκυττάρων / μακροφάγων.	34-35
3.3. Απομόνωση μονοκυττάρων ποντικού.	35
3.4. Ex vivo δημιουργία μακροφάγων ποντικού από κύτταρα μυελού των οστών	35-36
3.5. Δημιουργία οστεοκλαστών	36-37
3.6. Δοκιμασία σχηματισμού βοθρίων (pit formation assay)	37
3.7. Φωτομετρική εκτίμηση της βιωσιμότητας των προ-οστεοκλαστών (MTT assay)	38
3.8. Ανοσοκαθήλωση πρωτεϊνών (Western Blotting)	38-39
3.9. Ανίχνευση της έκφρασης γονιδίων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	39-42
4. Αποτελέσματα	43-89
4.1. Προφλεγμονώδεις λειτουργίες της IL-27	44-59
4.1.1. Η IL-27 προκαλεί παρατεταμένη ενεργοποίηση του STAT-1	48-49
4.1.2. Η IL-27 ενισχύει την απόκριση των ανθρώπινων μονοκυττάρων στους TLR-ligands με μηχανισμό που εξαρτάται από το STAT-1.	50-53

4.1.2.1. Η IL-27 επηρεάζει τη λειτουργία και ελαττώνει την παραγωγή της IL-10	54-58
4.2. Ο TNF-α οδηγεί στην παραγωγή IL-27 από τα μακροφάγα	59-61
4.3. Η IL-27 επάγει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα STAT-1	62-63
4.4. Αντιφλεγμονώδεις λειτουργίες της IL-27	64-67
4.4.1. Η IL-27 αναστέλλει τις προφλεγμονώδεις δράσεις της IL-1β	64-66
4.4.2. Η IL-27 αναστέλλει τις προφλεγμονώδεις δράσεις του TNF-α	67
4.5. Η IL-27 αναστέλλει την οστεοκλαστογένεση	68-77
4.5.1. Η IL-27 αναστέλλει την επαγωγή του NFATc1 από τον RANKL	71-72
4.5.2. Η IL-27 αναστέλλει την ενεργοποίηση μονοπατιών ενδοκυττάριας σηματοδότησης και την επαγωγή του c-jun από τον RANKL	73-74
4.5.3. Η IL-27 αναστέλλει την έκφραση του υποδοχέα RANK στους προ-οστεοκλάστες	75
4.5.4. Η IL-27 αναστέλλει την έκφραση του συνδιεγερτικού υποδοχέα TREM-2 στους προ-οστεοκλάστες	76-77
4.6. Τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα του ποντικίου αποκρίνονται ελάχιστα στην IL-27	78-80
4.6.1. Στα μακροφάγα του ποντικίου η έκφραση του υποδοχέα WSX-1 είναι ελάχιστη	80
4.7. Το φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον αναστέλλει τις δράσεις της IL-27 στα μονοκύτταρα και μακροφάγα.	81-89
4.7.1. Το φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον της άρθρωσης αναστέλλει τις δράσεις της IL-27	82-84
4.7.2. Αναστολή της δράσης της IL-27 από τις κυτταροκίνες TNF-α και IL-1β	85-86
4.7.3. Αναστολή της δράσης της IL-27 από τον LPS	87-89
5. Συζήτηση	90-102
5.1. Η παρατεταμένη ενεργοποίηση του STAT-1 ερμηνεύει τη δράση της IL-27 στα μονοκύτταρα και μακροφάγα	91-92
5.2. Ομοιότητες και διακριτοί ρόλοι ανάμεσα στην IL-27 και την IFN-γ	93-94
5.3. Οι αντιφλεγμονώδεις λειτουργίες της IL-27 στο πλαίσιο στείρας φλεγμονής	95-96
5.4. Η IL-27 είναι ισχυρός αναστολέας της οστεοκλαστογένεσης	97-100
5.5. Η IL-27 ως μελλοντική θεραπεία για τη Ρευματοειδή Αρθρίτιδα: προσδοκίες, προβλήματα και προοπτικές	101-102
6. Βιβλιογραφία	103-125
7. Περίληψη	126-128
8. Summary	129-131
9. Άρθρα	132

1. Εισαγωγή

1.1. ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗΣ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ

1.1.1. Η Ρευματοειδής Αρθρίτιδα ως πρότυπο των φλεγμονωδών αρθροπαθειών

Οι φλεγμονώδεις αρθρίτιδες είναι μια ευρεία και ετερογενής ομάδα παθήσεων, που χαρακτηρίζονται από ενεργοποίηση του ανοσολογικού συστήματος που οδηγεί σε οξεία ή/και χρόνια φλεγμονή των αρθρώσεων (Brent, 2009). Ο όρος “φλεγμονώδεις” χρησιμοποιείται για να τις ξεχωρίσει από αρθροπάθειες άλλης αιτιολογίας όπως η οστεοαρθρίτιδα, που σχετίζεται πρωτογενώς με εκφύλιση του αρθρικού χόνδρου κυρίως από μηχανικά αίτια (Goldring and Goldring, 2007). Η διάκριση βασίζεται στις σημαντικές διαφορές στο επίπεδο της αιτιοπαθογένειας, που αντανακλώνται στην κλινική εικόνα και στη διαφορετική θεραπευτική αντιμετώπιση (Berenbaum, 2008; Marino and McDonald, 1991; O'Dell, 2004; Schett, 2007). Το πρότυπο των φλεγμονωδών αρθροπαθειών είναι η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Firestein, 2003). Προσβάλλει το 0,5-3% του γενικού πληθυσμού (το ποσοστό ποικίλλει ανάλογα με τον πληθυσμό) (Gabriel, 2001) και εμφανίζεται με τριπλάσια συχνότητα στις γυναίκες από ότι στους άνδρες (Lleo et al., 2008).

ΕΙΚΟΝΑ 1: Κλινική εικόνα της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας: τυπική αρθρική προσβολή.

A: Ατρακτοειδής διόγκωση 2^{ου}-4^{ου} δακτύλου του αριστερού χεριού σε ασθενή με ΡΑ πρόσφατης έναρξης.

B: Διόγκωση της 2^{ης} και 3^{ης} εγγύς φαλαγγοφαλαγγικής άρθρωσης, λόγω πάχυνσης του αρθρικού υμένα, σε ασθενή με ΡΑ διάρκειας λίγων ετών.

Γ: Τυπικές παραμορφώσεις, διογκώσεις και αγκυλώσεις αρθρώσεων, με σημαντική ατροφία μεσώστων μυών, σε ασθενή με προχωρημένη νόσο.

1.1.2 Κλινική εικόνα της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας

Οι ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα κλινικά μπορεί να εμφανίσουν: 1) γενικά συμπτώματα (πυρέτιο ή πυρετό, αδυναμία, καταβολή, ανορεξία), 2) εκδηλώσεις από τις αρθρώσεις (πόνος, διόγκωση και δυσκαμψία) και 3) συστηματικές εξωαρθρικές εκδηλώσεις (αθηροσκλήρυνση, αγγειίτιδα, ρευματικά οζίδια, οστεοπόρωση, εκδηλώσεις από τους οφθαλμούς, τους πνεύμονες και την καρδιά) (Grassi et al., 1998; Halverson, 1995; Kaplan, 2009; McKellar et al., 2009; Nurmohamed, 2009; Turesson and Matteson, 2009). Η τυπική αρθρική προσβολή είναι μια χρόνια και προοδευτικά εξελισσόμενη περιφερική συμμετρική πολυαρθρίτιδα, που με την πάροδο του χρόνου (και κυρίως χωρίς την έγκαιρη αντιμετώπιση με τροποποιητικά της νόσου φάρμακα) μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή της άρθρωσης και των περιαρθρικών δομών (Scott et al., 1987), με τελικό αποτέλεσμα τις παραμορφώσεις και την αγκύλωση (**ΕΙΚΟΝΑ 1**) (Graudal, 2004; Sokka, 2009). Συχνότερα προσβάλλονται οι μικρές αρθρώσεις των χεριών και ποδιών. Οι αρθρώσεις του γόνατος, του ισχίου, της ωμικής ζώνης και ο αγκώνας μπορούν επίσης να προσβληθούν, αλλά, με εξαίρεση την αυχενική μοίρα της σπονδυλικής στήλης (Narvaez et al., 2008; Rawlins et al., 1998), ο αξονικός σκελετός δεν προσβάλλεται από τη ρευματοειδή

αρθρίτιδα. Άτυπες εμφανίσεις της νόσου είναι η οξεία έναρξη (ως μόνο- ή πολυ-αρθρίτιδα), η ασύμμετρη προσβολή των αρθρώσεων (Mjaavatten et al., 2009) και ο πυρετός αγνώστου αιτιολογίας (Revaz et al., 2006).

1.1.3 Ιστοπαθολογία του αρθρικού υμένα στη Ρευματοειδή Αρθρίτιδα

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα, αν και είναι συστηματική νόσος, κυρίως προσβάλλει τον αρθρικό υμένα των διαρθρώσεων με χαρακτηριστικό τρόπο. Ο φυσιολογικός αρθρικός υμένας έχει πολύ ιδιαίτερη ανατομική συγκρότηση και αποτελείται από δυο τμήματα: 1) έναν λεπτό εσωτερικό ανάγγειο υμένα, που αντικρύζει την αρθρική κοιλότητα και ονομάζεται *intima* και 2) έναν εξωτερικό υμένα που καλείται *subintima* (Athanasou et al., 1988). Το *intima* περιέχει μακροφάγα (Υμενικά Κύτταρα Τύπου A) και ινοβλάστες (Υμενικά Κύτταρα Τύπου B) διατεταγμένα σε 1-2 στιβάδες (Iwanaga et al., 2000), που συγκρατούνται μεταξύ τους μόνο με τη διαμεσολάβηση μιας μεμβρανικής πρωτεΐνης, που ονομάζεται καντχερίνη (cadherin) (Firestein, 2007; Lee et al., 2007; Lipsky, 2007). Η απουσία διάμεσου ιστού, δεσμοσωμάτων, επιθηλιακών κυττάρων και βασικής μεμβράνης, αποτελούν μοναδικά χαρακτηριστικά, που καθιστούν το *intima* μια ιδιαίτερη ανατομική δομή. Το *subintima* περιέχει κυρίως συνδετικό ιστό με λίγα αγγεία και ορισμένα κύτταρα (στρωματικά μεσεγχυματικά κύτταρα, λιποκύτταρα και ελάχιστα μακροφάγα, δένδριτικά κύτταρα, λεμφοκύτταρα και μαστοκύτταρα).

Στη ρευματοειδή αρθρίτιδα ο προσβεβλημένος αρθρικός υμένας ονομάζεται *πάννος* (*pannus*) και παρουσιάζει πάχυνση με εξεσημασμένη διαταραχή της αρχιτεκτονικής του (Bresnihan et al., 2000; Hitchon and el-Gabalawy, 2003; van Oosterhout et al., 2008) και διαβρώνει τον παρακείμενο αρθρικό χόνδρο και το υποχόνδρινο οστό (Hamilton, 1983). Η πάχυνση οφείλεται σε υπερπλασία των κυττάρων του *intima*, και διόγκωση του *subintima* λόγω νεοαγγείωσης, οιδήματος και διήθησης από μονοπύρρηνα κύτταρα (μονοκύτταρα/μακροφάγα, T-λεμφοκύτταρα και λίγα B-λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα) (Kruithof et al., 2005). Σε ένα 20% των ασθενών με PA τα μονοπύρρηνα κύτταρα οργανώνονται σε λεμφοζιδιακές δομές με βλαστικά κέντρα (Firestein, 2003).

1.1.4 Παθογένεια της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας

1.1.4.1. Το γενικό μοντέλο της αυτοανοσίας

Η παρουσία αυτο-αντισωμάτων (κυρίως Ρευματοειδούς Παράγοντα και αντισωμάτων κατά κιτρολινοποιημένων πεπτιδίων) στον ορό των περισσότερων ασθενών με PA (Vallbracht and Helmke, 2005; van Venrooij et al., 2004), συνεπάγεται ότι η νόσος έχει αυτοάνοση βάση (Harel and Shoenfeld, 2006). Το γενικό μοντέλο που έχει προταθεί για να ερμηνεύσει την ανάπτυξη της αυτοανοσίας είναι το εξής: σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα (Gregersen and Olsson, 2009), η επίδραση περιβαλλοντικών ερεθισμάτων (μικρόβια, ιοί, χημικά, κάπνισμα κ.α) (Costenbader and Karlson, 2006; Kobayashi et al., 2008b; Linn-Rasker et al., 2006) με τη συνεπίδραση ορμονικών παραγόντων (όπως η δράση των οιστρογόνων) (Lleo et al., 2008; Orbach and Shoenfeld, 2007), απορρυθμίζει τη λειτουργία του ανοσολογικού συστήματος, με αποτέλεσμα την δημιουργία αυτοαντιδραστικών λεμφοκυτταρικών κλώνων ή/και παραγωγή αυτοαντισωμάτων (Davidson and Diamond, 2001; Klareskog et al., 2006a; Klareskog et al., 2006b; Theofilopoulos, 1995a; Theofilopoulos, 1995b).

1.1.4.2. Ο ρόλος των γενετικών παραγόντων στην παθογένεια της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας

Είναι γνωστό εδώ και τρείς δεκαετίες ότι γονίδια που κωδικοποιούν ορισμένα μόρια του συμπλέγματος μείζονος ιστοσυμβατότητας τάξεως II (Major Histocompatibility Complex class II, MHC II), προδιαθέτουν στην ανάπτυξη Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας (Fernando et al., 2008). Κοινό χαρακτηριστικό τους είναι ότι μοιράζονται την ίδια αλληλουχία αμινοξέων στις θέσεις 70-74 της τρίτης υπερμεταβλητής περιοχής της αλυσίδας DRβ1. Αυτή η αλληλουχία είναι γνωστή ως κοινός επίτοπος (shared epitope, SE). Για την ερμηνεία του μηχανισμού με τον οποίο ο SE συνεισφέρει στην ανάπτυξη PA έχει προταθεί η λεγόμενη *θεωρία του κοινού επίτοπου (shared epitope theory)* (Gorman and Criswell, 2002). Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, ο κοινός επίτοπος βρίσκεται στην περιοχή σύνδεσης του μορίου MHC II με τα αντιγόνα και επηρεάζει την ένταση αυτής της σύνδεσης, άρα καθορίζει την ανοσολογική απάντηση στο αντιγόνο (de Vries et al., 2006).

Το 2004 αναγνωρίστηκαν μεταλλάξεις στο μόριο PTPN22 (Protein Tyrosine Phosphatase N22), που συσχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης PA (Begovich et al., 2004). Το PTPN22 είναι μια τυροσινική φωσφατάση, που ρυθμίζει μεταξύ άλλων, τον ουδό ενεργοποίησης του υποδοχέα των T-λεμφοκυττάρων (T-cell Receptor, TCR) (Vang et al., 2008). Μεταξύ των μεταλλάξεων που προδιαθέτουν σε PA, άλλες οδηγούν σε αύξηση (gain of function mutations) και άλλες σε μείωση (loss of function mutations) της ενεργότητας της φωσφατάσης (Bowes and Barton, 2008; Coenen and Gregersen, 2009). Ο μηχανισμός με τον οποίο αυτές οι μεταλλάξεις συνεισφέρουν στην ανάπτυξη της PA δεν είναι κατανοητός. Έχει πρόσφατα προταθεί πως κάποιες από τις μεταλλάξεις αυτές αυξάνουν τον ουδό ενεργοποίησης του TCR αυτοαντιδραστικών κλώνων και συμβάλλουν στο να διαφύγουν αυτοί οι κλώνοι την αρνητική επιλογή και την κλωνική εξάλειψη στο θύμο (Chung and Criswell, 2007).

Πρόσφατα έχει περιγραφεί συσχέτιση της PA με μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα STAT4 (Signal Transducer and Activator of Transcription 4) και μεταλλάξεις στους γενετικούς τόπους TRAF1-C5 και 6q23 (Kobayashi et al., 2008a; Plenge et al., 2007; Remmers et al., 2007). Η λίστα των γενετικών παραγόντων, που προδιαθέτουν σε PA, αναμένεται στο μέλλον να αυξηθεί κι άλλο (Barton et al., 2008; Bowes and Barton, 2008), επιβεβαιώνοντας το ότι η PA είναι μια σύνθετη νόσος (complex disease) με μεγάλη γενετική ετερογένεια (Coenen and Gregersen, 2009; Kochi et al., 2009; Pratt et al., 2009). Αυτή η γενετική ετερογένεια ίσως να ερμηνεύει και την παρατηρούμενη ετερογένεια στην κλινική έκφραση και στην απόκριση της νόσου στις διάφορες θεραπείες (van der Pouw Kraan et al., 2003; van Oosterhout et al., 2008).

1.1.4.3 Ο ρόλος των κυτταροκινών στην παθογένεια της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας

Την τελευταία δεκαετία, με τη χρήση βιολογικών θεραπειών, που εξουδετερώνουν τη δράση κυτταροκινών, έχει συμβεί μια πραγματική επανάσταση στην θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα (Feldmann, 2008). Στον Πίνακα 1 συνοψίζονται οι εγκεκριμένες και ευρέως χρησιμοποιούμενες θεραπείες μοριακής στόχευσης κυτταροκινών (Clark et al., 2004; Mertens and Singh, 2009; Scott and Kingsley, 2006; Taylor and Feldmann, 2009; Tracey et al., 2008; van Vollenhoven, 2009). Ο σχεδιασμός και η εφαρμογή τέτοιων αντι-κυτταροκινικών στρατηγικών αντιμετώπισης της ρευματοειδούς αρθρίτιδας βασίστηκε στην αναγνώριση του κεντρικού ρόλου που παίζουν οι κυτταροκίνες στην παθογένεια της νόσου (Brennan and McInnes, 2008; Choy and Panayi, 2001; Feldmann, 2009; Feldmann et al., 2001; Gabay and McInnes, 2009).

ΣΤΟΧΕΥΟΜΕΝΗ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΗ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ
A) TNF-α	
	1. Etanercept (Enbrel)
	2. Infliximab (Remicade)
	3. Adalimumab (Humira)
	4. Certolizumab Pegol (Cimzia)
	5. Golimumab (Simponi)
B) IL-1	
	1. Anakinra (Kineret)

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Εγκεκριμένες αντι-κυτταροκινικές βιολογικές θεραπείες για τη Ρευματοειδή Αρθρίτιδα.

Οι κυτταροκίνες είναι πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους που παράγονται από τα κύτταρα και συνδεόμενες με ειδικούς υποδοχείς στην κυτταρική επιφάνεια επάγουν πληθώρα βιολογικών δράσεων στα κύτταρα-στόχους (Dinarello, 2007; Haddad, 2002; Hideshima et al., 2005; Oppenheim, 2001). Αυτές οι μικρές πρωτεΐνες είτε εκκρίνονται στον εξωκυττάριο χώρο είτε βρίσκονται αγκυροβολημένες στην κυτταρική μεμβράνη. Οι εκκρινόμενες κυτταροκίνες ασκούν τη δράση τους είτε στο κύτταρο που τις παρήγαγε (αυτοκρινική δράση), είτε σε παρακείμενα κύτταρα (παρακρινική δράση), είτε εισέρχονται στην κυκλοφορία και ασκούν τη δράση τους σε απομακρυσμένους κυτταρικούς στόχους (ενδοκρινική δράση) (Kelso, 2000).

1.1.4.3.1 Η θεωρία του δικτύου των κυτταροκινών

Πριν από 20 περίπου χρόνια δημοσιοποιήθηκαν οι πρώτες παρατηρήσεις που άλλαξαν δραματικά τον τρόπο κατανόησης της παθογένειας της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και οδήγησαν στη σκέψη ότι η χρόνια φλεγμονή και οι οστικές διαβρώσεις που χαρακτηρίζουν τη νόσο είναι σε μεγάλο βαθμό το αποτέλεσμα της δράσης κυτταροκινών. Σε αυτές τις μελέτες διαπιστώθηκε ότι τα κύτταρα του αρθρικού υμένα ασθενών παρήγαγαν μεγάλες ποσότητες κυτταροκινών (κυρίως TNF- α , IL-1 β , GM-CSF και IL-8) και μπλοκάροντας ειδικά τη δράση του TNF- α με τη χρήση ενός μονοκλωνικού αντι-TNF αντισώματος (infliximab) αναστέλλονταν η παραγωγή των κυτταροκινών αυτών (Brennan et al., 1989a; Brennan et al., 1989b; Haworth et al., 1991). Αμέσως μετά, σε δύο μελέτες που δημοσιεύτηκαν την ίδια χρονική περίοδο, αποδείχθηκε ότι ο TNF- α μπορούσε να προκαλέσει σε ποντίκια διαβρωτική πολυαρθρίτιδα που μοιάζει με τη ρευματοειδή αρθρίτιδα των ανθρώπων (Keffner et al., 1991; Williams et al., 1992).

Τα συμπεράσματα αυτών των μελετών οδήγησαν στην λεγόμενη *θεωρία του δικτύου των κυτταροκινών*, που είναι τα τελευταία χρόνια το κυρίαρχο παράδειγμα κατανόησης της παθογένειας της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (Choy and Panayi, 2001; McInnes and Schett, 2007). Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, η ρευματοειδής αρθρίτιδα είναι το τελικό αποτέλεσμα της δράσης μιας ομάδας κυτταροκινών οι οποίες αλληλορυθμίζονται συγκροτώντας ένα είδος δικτύου (Feldmann and Maini, 2008). Σε αυτό το μοντέλο, ο TNF- α θεωρείται ότι βρίσκεται στο κέντρο του δικτύου και από τη δράση του ξεκινά ένας καταρράκτης παραγωγής άλλων κυτταροκινών, όπως είναι οι IL-1 β και IL-6 (Brennan and McInnes, 2008).

Σε αυτό το πλαίσιο σκέψης ξεκίνησαν στις αρχές της δεκαετίας του '90 οι πρώτες κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας με τη χρήση παραγόντων που μπλοκάρουν τη δράση του TNF- α (Elliott et al., 1993). Τα θετικά αποτελέσματα αυτών των

μελετών και μιας σειράς άλλων που ακολούθησαν (Elliott et al., 1994; Lipsky et al., 2000; Maini et al., 1999; Moreland et al., 1999; Weinblatt et al., 2003), οδήγησαν στο να αποτελούν σήμερα οι βιολογικοί παράγοντες που αναστέλλουν τον TNF- α τον ακρογωνιαίο λίθο της αντιμετώπισης των ασθενών με PA που δεν ανταποκρίνονται στη μεθοτρεξάτη (O'Dell, 2004; Olsen and Stein, 2004; Scott and Kingsley, 2006; Yazici and Yazici, 2008). Μάλιστα, στις ημέρες μας στο θεραπευτικό μας οπλοστάσιο διαθέτουμε 5 διαφορετικούς τέτοιους βιολογικούς παράγοντες που είναι εγκεκριμένοι για τη θεραπεία της PA (**ΠΙΝΑΚΑΣ 1** και (Tracey et al., 2008)).

Παρά την αποτελεσματικότητα στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, υπάρχει ένα 30-40% των ασθενών, που η PA δεν ανταποκρίνεται στην χορήγηση των αντι-TNF (Yazici, 2009). Αυτό ίσως σημαίνει ότι η θεωρία του δικτύου των κυτταροκινών πρέπει είτε να αναθεωρηθεί είτε να επαναδιατυπωθεί ώστε να ερμηνεύσει και τις περιπτώσεις που ο TNF- α δεν αποτελεί το κέντρο του δικτύου. Σε τέτοιες περιπτώσεις ίσως πρέπει να σκεφτούμε τον ρόλο που ενδεχομένως διαδραματίζουν άλλες κυτταροκίνες και άλλοι μεσολαβητές στην παθογένεια της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (Gabay and McInnes, 2009).

ΕΙΚΟΝΑ 2: Οστικές διαβρώσεις στη Ρευματοειδή Αρθρίτιδα. Τυπική εικόνα διάβρωσης της κεφαλής μετακάρπιου οστού σε ασθενή με ΡΑ.

1.1.4.4 Η παθογένεια των οστικών διαβρώσεων

Στην πορεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, εκτός από την υμενική φλεγμονή (synovitis), εμφανίζονται και χαρακτηριστικές οστικές διαβρώσεις (Schett, 2007). Στην τυπική τους μορφή εντοπίζονται στο σημείο πρόσφυσης του φλεγμαίνοντος αρθρικού υμένα στο παρακείμενο οστό (**ΕΙΚΟΝΑ 2**) και συμβάλλουν καθοριστικά στην καταστροφή της άρθρωσης. Είναι αποδεδειγμένο ότι οι οστικές διαβρώσεις οφείλονται στη δράση μιας ομάδας κυττάρων που ονομάζονται οστεοκλάστες (Gravallese et al., 1998; Schett and Teitelbaum, 2009). Οι οστεοκλάστες είναι αιματογενούς προέλευσης και προκύπτουν από μυελοειδή κύτταρα (μονοκύτταρα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα), που κάτω από κατάλληλες συνθήκες λειτουργούν ως προ-οστεοκλάστες (Sorensen et al., 2007; Xing et al., 2005). Συγκεκριμένα, όταν αυτά τα κύτταρα βρεθούν σε οστική επιφάνεια και εκτεθούν στα κατάλληλα ερεθίσματα, διαφοροποιούνται, συντήκονται και σχηματίζουν γιγάντια πολυπύρρηνα κύτταρα, που τελικά ενεργοποιούνται απορροφώντας την οστική ουσία στην οποία προσφύονται (Boyle et al., 2003). Υπό φυσιολογικές συνθήκες οι οστεοκλάστες παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανανέωση της οστικής μάζας (bone turn-over) και τον μεταβολισμό του ασβεστίου (Teitelbaum, 2000). Έχουν παρόμοια μορφολογία και κυτταρική προέλευση με τα γιγαντοκύτταρα των κοκκιωμάτων (Helming and Gordon, 2007), αλλά διαφέρουν από αυτά σε λειτουργικό επίπεδο και στο προφίλ μοριακής έκφρασης. Συγκεκριμένα

οι οστεοκλάστες ταυτοποιούνται από την έκφραση των μορίων *TRAP* (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase), *Calcitonin Receptor*, *Cathepsin K* και *Integrin β 3* (Boyle et al., 2003; Lee et al., 1995).

ΕΙΚΟΝΑ 3: Μοριακός μηχανισμός οστεοκλαστογένεσης. Η σύνδεση του M-CSF με τον υποδοχέα c-fms έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης του υποδοχέα RANK στη μεμβράνη των προ-οστεοκλαστών. Όταν ο RANKL συνδεθεί με τον RANK (1^ο Σήμα) προσελκύεται το μόριο TRAF6 και ενεργοποιούνται διάφορα βιοχημικά μονοπάτια ενδοκυττάριας σηματοδότησης. Συνδιεγερτικό σήμα (2^ο Σήμα) προερχόμενο από υποδοχείς που αναγνωρίζουν άγνωστους συνδέτες οδηγεί στην ενεργοποίηση του μονοπατιού του Ca⁺⁺. Τα δύο αυτά σήματα τελικά οδηγούν στην παραγωγή και ενεργοποίηση μιας σειράς μεταγραφικών παραγόντων με κυριώτερους τους NFκ-B, c-fos, c-jun και NFATc1. Αυτοί με τη σειρά τους κατευθύνουν την σύντηξη των προ-οστεοκλαστών σε πολυπύρρνα γιγαντοκύτταρα, τη διαφοροποίησή τους σε ώριμους οστεοκλάστες και τελικά την ενεργοποίησή τους.

Η κινητήριος δύναμη για την δημιουργία και ενεργοποίηση των οστεοκλαστών είναι μια πρωτεΐνη/κυτταροκίνη, που ονομάζεται RANKL (Receptor Activator of NFκ-B Ligand). Παλαιότερα ήταν γνωστή ως Παράγων Διαφοροποίησης Οστεοκλαστών (Osteoclast Differentiation Factor, ODF), Συνδέτης της Οστεοπροτεγερίνης (Osteoprotegerin Ligand, OPGL) (Lacey et al., 1998) ή TRANCE (TNF-Related Activation induced Cytokine) (Wong et al., 1997). Ο RANKL ανήκει στην ίδια οικογένεια με τον TNF-α (Tumour Necrosis Factor SuperFamily, TNFSF) και για αυτό αναφέρεται και ως TNFSF11. Ταυτοποιήθηκε το 1997 (Anderson et al.,

1997; Wong et al., 1997) και την επόμενη χρονιά αποδείχθηκε ο καθοριστικός ρόλος του στη διαδικασία της οστεοκλαστογένεσης (Lacey et al., 1998; Yasuda et al., 1998).

Το πρώτο βήμα για την δράση του RANKL στα κύτταρα-στόχους είναι η σύνδεσή του με το μεμβρανικό υποδοχέα που ονομάζεται RANK (**ΕΙΚΟΝΑ 3**). Ο τελευταίος είναι ένα μόριο του οποίου η έκφραση επάγεται από την κυτταροκίνη M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor) (Zhao et al., 2007). Μετά τη σύνδεση με τον RANKL, στο ενδοκυττάριο τμήμα του RANK προσελκύονται διάφορα μόρια της οικογένειας TRAF (TNF Receptor Associated Factor) με κυριότερο το TRAF6 (Galibert et al., 1998; Gohda et al., 2005; Kobayashi et al., 2001; Mizukami et al., 2002; Wong et al., 1999). Ακολουθεί ένας ενδοκυττάριος καταρράκτης παραγωγής βιοχημικών σημάτων, που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του NFκ-B και των MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) p38, Erk (Extracellular signal-Regulated Kinases) και JNK (c-Jun N-terminal Kinases) (Takayanagi, 2007a; Wada et al., 2006).

Κατά αντιστοιχία με το μοντέλο που έχει διατυπωθεί για να εξηγήσει την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων (Sharpe, 2009; Smith-Garvin et al., 2009), μια παρόμοια *θεωρία των δύο σημάτων* έχει προταθεί και για την διαφοροποίηση των προ-οστεοκλαστών σε οστεοκλάστες. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία εκτός από το πρώτο σήμα που παρέχει ο RANKL μετά τη σύνδεσή του με τον υποδοχέα RANK, απαιτείται και ένα δεύτερο συνδιεγερτικό σήμα (*co-stimulation*) (Koga et al., 2004). Στη δημιουργία αυτού του δεύτερου σήματος συμβάλλει μια ομάδα υποδοχέων στην επιφάνεια των προ-οστεοκλαστών, με κυριότερους τα μόρια TREM-2, OSCAR, SIRPβ1 και ILT7 (Humphrey et al., 2006; Matsuo and Irie, 2008; Paloneva et al., 2003). Όταν οι υποδοχείς αυτοί συνδεθούν με τους κατάλληλους συνδέτες (ligands), που ακόμη δεν έχει ανακαλυφθεί ποιοί είναι, ενεργοποιούν σε συνεργασία με τον RANK το μονοπάτι του ασβεστίου (Ca^{++} pathway), που είναι το αναγκαίο βήμα για την ενεργοποίηση και επαγωγή του

μεταγραφικού παράγοντα NFATc1 (Nuclear Factor of Activated T cells) (**ΕΙΚΟΝΑ 3**) (Negishi-Koga and Takayanagi, 2009). Αυτή η ενεργοποίηση του μονοπατιού του ασβεστίου από τους συνδιεγερτικούς υποδοχείς επιτυγχάνεται με τη διαμεσολάβηση των μορίων DAP12 και FcR γ (Shinohara and Takayanagi, 2007). Τα τελευταία είναι μοριακές πλατφόρμες που περιέχουν μια αμινοξική αλληλουχία που ονομάζεται ITAM και είναι σημαντική για τη δημιουργία των κατάλληλων βιοχημικών σημάτων που απαιτούνται για την ενεργοποίηση του μονοπατιού του ασβεστίου (Ivashkin, 2009).

Απόληξη όλων αυτών των βιοχημικών σημάτων είναι η παραγωγή και ενεργοποίηση μιας σειράς μεταγραφικών παραγόντων που είναι καθοριστικοί και αναγκαίοι για την οστεοκλαστογένεση (Boyle et al., 2003). Σε αυτούς τους μεταγραφικούς παράγοντες συμπεριλαμβάνονται τα μόρια c-jun και c-fos (που συγκροτούν τον μεταγραφικό παράγοντα AP-1) (Wagner and Eferl, 2005) και ο NFATc1 (Day et al., 2005) (**ΕΙΚΟΝΑ 3**). Χάρη στη δράση αυτών των μεταγραφικών παραγόντων επάγεται η έκφραση γονιδίων τα προϊόντα των οποίων ρυθμίζουν την δημιουργία και ενεργοποίηση των οστεοκλαστών (Hogan et al., 2003; Ikeda et al., 2004; Koga et al., 2005; Takayanagi, 2007b; Teitelbaum, 2004).

Σε ιστολογικά παρασκευάσματα από αρθρώσεις ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα έχει βρεθεί αυξημένος αριθμός οστεοκλαστών στις θέσεις που εκδηλώνονται οι οστικές διαβρώσεις, δηλαδή στο σημείο πρόσφυσης του rannus στο παρακείμενο οστό (Pettit et al., 2006). Το μικροπεριβάλλον του rannus θεωρείται ιδιαίτερα οστεοκλαστογόνο γιατί περιέχει μεγάλο αριθμό προ-οστεοκλαστών (μονοκύτταρα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα) και παρέχει τα κατάλληλα ερεθίσματα (κυρίως M-CSF και RANKL) για την διαφοροποίηση των προ-οστεοκλαστών σε ώριμους οστεοκλάστες (Gravallese et al., 2000). Ο M-CSF επάγει την έκφραση του υποδοχέα RANK στους εν δυνάμει προ-οστεοκλάστες καθιστώντας αυτά τα κύτταρα ικανά να αποκριθούν

στη δράση του RANKL. Στρωματικά κύτταρα (ινοβλάστες και οστεοβλάστες) και Τ-λεμφοκύτταρα που βρίσκονται στον ραχνός διεγείρονται από φλεγμονώδη ερεθίσματα (όπως TNF- α και IL-1 β) και παράγουν RANKL, ο οποίος στη συνέχεια, επιδρώντας στους παρακείμενους προ-οστεοκλάστες, επάγει τη διαφοροποίησή τους σε ώριμους και επιθετικούς οστεοκλάστες που προκαλούν τις οστικές διαβρώσεις (Leibbrandt and Penninger, 2009). Είναι αξιοσημείωτο ότι ο TNF- α (Kanazawa and Kudo, 2005; Kobayashi et al., 2000; Romas et al., 2002) και η IL-17 (Daoussis et al., 2008; Sato, 2008; Yago et al., 2009) μπορούν να δράσουν σε συνέργεια με τον RANKL επάγοντας την οστεοκλαστογένεση ακόμη και σε συνθήκες όπου η έκφραση του RANKL δεν είναι υψηλή.

1.2. ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ 27 (IL-27)

1.2.1 Δομή της IL-27

Η ιντερλευκίνη 27 (IL-27) είναι μια ετεροδιμερής κυτταροκίνη, που αποτελείται από δύο υπομονάδες, την EBI3 και την p28 (Pflanz et al., 2002). Με κριτήριο τις δομικές ομοιότητες, η IL-27 ανήκει στην ίδια οικογένεια με την ιντερλευκίνη 6 (IL-6) και τις επίσης ετεροδιμερείς κυτταροκίνες ιντερλευκίνη 12 (IL-12), ιντερλευκίνη 23 (IL-23) και την ιντερλευκίνη 35 (IL-35) (Gee et al., 2009) (**ΣΧΗΜΑ 1**). Όλες οι ανωτέρω κυτταροκίνες περιέχουν μια υπομονάδα που λειτουργεί ως διαλυτός υποδοχέας (η EBI3 για την IL-27 και την IL-35, ο IL-6R για την IL-6 και η p40 για τις IL-12 και IL-23). Ο διαλυτός υποδοχέας συνδέεται (συνήθως με δισουλφιδικό δεσμό) με μια δεύτερη υπομονάδα (την p28 για την IL-27, την IL-6 για την IL-6, την p35 για τις IL-12 και IL-35 και την p19 για την IL-23) (**ΣΧΗΜΑ 1**). Αυτό το ετεροδιμερές μόριο συγκροτεί τελικά την βιολογικά δραστική κυτταροκίνη (Batten and Ghilardi, 2007; Hunter, 2005; Kastelein et al., 2007; Villarino and Hunter, 2004; Yoshida and Miyazaki, 2008). Αξιοσημείωτο είναι επίσης το ότι έχουν βρεθεί ομοδιμερή p40-p40, των οποίων η πιθανή βιολογική σημασία βρίσκεται υπό διερεύνηση (Ling et al., 1995). Έτσι είναι ανοιχτό το ενδεχόμενο επιπλέον συνδυασμοί των ανωτέρω ή και άλλων υπομονάδων να συγκροτούν βιολογικά δραστικά μόρια αυξάνοντας τη λίστα των διμερών κυτταροκινών.

ΣΧΗΜΑ 1: Δομή των ετεροδιμερών κυτταροκινών της οικογένειας IL-6/IL-12

Η υπομονάδα EBI3 (Epstein-Barr Induced gene 3) πρωτοανακαλύφθηκε ως ένα προϊόν μιας κυτταρικής σειράς Β-λεμφοκυττάρων, του οποίου η σύνθεση επάγεται μετά από μόλυνση των εν λόγω κυττάρων με τον ιό Epstein-Barr (EBV) (Devergne et al., 1996). Το υπεύθυνο γονίδιο για τη σύνθεση της EBI3 έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 19 (19p13.3). Ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα EBI3 mRNA έχουν βρεθεί στον ανθρώπινο πλακούντα, σε λεμφικούς ιστούς (αμυγδαλές και σπλήνα) και σε ενεργοποιημένα μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος (Pflanz et al., 2002). Η EBI3 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη, που αποτελείται από 229 αμινοξέα, έχει μοριακό βάρος 34KD και παρουσιάζει 27% ομολογία με το μόριο p40. Λόγω της αμινοξικής της αλληλουχίας, δεν συνδέεται στην κυτταρική μεμβράνη αλλά εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο λειτουργώντας ως διαλυτός υποδοχέας για την p28 (συγκροτώντας την IL-27) (Pflanz et al., 2002) ή για την p35 (συγκροτώντας την IL-35) (Collison and Vignali, 2008; Collison et al., 2007; Niedbala et al., 2007).

Η υπομονάδα p28 κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 16 (16p11), συγκροτείται από 243 αμινοξέα και είναι γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος περίπου 28KD (για αυτό και η ονομασία p28) (Pflanz et al., 2002). Στον άνθρωπο η p28 παρουσιάζει την ιδιαιτερότητα να εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο μόνο όταν συνυπάρχει στο κύτταρο EBI3 (Pflanz et al., 2002). Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι στον ανθρώπινο οργανισμό βιολογικά δραστική IL-27 παράγουν μόνο τα κύτταρα που συνεκφράζουν και τις δύο υπομονάδες p28 και EBI3. Τέτοια κύτταρα είναι τα ενεργοποιημένα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (δενδριτικά, μακροφάγα και μονοκύτταρα) και συνιστούν την κύρια πηγή IL-27 υπό συνθήκες φλεγμονής ή λοίμωξης. Επίσης, στη διάρκεια της εγκυμοσύνης τροφοβλαστικά και συγκύτιοτροφοβλαστικά κύτταρα παράγουν IL-27 (Coulomb-L'Hermine et al., 2007).

ΣΧΗΜΑ 2: Η δομή του υποδοχέα της IL-27.

1.2.2. Ο μεμβρανικός υποδοχέα της IL-27

Ο υποδοχέας της IL-27 πάνω στη μεμβράνη των κυττάρων-στόχων είναι επίσης ετεροδιμερής αποτελούμενος από τις υπομονάδες WSX-1 και gp130 (**ΣΧΗΜΑ 2**) (Pflanz et al., 2004). Η πεπτιδική αλυσίδα WSX-1 (636 αμινοξέα), που ονομάζεται και IL-27Ra ή TCCR (T-Cell Cytokine Receptor), αποτελείται από ένα επίμηκες εξωκυττάριο τμήμα (482 αμινοξέα), ένα μικρό διαμεμβρανικό τμήμα και μια βραχεία ενδοκυττάρια ουρά (96 αμινοξέα) (Chen et al., 2000). Το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα WSX-1 συνδέεται απευθείας με την p28 υπομονάδα της IL-27. Η βραχεία ουρά συμμετέχει στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση καθώς εγγύς της κυτταρικής μεμβράνης περιλαμβάνει μια αμινοξική αλληλουχία, που λέγεται Box-1 και πιστεύεται ότι είναι θέση σύνδεσης της κινάσης Jak1, ενώ στο άπω τμήμα βρίσκεται μια αλληλουχία που εμπεριέχει τυροσίνη στη θέση 613.

Η άλλη υπομονάδα gp130 (ονομάζεται και CD130) συμμετέχει μόνο στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση και όχι στη σύνδεση με την IL-27 (Scheller et al., 2005). Αξίζει να σημειωθεί ότι εκτός από τη συμμετοχή της στη συγκρότηση του μεμβρανικού υποδοχέα της IL-27, η gp130 αποτελεί μέρος του υποδοχέα και άλλων κυτταροκινών, όπως της IL-6, IL-11, CNTF, LIF, CLC, OSM και CT-1 (Boulanger and Garcia, 2004; Bravo and Heath, 2000; Murakami et al., 2004; Scheller and Rose-John, 2006). Είναι μια μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη αποτελούμενη από 918 αμινοξέα με μια μακρά ενδοκυττάρια ουρά (μήκους 277 αμινοξέων), που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση με τις πέντε τυροσίνες που περιέχει (στις θέσεις 759, 767, 814, 905 και 915) (**ΣΧΗΜΑ 2**) (Ernst and Jenkins, 2004; Kamimura et al., 2003; Schmitz et al., 2000) (Fukada et al., 1999; Heinrich et al., 1998). Εγγύς της κυτταρικής μεμβράνης το ενδοκυττάριο τμήμα περιέχει δυο αμινοξικές αλληλουχίες (Box-1 και Box-2) που αποτελούν θέσεις σύνδεσης για τις κινάσες της οικογένειας Jak (Jak1, Jak2 και Tyk2) (Carbia-Nagashima and Arzt, 2004; Chow et al., 2002; Kurth et al., 2000).

1.2.3. Μονοπάτια ενδοκυττάριας σηματοδότησης της IL-27

Με τη σύνδεση της IL-27 στην υπομονάδα WSX-1 ξεκινά ο καταρράκτης της ενδοκυττάριας σηματοδότησης, που τελικά θα οδηγήσει στη βιολογική απάντηση του κυττάρου-στόχος στην IL-27 (Pflanz et al., 2004). Αρχικά ενεργοποιούνται οι κινάσες της οικογένειας Jak, που βρίσκονται συνδεδεμένες στα Box-1 και Box-2 των WSX-1 και gp130, με μια σειρά αυτοφωσφορυλιώσεων και διασταυρούμενων φωσφορυλιώσεων της μιας κινάσης προς την άλλη (Batten and Ghilardi, 2007). Ακολούθως, οι ενεργοποιημένες κινάσες φωσφορυλιώνουν τις ενδοκυττάριας τυροσίνες του ετεροδιμερούς υποδοχέα. Οι φωσφορυλιωμένες τυροσίνες με τη σειρά τους προσελκύουν μέλη της οικογένειας STAT (κυρίως STAT-1 και STAT-3), που λανθάνουν στο κυτταρόπλασμα (Ivashkin and Hu, 2004). Συγκεκριμένα, η φωσφορυλιωμένη τυροσίνη 613 της υπομονάδας WSX-1 προσελκύει τον μεταγραφικό παράγοντα STAT-1 (Pflanz et al., 2004) και οι τυροσίνες 767, 814, 905 και 915, της υπομονάδας gp130 προσελκύουν τον μεταγραφικό παράγοντα STAT-3 (Schmitz et al., 2000). Είναι αξιοσημείωτο ότι οι φωσφορυλιωμένες τυροσίνες 905 και 915 μπορούν επίσης να συνδεθούν και με το STAT-1, αλλά η χημική συγγένεια προς το STAT-3 είναι σαφώς μεγαλύτερη (**ΣΧΗΜΑ 2**).

Τα μόρια STAT, που βρίσκονται συνδεδεμένα στις φωσφορυλιωμένες τυροσίνες, φωσφορυλιώνονται και αυτά με τη σειρά τους από τις Jak κινάσες και ακολούθως αποσυνδέονται σχηματίζοντας ομο- ή ετεροδιμερή μεταξύ τους (Darnell et al., 1994). Με αυτή τη μορφή των διμερών εισέρχονται στον πυρήνα του κυττάρου όπου συνδέονται σε ειδικές ρυθμιστικές θέσεις του γενετικού υλικού και λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες επάγοντας την έκφραση των γονιδίων που στοχεύουν (Darnell, 1997; Levy and Darnell, 2002). Η βιολογική δράση των προϊόντων αυτών των γονιδίων θα καθορίσει την απάντηση του κυττάρου στην IL-27. Τέλος, η τυροσίνη 759 παίζει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο καθώς, όταν φωσφορυλιωθεί, προσελκύει την

φωσφατάση SHP-2 και την πρωτεΐνη SOCS3, που και οι δυο αναστέλλουν την ενεργοποίηση του μονοπατιού Jak-STAT σε συστήματα υποδοχέων που περιέχουν την υπομονάδα gp130 (Fischer et al., 2004; Sengupta et al., 1996).

1.2.4. Οι βιολογικές δράσεις της IL-27

Κύριος στόχος της δράσης της IL-27 είναι τα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος. Ο ρόλος της στη ρύθμιση της επίκτητης ανοσίας (adaptive immunity) έχει μελετηθεί εκτενέστατα, ενώ ελάχιστες είναι οι πληροφορίες για τη δράση της στο σκέλος της φυσικής ανοσίας (innate immunity) (Batten and Ghilardi, 2007). Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, η IL-27 θεωρείται πλειότροπη κυτταροκίνη καθώς της αποδίδονται τόσο προ-φλεγμονώδεις όσο και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Carl and Bai, 2008; Villarino et al., 2004; Villarino and Hunter, 2004).

1.2.4.1. Προφλεγμονώδεις λειτουργίες της IL-27

Το 2000 δημοσιεύτηκε μια μελέτη που αναδείκνυε τη σημασία του μεμβρανικού υποδοχέα WSX-1 στην ανάπτυξη ανοσολογικής απόκρισης τύπου Th1 (Chen et al., 2000). Η Th1 είναι η κλασσική απόκριση της επίκτητης ανοσίας στην παρουσία ενδοκυττάρων παθογόνων (Coffman, 2006). Συνίσταται στην ανάπτυξη κλώνων T-λεμφοκυττάρων, που εξειδικεύονται στο να παράγουν μεγάλες ποσότητες IFN- γ , και προϋποθέτει την επαγωγή του μεταγραφικού παράγοντα T-bet στα εκπτυσσόμενα και διαφοροποιούμενα T-λεμφοκύτταρα (Steinman, 2007). Ο T-bet επάγει με τη σειρά του την έκφραση του μεμβρανικού υποδοχέα IL-12R β 2 και καθιστά τα T-λεμφοκύτταρα ικανά να απαντούν στην IL-12, την κύρια κυτταροκίνη που κατευθύνει την ανάπτυξη της απόκρισης Th1 (Reinhardt et al., 2006). Αργότερα, αποδείχθηκε ότι η κυτταροκίνη που ασκούσε αυτή τη δράση στην ανάπτυξη της Th1 μέσω του WSX-1, ήταν η IL-27, η οποία, ενεργοποιώντας το STAT-1 στα T-λεμφοκύτταρα, προκαλεί επαγωγή του T-bet (Hibbert et al., 2003; Kamiya et al., 2004; Lucas et al., 2003; Owaki et al., 2006; Takeda et al., 2003).

Μια ακόμη προφλεγμονώδης λειτουργία της IL-27 είναι η αναστολή των ρυθμιστικών T-λεμφοκυττάρων (regulatory T-cells, T-reg). Τα τελευταία είναι υποπληθυσμός T-λεμφοκυττάρων,

που έχουν ως κύρια λειτουργία τους τον περιορισμό της ανοσολογικής απόκρισης με διάφορους μηχανισμούς, μεταξύ των οποίων είναι η παραγωγή της κυτταροκίνης IL-10 (Mills, 2004). Δυσλειτουργία αυτών των κυττάρων έχει δειχθεί ότι συμμετέχει στην παθογένεια αυτοάνοσων νοσημάτων (Sakaguchi et al., 2006). Για την ανάπτυξή τους είναι καθοριστικής σημασίας η επαγωγή του μεταγραφικού παράγοντα Foxp3 (Lohr et al., 2006). Η IL-27, ενεργοποιώντας τον μεταγραφικό παράγοντα STAT-3 στα διαφοροποιούμενα Τ-λεμφοκύτταρα, ελαττώνει την έκφραση του Foxp3 και έτσι αναστέλλει την δημιουργία των Treg (Huber et al., 2008).

1.2.4.2. Αντιφλεγμονώδεις λειτουργίες της IL-27

Ενώ η IL-27 ανακαλύφθηκε ως μια προ-φλεγμονώδης κυτταροκίνη, σύντομα έγινε αντιληπτό ότι έχει και ισχυρότατες αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Stumhofer and Hunter, 2008). Το 2003 δημοσιεύτηκε ότι η IL-27, σε αντίθεση με τις προηγούμενες παρατηρήσεις, ασκεί και έντονη αναστολή της ανοσολογικής απόκρισης τύπου Th1 (Villarino et al., 2003). Σε αυτό το πλαίσιο, η επικρατούσα άποψη για τη σύνθετη δράση της IL-27 στην ανάπτυξη της Th1 συνοψίζεται ως εξής: στην αρχή της ανοσολογικής απόκρισης, η IL-27 μπορεί να διευκολύνει την ανάπτυξη της Th1 καθιστώντας τα διαφοροποιούμενα T-κύτταρα δεκτικά στην δράση της IL-12 (Owaki et al., 2005). Αργότερα όμως, όταν η ανάπτυξη της απόκρισης τύπου Th1 έχει ευοδωθεί, αλλάζει ρόλο και αναστέλλει την εγκατεστημένη Th1 με στόχο να περιοριστεί η ένταση της προκαλούμενης φλεγμονής και η έκταση της ιστικής καταστροφής.

Ένας άλλος τύπος απόκρισης των T-λεμφοκυττάρων στα αντιγόνα είναι η απόκριση τύπου Th2 (Coffman and Carty, 1986; Mosmann et al., 1986). Η Th2 χαρακτηρίζεται από τη δημιουργία κλώνων T-λεμφοκυττάρων, που εξειδικεύονται στην παραγωγή των κυτταροκινών IL-4, IL-13 και IL-10, και παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη χυμικής ανοσίας ενάντια σε εξωκυττάρια παθογόνα και εμπλέκεται στην παθογένεια του άσθματος και της αλλεργίας. Καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη των Th2 λεμφοκυττάρων παίζει η επαγωγή του μεταγραφικού παράγοντα GATA-3 στα διαφοροποιούμενα T-λεμφοκύτταρα (Reinhardt et al., 2006). Σε διάφορες μελέτες έχει αποδειχθεί η ικανότητα της IL-27 να περιορίζει την απόκριση Th2 αναστέλλοντας της επαγωγή του GATA-3 (Lucas et al., 2003).

Τα T-λεμφοκύτταρα, εκτός από τους υποπληθυσμούς Th1, Th2 και Treg, μπορούν να διαφοροποιηθούν και προς την κατεύθυνση Th17 (Ivanov et al., 2007; Steinman, 2007). Τα Th17 λεμφοκύτταρα εξειδικεύονται στην παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών της

οικογένειας IL-17 (Gaffen, 2009; Kolls and Linden, 2004; Miossec et al., 2009; Weaver et al., 2006), συμβάλλουν στην αντιμετώπιση παθογόνων (μυκήτων και βακτηρίων) (Dubin and Kolls, 2008) και προσφάτως έχουν εμπλακεί στην παθογένεια αυτοάνοσων παθήσεων όπως η Ρευματοειδής Αρθρίτιδα (Annunziato et al., 2009; Shahrara et al., 2008) και η Κατά Πλάκας Σκλήρυνση (Furuzawa-Carballeda et al., 2007). Σε πληθώρα μελετών έχει αποδειχθεί ότι η IL-27 παρουσιάζει ισχυρότατες αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες αναστέλλοντας την ανοσολογική απόκριση τύπου Th17 (Batten et al., 2006; Colgan and Rothman, 2006; Diveu et al., 2009; Fitzgerald et al., 2007a; Stumhofer et al., 2006). Η IL-27 επιτυγχάνει αυτή την αναστολή ενεργοποιώντας το STAT-1 στα διαφοροποιούμενα T-λεμφοκύτταρα (Amadi-Obi et al., 2007; Neufert et al., 2007).

Το 2007 δημοσιεύτηκαν ταυτόχρονα τρεις μελέτες που έδειξαν ότι η IL-27, ενεργοποιώντας τους μεταγραφικούς παράγοντες STAT-1 και STAT-3, παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή της κυτταροκίνης IL-10 από τα T-λεμφοκύτταρα (Awasthi et al., 2007; Fitzgerald et al., 2007b; Stumhofer et al., 2007). Η παραγόμενη IL-10 έχει ισχυρότατες αντιφλεγμονώδεις δράσεις και πιστεύεται ότι συμβάλλει στην αναστολή των Th1 και Th17 που περιγράφηκε προηγουμένως.

1.2.4.3. Ο αινιγματικός ρόλος της IL-27 στη Ρευματοειδή Αρθρίτιδα

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν αντικρουόμενα στοιχεία για την εμπλοκή της IL-27 στην παθογένεια των φλεγμονωδών αρθροπαθειών. Σε δύο μοντέλα φλεγμονώδους αρθρίτιδας στα τρωκτικά (adjuvant-induced arthritis και proteoglycan-induced arthritis), έχει δειχθεί ότι η IL-27 είναι παθογόνος (Cao et al., 2008; Goldberg et al., 2004). Η παθογόνος δράση της έχει ερμηνευτεί ως το αποτέλεσμα της ικανότητας της IL-27 να επάγει την έναρξη της ανοσολογικής απόκρισης τύπου Th1. Αντίθετα, σε ένα άλλο μοντέλο αρθρίτιδας στα τρωκτικά (collagen-induced arthritis), η IL-27 έχει προστατευτική δράση που οφείλεται στην αναστολή των Th17 (Niedbala et al., 2008).

Η IL-27 ανιχνεύτηκε πρόσφατα στον αρθρικό υμένα ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα (Niedbala et al., 2008), αλλά το ο ρόλος της στην παθογένεια της αρθρίτιδας των ανθρώπων παραμένει αδιευκρίνιστος. Τα μοντέλα αρθρίτιδας στα πειραματόζωα, θεωρούνται μάλλον απλοποιημένες εκδοχές της παθογένειας της ανθρώπινης ρευματοειδούς αρθρίτιδας (Asquith et al., 2009), οπότε η μεταφορά των όποιων συμπερασμάτων από τα μοντέλα αυτά στους ανθρώπους πρέπει να γίνεται με πολύ περίσκεψη (Firestein, 2009).

Κατά το παρελθόν, η ρευματοειδής αρθρίτιδα θεωρούνταν Th1 νόσος, ενώ τα τελευταία χρόνια υπάρχουν ενδείξεις για την εμπλοκή των Th17 κυττάρων στην πρόκληση της αρθρικής φλεγμονής (Shahrara et al., 2008). Δεδομένης της πολύπλοκης δράσης της IL-27 στη διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων στους εξειδικευμένους πληθυσμούς Th1 και Th17, η διερεύνηση του πιθανού ρόλου της στην παθογένεια της ρευματοειδούς μοιάζει με δυσεπίλυτο αίνιγμα.

Επιπλέον, όλες οι απόπειρες αποτίμησης του ρόλου της IL-27 στην πρόκληση ή την αναχαίτηση της αρθρικής φλεγμονής έχουν γίνει εστιάζοντας στις δράσεις της πάνω στο σκέλος

της επίκτητης ανοσίας. Όμως στην παθογένεια της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, ο ρόλος της φυσικής ανοσίας είναι εξίσου σημαντικός. Μέγιστη απόδειξη για αυτό είναι ο κεντρικός ρόλος του TNF- α , που είναι ένα κατεξοχήν προϊόν των ενεργοποιημένων κυττάρων της φυσικής ανοσίας (μονοκυττάρων, μακροφάγων και δενδριτικών κυττάρων), στην πρόκληση της αρθρικής φλεγμονής.

2. Στόχοι της παρούσας Διατριβής

Ο κύριος στόχος της παρούσας διατριβής είναι η διερεύνηση του ρόλου της IL-27 στην παθογένεια της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Στα πειραματόζωα έχει άλλοτε παθογενετική (Cao et al., 2008; Goldberg et al., 2004) και άλλοτε προστατευτική δράση (Niedbala et al., 2008), ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο μοντέλο αρθρίτιδας. Στον άνθρωπο, παρότι έχει ανιχνευτεί στον αρθρικό υμένα ασθενών (Niedbala et al., 2008), η λειτουργία της παραμένει άγνωστη. Σε αυτό το πλαίσιο θα εξετάσουμε:

1. Τη δράση της IL-27 στα ανθρώπινα μονοκύτταρα και μακροφάγα του περιφερικού αίματος υγιών ατόμων. Δεδομένου του κεντρικού ρόλου των μονοκυττάρων και μακροφάγων στην παθογένεια της PA (Firestein, 2003; Firestein and Zvaifler, 2002), αναρωτηθήκαμε αν η IL-27 έχει προ-φλεγμονώδεις ή αντιφλεγμονώδεις λειτουργίες σε αυτά τα κύτταρα. Για να απαντήσουμε αυτό το ερώτημα θα εξετάσουμε: α) ποια βιοχημικά μονοπάτια ενδοκυττάριας σηματοδότησης ενεργοποιεί, β) ποιών γονιδίων την έκφραση επάγει και γ) πώς επηρεάζει βασικές λειτουργίες των μονοκυττάρων/μακροφάγων (όπως την απόκριση στους TLR-ligands και στις κυτταροκίνες TNF- α και IL-1 β).
2. Τη δράση της IL-27 στην οστεοκλαστογένεση. Δεδομένης της παρουσίας, στις αρθρώσεις ασθενών με PA, αυξημένου αριθμού επιθετικών οστεοκλαστών, που προκαλούν τις χαρακτηριστικές οστικές διαβρώσεις (Schett, 2007; Schett, 2009), θα εξετάσουμε: α) το αν η IL-27 επηρεάζει θετικά ή αρνητικά τη δημιουργία οστεοκλαστών και β) τους μηχανισμούς με του οποίους παρεμβαίνει στην οστεοκλαστογένεση.
3. Την επίδραση που έχει το φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον στις λειτουργίες της IL-27. Ειδικότερα θα εξετάσουμε: α) πως απαντούν στην IL-27 μονοκύτταρα και μακροφάγα, προερχόμενα από το φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον των αρθρώσεων ασθενών με PA και β) πως επηρεάζουν τα διάφορα φλεγμονώδη ερεθίσματα (όπως το φλεγμονώδες αρθρικό

υγρό, οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες TNF- α και IL-1 β και ο LPS) τη δράση της IL-27 στα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1. Κυτταροκαλλιέργειες

Οι διαδικασίες που σχετίζονταν με τη διενέργεια κυτταροκαλλιεργειών έγιναν σε άσηπτες συνθήκες σε εστία νηματικής ροής (hood). Τα κύτταρα καταμετρήθηκαν με τη χρήση αιμοκυτομέτρου Neubauer και επωάστηκαν σε κλίβανο σε περιβάλλον 37°C και 5% CO₂.

3.2. Απομόνωση ανθρώπινων μονοκυττάρων/μακροφάγων

Ολικό αίμα, που προήλθε από υγιείς εθελοντές δότες, αραιώθηκε 1:3 σε HBSS (Hank's Buffered Salt Solution) επιστιβάχθηκε προσεκτικά σε 1/3 του όγκου του διαχωριστικού μέσου Ficoll-Hypaque (πυκνότητα 1,077 g/ml) και φυγοκεντρήθηκε στις 2000 στροφές/min για 20min σε θερμοκρασία 20°C. Επειδή τα μονοπύρρηνα κύτταρα έχουν μικρότερη πυκνότητα από τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα πολυμορφοπύρρηνα, συγκεντρώνονται στη μεσοστιβάδα πάνω από το στρώμα της φικόλης. Αντίθετα τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα πολυμορφοπύρρηνα κατά τη φυγοκέντρηση διέρχονται μέσα από το στρώμα της φικόλης και καθιζάνουν. Συλλέξαμε με προσοχή τα μονοπύρρηνα και, για να απομακρύνουμε τα υπολείμματα πρόσμιξης φικόλης, τα υποβάλαμε σε δύο πλύσεις με HBSS φυγοκεντρώντας στις 1300 στροφές/min για 10min σε θερμοκρασία 4°C.

Από τα μονοπύρρηνα κύτταρα, που είναι κυρίως λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα, απομονώσαμε με θετική επιλογή τα κύτταρα που φέρουν το δείκτη επιφανείας CD14. Τα κύτταρα αυτά αντιστοιχούν σε πληθυσμό μονοκυττάρων. Η επιλογή των CD14+ κυττάρων έγινε με ανοσομαγνητικό διαχωρισμό χρησιμοποιώντας μαγνητικά μικροσφαιρίδια συζευγμένα με μονοκλωνικό αντίσωμα αντι- CD14 (Miltenyi Biotec). Περιληπτικά, τα μονοπύρρηνα κύτταρα επωάστηκαν για 15min με τα μικροσφαιρίδια στους 4°C και ακολούθως διήλθαν από ειδική στήλη που προσαρμόστηκε σε ισχυρό μαγνητικό πεδίο. Σε όλες τις περιπτώσεις ελέγχθηκε, με κυτταρομετρία ροής, η καθαρότητα του πληθυσμού των κυττάρων μετά το διαχωρισμό και το

ποσοστό των CD14+ βρέθηκε να είναι άνω του 97%. Αντίστοιχη διαδικασία ακολουθήθηκε και για την απομόνωση των CD14+ κυττάρων από το αρθρικό υγρό ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα.

3.3. Απομόνωση μονοκυττάρων ποντικίου

Από το περιφερικό αίμα και το μυελό των οστών C57BL/6J ποντικών, απομονώθηκαν τα μονοπύρρηνα κύτταρα με φυγοκέντρηση σε κλίση συγκέντρωσης Ficoll-Hydraque (λεπτομέρειες αναφέρονται προηγουμένως). Ακολούθως, απομονώθηκαν με θετική επιλογή χρησιμοποιώντας μαγνητικά μικροσφαιρίδια συζευγμένα με μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-CD11b (Miltenyi Biotec), τα CD11b+ κύτταρα. Ο δείκτης επιφανείας CD11b εκφράζεται κυρίως στα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα, αλλά επειδή στο σύστημά μας προηγήθηκε απομάκρυνση των πολυμορφοπύρηνων κυττάρων με φυγοκέντρηση σε κλίση συγκέντρωσης Ficoll-Hydraque, τελικά με την θετική επιλογή των CD11b+ κυττάρων απομονώσαμε μόνο τα μονοκύτταρα.

3.4. *Ex vivo* δημιουργία μακροφάγων ποντικίου από κύτταρα μυελού των οστών

Ποντίκια C57BL/6J (Jackson Laboratories) θυσιάστηκαν με ευθανασία και υπό άσηπτες συνθήκες αφαιρέθηκαν χειρουργικά τα μηριαία οστά και οι κνήμες. Τέμνοντας τα δύο άκρα των οστών, απομονώσαμε τον μυελό από τα οστά των ποντικών διοχετεύοντας στον οστικό αυλό HBSS υπό πίεση. Τα κύτταρα του μυελού των οστών του ποντικίου καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες εντός ειδικών τριβλίων (Petri dish) σε καλλιεργητικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) εμπλουτισμένο με 20% ορό εμβρύου βοός (fetal bovine serum, FBS), 1% L-γλουταμίνη, 1% πενικιλίνη, 1% στρεπτομυκίνη και αμφοτερικίνη. Ακολούθως τα κύτταρα που επέπλεαν στο καλλιεργητικό μέσο, και δεν προσκολλήθηκαν στο έδαφος του τριβλίου, μεταφέρθηκαν σε νέο

τριβλίο (culture dish). Με αυτό τον τρόπο απομακρύνθηκαν από την καλλιέργειά μας τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών (τα οποία παρέμειναν προσκολλημένα στον πυθμένα του Petri dish). Τα κύτταρα παρέμειναν στο culture dish παρουσία 10ng/ml mM-CSF (PeproTech) και εντός 5 ημερών διαφοροποιήθηκαν σε μακροφάγα (Bone Marrow Derived Macrophages, BMDM).

3.5. Δημιουργία Οστεοκλαστών

Για τη δημιουργία ανθρώπινων οστεοκλαστών χρησιμοποιήθηκαν φρέσκα μονοκύτταρα (CD14+ κύτταρα) που απομονώθηκαν, όπως έχει ήδη περιγραφεί, από το περιφερικό αίμα υγιών ατόμων. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν συνολικά επί 7 ημέρες κάτω από διάφορες συνθήκες. Συγκεκριμένα, κατά τις πρώτες δύο ημέρες εκτέθηκαν σε 20ng/ml hMCSF (PeproTech) ώστε να επιτευχθεί επαγωγή της έκφρασης του υποδοχέα RANK και να καταστούν ικανά να αποκρίθουν στην οστεοκλαστογόνο δράση του RANKL (προ-οστεοκλάστες). Οι προ-οστεοκλάστες για τις επόμενες 5 ημέρες εκτέθηκαν σε 20ng/ml hMCSF και 40ng/ml sRANKL (PeproTech). Οι κυτταροκίνες hMCSF και sRANKL επαναπροστέθηκαν στο σύστημα για δεύτερη φορά στις ίδιες δόσεις μετά από 3 ημέρες. Την ίδια στιγμή έγινε και ανανέωση κατά το ήμισυ του θρεπτικού καλλιεργητικού υλικού. Στη συνολική διάρκεια των 7 ημερών της καλλιέργειας, η IL-27 προστέθηκε σε διάφορες δόσεις (10-100ng/ml) είτε από την αρχή κατά την πρώτη μέρα, είτε αργότερα κατά την 3^η ημέρα (μαζί με την πρώτη χορήγηση των hMCSF και sRANKL), είτε πολύ αργότερα κατά την 5^η ημέρα (μαζί με την δεύτερη χορήγηση των hMCSF και sRANKL). Όλες οι καλλιέργειες για την δημιουργία οστεοκλαστών έγιναν σε πλήρες θρεπτικό υλικό α -MEM (Minimum Essential Medium), εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοός (fetal bovine serum, FBS), 1% L-γλουταμίνη, 1% πενικιλίνη και 1% στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε τριβλία 96-well σε συγκέντρωση

$0,05 \times 10^6$ κύτταρα ανά 200ml καλλιεργητικού υλικού. Την 7^η ημέρα της καλλιέργειας τα κύτταρα καθελώθηκαν (fixed) και βάφτηκαν με ειδική χρώση για την ανίχνευση του TRAP, χρησιμοποιώντας το Acid Phosphatase Leukocyte diagnostic kit (Sigma, San Diego, CA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ακολουθώντας την καθιερωμένη στη βιβλιογραφία πρακτική, θεωρήσαμε οστεοκλάστες όλα τα πολυπύρρηνα (>3 πυρήνες) TRAP+ κύτταρα. Για την δημιουργία οστεοκλαστών ποντικίου χρησιμοποιήθηκαν ως προ-οστεοκλάστες είτε BMDM είτε μονοκύτταρα (CD11b+). Ακολουθήθηκε αντίστοιχο πρωτόκολλο με αυτό που περιγράφηκε για τους ανθρώπινους οστεοκλάστες, με κύρια διαφορά το ότι χρησιμοποιήθηκε sRANKL σε μεγαλύτερη δόση (80ng/ml).

3.6. Δοκιμασία σχηματισμού βοθρίων (pit formation assay)

Για να εκτιμήσουμε την ικανότητα των σχηματιζόμενων πολυπύρηνων TRAP+ κύτταρων να απορροφούν οστική ουσία, χρησιμοποιήσαμε τη δοκιμασία σχηματισμού βοθρίων. Συγκεκριμένα, οι προ-οστεοκλάστες τοποθετήθηκαν σε τριβλία 96-well επί λεπτών τεμαχίων οδοντίνης προερχόμενης από ελεφαντόδοντο και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο οστεοκλαστογένεσης που μόλις περιγράφηκε. Στο τέλος της καλλιέργειας τα κύτταρα απομακρύνθηκαν με διαδοχικές εκπλύσεις από την επιφάνεια της οδοντίνης. Ακολούθως, τα τεμάχια της οδοντίνης εμβαπτίστηκαν σε 1% toluidine blue O (Sigma-Aldrich) ώστε να χρωματιστούν οι περιοχές που οι οστεοκλάστες έχουν απορροφήσει οδοντίνη (βοθρία απορρόφησης).

3.7. Φωτομετρική εκτίμηση της βιωσιμότητας των προ-οστεοκλαστών (MTT assay)

Για να εκτιμηθεί η επίδραση της IL-27 στην βιωσιμότητα των προ-οστεοκλαστών εφαρμόσαμε την δοκιμασία MTT χρησιμοποιώντας το MTT assay kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η δοκιμασία βασίζεται στην αναγωγή, από ένζυμα που υπάρχουν στα ζωντανά κύτταρα, της τετραζόλης MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) σε formazan. Επειδή το MTT είναι κίτρινου χρώματος ενώ το formazan είναι πορφυρό, η μέτρηση με φασματοφωτόμετρο της έντασης της χρωματικής αλλαγής, είναι ένα μέτρο εκτίμησης της βιωσιμότητας των κυττάρων.

3.8. Ανοσοκαθήλωση Πρωτεϊνών (Western Blotting)

Ολικό κυτταρικό εκχύλισμα παρασκευάστηκε με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος που περιείχε 20 mM Hepes (pH 7.0), 300 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 0.1% Triton X-100, 0.5 mM DTT, 20% glycerol και 1 × proteinase inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland). Πυρηνικό εκχύλισμα παρασκευάστηκε επωάζοντας τα κύτταρα για 15 min (4°C) σε ρυθμιστικό διάλυμα, που περιείχε 10 mM Hepes (pH 7.9), 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 × proteinase inhibitor cocktail και 1 mM DTT. Ακολούθως προστέθηκε NP-40 σε τελική συγκέντρωση 0.2% και έγινε φυγοκέντρηση στα 10.000g για 30 sec. Τελικώς έγινε λύση του καθιζήματος με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος SDS-PAGE.

Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατατικές συνθήκες (SDS-PAGE) 9-12% και οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν με ηλεκτρομεταφορά και καθηλώθηκαν σε μεμβράνη PVDF (polyvinylidene difluoride), που είχε προηγουμένως διαβραχεί με μεθανόλη για 30 sec. Για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης (blocking) η μεμβράνη επωάστηκε με 5%

αποβουτυρωμένο γάλα σε μορφή σκόνης για 1 ώρα και ακολούθησε υβριδοποίηση με το ανάλογο αντίσωμα. Από την Cell Signaling Technology προήλθαν τα αντισώματα κατά των ERK, p-ERK, p-p38, p-IκBα, IκBα, c-Jun, pY-STAT1 and pY-STAT3. Από την Santa Cruz Biotechnology παραγγέλθηκαν τα αντισώματα κατά των TRAF6, TBP και p38 και από την BD Transduction Laboratories τα αντισώματα κατά των πρωτεϊνών NFATc1, STAT1 και STAT3. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με κατάλληλο δεύτερο αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση. Η ανίχνευση του σήματος έγινε με τη χρήση του αντιδραστηρίου ECL (H₂O₂ και luminol) και έκθεση σε φιλμ αυτοραδιογραφίας (Kodak).

3.9. Ανίχνευση της έκφρασης γονιδίων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την διενέργεια ποσοτικής και ημιποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (qPCR και sqPCR αντίστοιχα) χρησιμοποιήθηκε ολικό RNA, η απομόνωση του οποίου έγινε με τη χρήση του RNeasy mini kit (Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η σύνθεση cDNA έγινε με αντίστροφη μεταγραφή του ολικού RNA χρησιμοποιώντας ένα First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas). Η qPCR διενεργήθηκε χρησιμοποιώντας iQ SYBR Green Supermix και iCycler iQ thermal cycler (Bio-Rad) ακολουθώντας τις σχετικές οδηγίες του κατασκευαστή.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR ήταν οι εξής:

- hGAPDH forward 5'-ATCAAGAAGGTGGTGAAGCA-3'
hGAPDH reverse 5'-GTCGCTGTTGAAGTCAGAGGA-3'
- hSOCS1 forward 5'-TGTTGTAGCAGCTTAAGTGTATC-3'
hSOCS1 reverse 5'-AGAGGTAGGAGGTGCGAGT-3'
- hSOCS3 forward 5'-CACTCTTCAGCATCTCTGTCCGAAG-3'
hSOCS3 reverse 5'-CATAGGAGTCCAGGTGGCCGTTGAC-3'

- hCXCL9 forward 5'-ATCAGCACCAACCAAGGGACT-3'
hCXCL9 reverse 5'-GCTTTTTCTTTTGGCTGACCTG-3'
- hCXCL10 forward 5'-ATTTGCTGCCTTATCTTTCTG-3'
hCXCL10 reverse 5'-TCTCACCTTCTTTTTCATTGTAG-3'
- hSTAT-1 forward 5'-TGGGTTTGACAAGGTTCTT-3'
hSTAT-1 reverse 5'-TATGCAGTGCCACGGAAAG-3'
- hIRF-1 forward 5'-GCACTAAGCGAAAATTGCA-3'
hIRF-1 reverse 5'-GGGAGTTTCCTTCACATTCA-3'
- hCR1 forward 5'-GGATCCCTGCTGGCGGTTGTG-3'
hCR1 reverse 5'-CCAGGGCGGCATTCATAGTTCAGA-3'
- hDEPP forward 5'-GGCCGCCCTGCTGTGTCC-3'
hDEPP reverse 5'-CCTCTGGCTTGGCTGCTTTTCCTG-3'
- hCD163 forward 5'-CCAGTCCCAAACACTGTCCT-3'
hCD163 reverse 5'-CACTCTCTATGCAGGCCACA-3'
- hPGDH forward 5'-GCTGGAGTGAATAATGAGAAAAAC-3'
hPGDH reverse 5'-CAATAAACCGGCTGCTGTG-3'
- hTNF- α forward 5'-AATAGGCTGTTCCCATGTAGC-3'
hTNF- α reverse 5'-AGAGGCTCAGCAATGAGTGA-3'
- hIL-6 forward 5'-TAATGGGCATTCCTTCTTCT-3'
hIL-6 reverse 5'-TGTCTAACGCTCATACTTTT-3'
- hIL-10 forward 5'-TTATCTTGTCTCTGGGCTTGG-3'
hIL-10 reverse 5'-GTTGGGGAATGAGGTTAGGG-3'
- hNFATc1 forward 5'-TGCAAGCCGAATTCTCTTGGTGGTT-3'

- hNFATc1 reverse 5'-ACGTTGGCGGGAAGGTAGGTGAAA-3'
- hRANK forward 5'-CCATCATCTTTGGCGTTTG-3'
 - hRANK reverse 5'-AGCTGTGAGTGCTTTCCCT-3'
 - hTREM-2 forward 5'-AGCCTCTTGGAAGGAGAAAT-3'
 - hTREM-2 reverse 5'-AGGAGGAGAAGGATGGAAGT-3'
 - hOSCAR forward 5'-GCTGTGCCCTGTGCTGT-3'
 - hOSCAR reverse 5'-CCACTAATCGCGTCTTCC-3'
 - hSIRP β 1 forward 5'-AGGCCACTTCCCACGGGTAACAAC-3'
 - hSIRP β 1 reverse 5'-AGTAGTAGGTGCCGGCGTCTGCT-3'
 - hILT7 forward 5'-GTGGCTGGCTTGGTCCTGCTGTTC-3'
 - hILT7 reverse 5'-CTGTTCCCAAGGCTCCACCACTCT-3'
 - hDAP12 forward 5'-CCTCTCCTGCTGGCTGTAAG-3'
 - hDAP12 reverse 5'-GCAACTGCAATCGCTCTGG-3'
 - hFcR γ forward 5'-ATGCCATCCTGTTTCTGTAT-3'
 - hFcR γ reverse 5'-AAGTCTCCTGGTTCCTGGTGCTCA-3'
 - hCathepsin K forward 5'-CTCTTCCATTTCTTCCACGAT-3'
 - hCathepsin K reverse 5'-ACACCAACTCCCTTCCAAAG-3'
 - hIntegrin β 3 forward 5'-GGAAGAACGCGCCAGAGCAAAATG-3'
 - hIntegrin β 3 reverse 5'-CCCCAAATCCCTCCCCACAAATAC-3'
 - mGAPDH forward 5'-ATCAAGAAGGTGGTGAAGCA-3'
 - mGAPDH reverse 5'-AGACAACCTGGTCCTCAGTGT-3'
 - mSOCS1 forward 5'-CATCCCTCTTAACCCGGTAC-3'
 - mSOCS1 reverse 5'-TGGAAGGGGAAGGAACTCAG-3'

- mSOCS3 forward 5'-ATTTGCCTCAATCACTTTTAT-3'
mSOCS3 reverse 5'-ACTGGGATTTGGTTGAGTTT-3'
- mIRF-1 forward 5'-CCCACAGAAGAGCATAGCAC-3'
mIRF-1 reverse 5'-AGCAGTTCTTTGGGAATAGG-3'
- mIP-10 forward 5'-ATTCTTTAAGGGCTGGTCTGA-3'
mIP-10 reverse 5'-CACCTCCACATAGCTTACAGT-3'

sqPCR (34 cycles: 95°C 30sec/60°C 30sec/72°C 1 min) χρησιμοποιήθηκε για να ποσοτικοποιηθούν τα επίπεδα του mRNA του WSX-1 σε εκχυλίσματα από CD14(+) και CD14(-) κύτταρα ανθρώπων και προοστεοκλαστών και σπληνοκυττάρων ποντικών. Τα ζεύγη εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- hWSX-1 forward 5'-GGAATTACCTGCTGCTGCTC-3'
hWSX-1 reverse 5'-GAGGCTGAATCCAAGCAGAC-3'
- mWSX-1 forward 5'-CAAGAAGAGGTCCCGTGCTG-3'
mWSX-1 reverse 5'-TTGAGCCCAGTCCACCACAT-3'

4. Αποτελέσματα

4.1. Προ-φλεγμονώδεις λειτουργίες της IL-27

Είναι ήδη γνωστό στη βιβλιογραφία ότι η IL-27 ενεργοποιεί το μονοπάτι ενδοκυττάριας σηματοδότησης Jak-STAT (Pflanz et al., 2004). Συγκεκριμένα έχειδειχθεί ότι, μετά τη σύνδεσή της με τον υποδοχέα της στην επιφάνεια των κυττάρων-στόχων, ενεργοποιούνται οι μεταγραφικοί παράγοντες STAT-1 και STAT-3 (Batten and Ghilardi, 2007; Lang, 2005). Όμως στα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα οι εν λόγω μεταγραφικοί παράγοντες έχουν ανταγωνιστικές δράσεις (Ivashkin and Hu, 2003; Ivashkin and Hu, 2004). Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση του STAT-1 έχει προ-φλεγμονώδεις και προ-αποπτωτικές συνέπειες και αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Ivashkin and Hu, 2004). Αντίθετα, η ενεργοποίηση του STAT-3 στα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα οδηγεί σε αντι-φλεγμονώδη και αντι-αποπτωτικά φαινόμενα και επάγει τον πολλαπλασιασμό αυτών των κυττάρων (Lang, 2005). Σε αυτό το πλαίσιο αναρωτηθήκαμε τίνος εκ των δυο ανταγωνιστικών μεταγραφικών παραγόντων η δράση υπερισχύει όταν η IL-27 συνδέεται με τον υποδοχέα της στη μεμβράνη των μονοκυττάρων και μακροφάγων.

Για να απαντήσουμε το ανωτέρω ερώτημα, συγκρίναμε απευθείας την δράση της IL-27 στα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα με τη δράση άλλων κυτταροκινών, που επίσης ενεργοποιούν το μονοπάτι ενδοκυττάριας σηματοδότησης Jak-STAT. Σε αυτή τη σύγκριση χρησιμοποιήσαμε την IFN- γ και την IL-10, που θεωρούνται τα πρότυπα της ενεργοποίησης του STAT-1 και STAT-3 αντίστοιχα (Moore et al., 2001; Schroder et al., 2004). Όπως ήταν αναμενόμενο, η IFN- γ προκάλεσε ισχυρή ενεργοποίηση του STAT-1 στα ανθρώπινα μονοκύτταρα και μακροφάγα του περιφερικού αίματος υγιών δοτών (**EIKONA 1A**). Στα ίδια κύτταρα η IL-27 οδήγησε σε ενεργοποίηση του STAT-1, αλλά συγκριτικά με την IFN- γ , η ένταση της ενεργοποίησης ήταν σαφώς μικρότερη (**EIKONA 1A**). Ακολούθως ελέγξαμε την ένταση της ενεργοποίησης του STAT-

3 και διαπιστώσαμε ότι η IL-27 ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα STAT-3 σε μικρότερο βαθμό από ότι η IL-10 στα ίδια κύτταρα (**ΕΙΚΟΝΑ 1B**). Το αρχικό συμπέρασμα από αυτές τις συγκρίσεις είναι ότι στα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα η IL-27 οδηγεί σε μέτριας έντασης ισόρροπη ενεργοποίηση τόσο του STAT-1 όσο και του ανταγωνιστικού STAT-3.

ΕΙΚΟΝΑ 1: Ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων STAT-1 και STAT-3 από τις κυτταροκίνες IL-27, IFN- γ και IL-10. Φρέσκα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος από υγιείς δότες διεγέρθηκαν με IL-27 (100ng/ml) ή IFN- γ (100U/ml) ή IL-10 (100ng/ml) για 15min. Η ενεργοποίηση των STAT-1 και STAT-3 προσδιορίστηκε με ανοσοκαθήλωση πρωτεϊνών.

Για να αποκτήσουμε μια πιο σαφή εικόνα για το αν στα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα, που διεγείρονται από την IL-27, υπερισχύει η δράση του STAT-1 ή του STAT-3, εξετάσαμε τη σχετική έκφραση των γονιδίων-στόχων των εν λόγω μεταγραφικών παραγόντων. Στη μελέτη μας συμπεριλάβαμε τα γονίδια *SOCS1*, *IRF1*, *CXCL9*, *CXCL10* και *STAT-1*, που θεωρούνται κλασσικοί στόχοι του μεταγραφικού παράγοντα STAT-1 (Ho and Ivashkin, 2006), και το γονίδιο *SOCS3*, που είναι το κλασσικό γονίδιο-στόχος του STAT-3 (El Kasmi et al., 2006; Murray, 2007). Η διέγερση των ανθρώπινων μονοκυττάρων και μακροφάγων του περιφερικού αίματος με IL-27 οδήγησε σε ταχεία και ισχυρή επαγωγή όλων των προαναφερθέντων γονιδίων-στόχων του μεταγραφικού παράγοντα STAT-1 (**ΕΙΚΟΝΑ 2A και B**). Μάλιστα ο βαθμός επαγωγής αυτής της ομάδας γονιδίων από την IL-27 ήταν ανάλογης έκτασης με την επαγωγή αυτών των γονιδίων από

την IFN- γ (**EIKONA 2A**). Αυτό είναι αξιοσημείωτο καθώς όπως ήδη έχει αναφερθεί η ένταση της ενεργοποίησης του STAT-1 από την IL-27 ήταν σαφώς ασθενέστερη από αυτήν που προκαλεί η IFN- γ (**EIKONA 1A**). Χρησιμοποιώντας στο σύστημά μας έναν αναστολέα της πρωτεϊνσύνθεσης (Cycloheximide) διαπιστώσαμε ότι η επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων-στόχων του STAT-1 στα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα από την IL-27 είναι το άμεσο αποτέλεσμα της δράσης της IL-27 σε αυτά τα κύτταρα και δεν οφείλεται στην παραγωγή κάποιου άλλου διαμεσολαβητή (**EIKONA 2B**). Με έκπληξη διαπιστώσαμε ότι αν και η IL-27 ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα STAT-3 στα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα (**EIKONA 1B**), δεν επάγει την έκφραση του SOCS3, που είναι γονιδίο-στόχος του STAT-3 (**EIKONA 2Γ**).

EIKONA 2: Επαγωγή γονιδίων-στόχων των μεταγραφικών παραγόντων STAT-1 και STAT-3 μετά από διέγερση ανθρώπινων μονοκυττάρων περιφερικού αίματος για 3 ώρες με τις κυτταροκίνες IL-27, IFN- γ και IL-10. Η μέτρηση των επιπέδων του mRNA των γονιδίων έγινε με qPCR.

Τα συμπεράσματα που εξάγονται από τις ανωτέρω παρατηρήσεις είναι ότι στα ανθρώπινα μονοκύτταρα και μακροφάγα η IL-27, αν και στο βιοχημικό επίπεδο της ενδοκυττάριας σηματοδότησης, προκαλεί μέτριας έντασης ισόρροπη ενεργοποίηση τόσο του STAT-1 όσο και

του STAT-3, στο επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης υπερισχύει η δράση του STAT-1 και εν τέλει η IL-27 λειτουργεί κατά τρόπο παρόμοιο με την IFN- γ .

4.1.1. Η IL-27 προκαλεί παρατεταμένη ενεργοποίηση του STAT-1

Ο επόμενος στόχος ήταν να διερευνήσουμε που οφείλεται το ότι, αν και σε βιοχημικό επίπεδο η IL-27 ενεργοποιεί στα ανθρώπινα μονοκύτταρα και μακροφάγα τόσο το STAT-1 όσο και το STAT-3, στο επίπεδο της βιολογικής λειτουργίας ευοδώνεται μόνο η δράση του STAT-1. Για το σκοπό αυτό μελετήσαμε την κινητική της ενεργοποίησης του STAT-1 και STAT-3 και επιπλέον συγκρίναμε την δράση της IL-27 με αυτή της IL-6 στο σύστημά μας. Η επιλογή της IL-6 ως μέτρο σύγκρισης έγινε επειδή είναι συγγενής κυτταροκίνη (ανήκουν στην ίδια οικογένεια) (Batten and Ghilardi, 2007) και χρησιμοποιεί, όπως και η IL-27, την υπομονάδα gp130 ως μέρος του υποδοχέα της στην επιφάνεια των κυττάρων-στόχων (Boulanger and Garcia, 2004; Bravo and Heath, 2000; Chow et al., 2002; Fukada et al., 1999; Heinrich et al., 1998; Kamimura et al., 2003; Murakami et al., 2004; Scheller and Rose-John, 2006; Schmitz et al., 2000).

EΙΚΟΝΑ 3: Η παρατεταμένη ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα STAT-1 από την IL-27 συσχετίζεται με την επαγωγή των αντίστοιχων γονιδίων-στόχων του STAT-1 στα ανθρώπινα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος.

Διεγείροντας ανθρώπινα μονοκύτταρα και μακροφάγα περιφερικού αίματος με IL-6 ή IL-27 διαπιστώσαμε ότι και στις δυο περιπτώσεις ενεργοποιείται εντός ολίγων λεπτών ο μεταγραφικός παράγοντας STAT-1 (**EΙΚΟΝΑ 3A**). Ενώ όμως στην περίπτωση της IL-6 αυτή η ενεργοποίηση

είναι παροδική (φθίνει εντός 30 λεπτών και εξαφανίζεται μετά το πέρας 60 λεπτών της ώρας), στην περίπτωση της διέγερσης με IL-27 η ενεργοποίηση του STAT-1 είναι παρατεταμένη (είναι ανιχνεύσιμη για τουλάχιστον 120 λεπτά της ώρας) (**EIKONA 3A**). Στο επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης, η παροδική ενεργοποίηση του STAT-1 από την IL-6 δεν είναι ικανή να προκαλέσει την επαγωγή των γονιδίων-στόχων του STAT-1 (**EIKONA 3B**). Αντίθετα, η παρατεταμένη ενεργοποίηση του STAT-1 από την IL-27, συνοδεύεται από σημαντικού βαθμού επαγωγή των γονιδίων-στόχων του STAT-1 (*SOCS1*, *IRF1* και *CXCL10*) (**EIKONA 3B**). Σε αντίθεση με την μακράς διάρκειας ενεργοποίηση του STAT-1, η IL-27 προκαλεί βραχείας διάρκειας ενεργοποίηση του STAT-3 (**EIKONA 3A**). Το συμπέρασμα που εξάγεται από αυτή τη σειρά πειραμάτων είναι ότι η διαφορετική κινητική της ενεργοποίησης του STAT-1 και STAT-3 (μακράς διάρκειας ενεργοποίηση του STAT-1 και βραχείας διάρκειας ενεργοποίηση του STAT-3) είναι μια πιθανή εξήγηση για την κυριαρχία της δράσης του STAT-1 στην περίπτωση της IL-27.

4.1.2. Η IL-27 ενισχύει την απόκριση των ανθρώπινων μονοκυττάρων στους TLR-ligands με μηχανισμό που εξαρτάται από το STAT-1

Στην προσπάθειά μας να διερευνήσουμε περαιτέρω τις βιολογικές συνέπειες της δράσης της IL-27 στα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα, εξετάσαμε την επίδραση που έχει η IL-27 σε βασικές λειτουργίες αυτών των κυττάρων. Κύρια αποστολή της φυσικής ανοσίας (innate immunity) είναι η άμεση αναγνώριση παθογόνων και η ταχεία αντιμετώπισή τους (Akira et al., 2006; Janeway and Medzhitov, 1998; Medzhitov and Janeway, 1998a; Medzhitov and Janeway, 1998b). Για αυτό το σκοπό τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα (που συνιστούν μαζί με τα δενδριτικά κύτταρα και τα ουδετερόφιλα την πρώτη γραμμή άμυνας της φυσικής ανοσίας) είναι εξοπλισμένα με ένα δίκτυο υποδοχέων, που λειτουργούν ως αισθητήρες αναγνώρισης βασικών δομών των διαφόρων οικογενειών παθογόνων (pattern recognition receptors) (Medzhitov and Janeway, 1997). Η πιο καλά μελετημένη ομάδα τέτοιων υποδοχέων είναι η οικογένεια των Toll-like receptors (TLR) (Medzhitov and Janeway, 2002). Αυτοί οι υποδοχείς βρίσκονται είτε στην μεμβράνη των κυττάρων (TLRs 1, 2, 4, 5, 6), είτε σε ενδοκυττάρειες δομές (TLRs 3, 7, 8, 9) και ελέγχουν τον εξωκυττάριο και ενδοκυττάριο χώρο αντίστοιχα για την πιθανή παρουσία παθογόνων (Barton and Medzhitov, 2003). Ειδικότερα αναγνωρίζουν χαρακτηριστικές μοριακές δομές μικροβιακών παραγόντων (TLR-ligands) όπως είναι τα λιπίδια (που αναγνωρίζονται από τους TLR1, TLR2 και TLR6), οι λιποπολυσακχαρίτες (που αναγνωρίζονται από τον TLR4) και τα νουκλεϊκά οξέα (που αναγνωρίζονται από τους TLR3, TLR7, TLR8 και TLR9) (Kumar et al., 2009).

Η κλασσική απόκριση των μονοκυττάρων και μακροφάγων στην αναγνώριση παθογόνων μέσω των TLR, συνίσταται στην ταχεία (εντός ολίγων ωρών) παραγωγή πληθώρας προφλεγμονοδών κυτταροκινών (κυρίως TNF- α , IL-1 β και IL-6). Είναι καλά τεκμηριωμένο στην

υπάρχουσα βιβλιογραφία ότι η IFN- γ , ένας ισχυρότατος ενεργοποιητής του μεταγραφικού παράγοντα STAT-1, αυξάνει σημαντικά την ισχύ της απόκρισης των μονοκυττάρων και μακροφάγων στους TLR-ligands (Schroder et al., 2004). Αυτή η ενισχυτική δράση της IFN- γ είναι γνωστή ως priming.

ΕΙΚΟΝΑ 4: Η IL-27 ενισχύει την απόκριση των ανθρώπινων μονοκυττάρων στους TLR-ligands

Δεδομένου του ευρήματός μας ότι η IL-27, μέσω του STAT-1, ενεργοποιεί ένα πρόγραμμα γονιδιακής έκφρασης παρόμοιο με αυτό της IFN- γ , διερευνήσαμε την επίδραση της IL-27 στην απόκριση των μονοκυττάρων στους TLR-ligands. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε δύο διαφορετικούς TLR-ligands, τον LPS, που είναι ο κατεξοχήν TLR4-ligand, και το Pam₃CysSer(Lys)₄ (Pam), που είναι ένας κλασσικός TLR2-ligand (Akira et al., 2006). Όπως ήταν αναμενόμενο, τα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος από υγιείς δότες, όταν διεγέρθηκαν με Pam ή LPS, παρήγαγαν εντός ολίγων ωρών τις προ-φλεγμονώδεις κυταροκίνες TNF- α , IL-6 και IL-1 β (ΕΙΚΟΝΑ 4Α και Γ). Όταν όμως αυτά τα κύτταρα είχαν προηγουμένως εκτεθεί στην IL-27, η

απόκρισή τους στο Pam και το LPS ήταν σημαντικά εντονότερη (**EIKONA 4A** και **Γ**). Μάλιστα η σημαντικά αυξημένη παραγωγή TNF- α και IL-6 συνοδεύονταν από αντίστοιχη αύξηση του mRNA αυτών των κυτταροκινών (**EIKONA 4B** και **Δ**), κάτι που πιθανότατα υποδηλώνει ότι το επίπεδο ρύθμισης από την IL-27 είναι αυτό της γονιδιακής έκφρασης.

EIKONA 5: Τα THP-1 κύτταρα ανταποκρίνονται στη δράση της IL-27 κατά τρόπο παρόμοιο με αυτόν των πρωτογενών ανθρώπινων μονοκυττάρων περιφερικού αίματος. **A:** THP-1 με φυσιολογικά επίπεδα STAT-1 (Control) διεγερθηκαν με IL-27 (200ng/ml) για 20min. **B:** Control THP-1 και STAT-1 Low THP-1 κύτταρα διεγερθηκαν με IL-27 (200ng/ml) για 3h.

Με σκοπό να διερευνήσουμε το ρόλο της ενεργοποίησης του STAT-1 στο priming των μονοκυττάρων από την IL-27, χρησιμοποιήσαμε THP-1 κύτταρα (κυτταρική σειρά ανθρώπινων μονοκυττάρων) στα οποία, με τη χρήση κατάλληλου siRNA, η ενδοκυττάρια έκφραση του STAT-1 έχει ελαχιστοποιηθεί (STAT-1 low) (Ho and Ivashkin, 2006). Τα THP-1 κύτταρα με φυσιολογική ενδοκυττάρια έκφραση του STAT-1 (Controls) ανταποκρίνονται στην IL-27 με τρόπο παρόμοιο με αυτόν των ανθρώπινων μονοκυττάρων από υγιείς δότες. Συγκεκριμένα, στο βιοχημικό επίπεδο ενδοκυττάριας σηματοδότησης ενεργοποιούνται οι μεταγραφικοί παράγοντες STAT-1 και STAT-3 (**EIKONA 5A**) και στο επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης επάγονται τα γνωστά γονίδια-στόχοι του STAT-1 (*SOCS1*, *IRF1*, *CXCL9*, *CXCL10* και *STAT-1*) (**EIKONA 5B**). Αντίθετα, στα STAT-1 low κύτταρα, η IL-27 (ακόμη και σε δόσεις διπλάσιες από αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στο σύστημα των μονοκυττάρων περιφερικού αίματος) απέτυχε να ευοδώσει την έκφραση γονιδίων-στόχων του STAT-1 (**EIKONA 5B**).

ΕΙΚΟΝΑ 6: Η ενίσχυση της απόκρισης των μονοκυττάρων στους TLR-ligands από την IL-27 διαμεσολαβείται από τον μεταγραφικό παράγοντα STAT-1.

Ακολούθως εξετάσαμε την απόκριση των THP-1 κυττάρων (Control και STAT-1 low) σε διαφορετικούς TLR-ligands κάτω από συνθήκες παρουσίας και απουσίας της IL-27. Στα THP-1 Controls, παρατηρήθηκε η αναμενόμενη απόκριση στους TLR-ligands (παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών) και η IL-27 σαφώς έκανε priming αυτών των κυττάρων (σημαντικά αυξημένη παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών σε απόκριση στους TLR-ligands) (**ΕΙΚΟΝΑ 6**). Τα STAT-1 low THP-1 κύτταρα, ενώ διατήρησαν στο ακέραιο την ικανότητά τους να απαντούν φυσιολογικά στους TLR-ligands παράγοντας προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (TNF- α και IL-6), απώλεσαν κατά πολύ την δυνατότητα να υφίστανται priming από την IL-27 (η IL-27 προκάλεσε μόνο ελάχιστη αύξηση στην παραγωγή TNF- α και IL-6 μετά από διέγερση αυτών των κυττάρων με TLR-ligands) (**ΕΙΚΟΝΑ 6**).

Το συμπέρασμα από τις ανωτέρω παρατηρήσεις είναι ότι η IL-27 λειτουργεί κατά τρόπο πολύ όμοιο με την IFN- γ , επιτυγχάνοντας τις κύριες βιολογικές δράσεις της στα ανθρώπινα μονοκύτταρα, όπως και η IFN- γ , μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα STAT-1.

4.1.2.1. Η IL-27 επηρεάζει τη λειτουργία και ελαττώνει την παραγωγή της IL-10

Τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα, όταν διεγερθούν με TLR-ligands, εκτός από την παραγωγή των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών, ενεργοποιούν και μια σειρά ρυθμιστικών μηχανισμών, που αποσκοπούν στην σχετική ανάσχεση της έντασης της προκαλούμενης φλεγμονής, ώστε να περιοριστεί η έκταση της ιστικής βλάβης (Hu et al., 2008a). Ένας τέτοιος ρυθμιστικός μηχανισμός είναι και η παραγωγή της κυτταροκίνης IL-10 (Hu et al., 2006). Η τελευταία είναι ένας ισχυρότατος ρυθμιστικός παράγοντας, που επιτυγχάνει την αντιφλεγμονώδη δράση της στα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα, κατά πρώτον μέσω της αναστολής της παραγωγής προφλεγμονωδών κυτταροκινών κατά τη διέγερση των κυττάρων αυτών με TLR-ligands και κατά δεύτερον με τη μείωση της αντιγονοπαρουσιαστικής τους ικανότητας μέσω της αναστολής της έκφρασης των μορίων MHC class II στην κυτταρική επιφάνεια (Moore et al., 2001). Αυτές οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις της IL-10 επιτυγχάνονται, τουλάχιστον εν μέρει, χάρη στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα STAT-3, που με τη σειρά του οδηγεί στην παραγωγή άλλων ρυθμιστικών μορίων όπως ο αναστολέας της ενδοκυττάριας σηματοδότησης κυτταροκινών SOCS3 (Lang, 2005; Moore et al., 2001). Οι IFNs (IFN- α και IFN- γ), έχειδειχθεί κατά το πρόσφατο παρελθόν, ότι μέσω της ενεργοποίησης του STAT-1, όχι μόνο αναχαιτίζουν την αντιφλεγμονώδη δράση της IL-10 στα μονοκύτταρα/μακροφάγα, αλλά απορρυθμίζουν (reprogramming) την απόκριση αυτών των κυττάρων στην IL-10 (Herrero et al., 2003; Sharif et al., 2004). Μέρος αυτής της απορρύθμισης είναι το ότι αυτά τα κύτταρα απαντούν πλέον στην IL-10 ενεργοποιώντας όχι μόνο το STAT-3 αλλά και το STAT-1. Το τελευταίο οδηγεί στο παράδοξο φαινόμενο, η IL-10 κάτω από τέτοιες συνθήκες απορρύθμισης, αντί να ενεργοποιεί αντιφλεγμονώδη μονοπάτια, να προκαλεί προφλεγμονώδεις δράσεις. Τέτοιες δράσεις έχουν αποδωθεί στην IL-10 στο πλαίσιο του Συστηματικού Ερυθηματώδη Λύκου (Beebe et al., 2002),

και έχουν ερμηνευτεί ως reprogramming της απόκρισης των μονοκυττάρων/μακροφάγων στην IL-10 λόγω της δράσης της IFN- α (Herrero et al., 2003; Sharif et al., 2004), που τελευταία έχει ενοχοποιηθεί στην παθογένεια της νόσου (Banchereau and Pascual, 2006; Pascual et al., 2006).

EIKONA 7: Η IL-27 απορρυθμίζει τη δράση της IL-10 στα ανθρώπινα μονοκύτταρα τόσο στο βιοχημικό επίπεδο της ενδοκυττάριας σηματοδότησης όσο και στο επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης.

Εντός αυτού του σκεπτικού, διερευνήσαμε κατά πόσον μέρος των λειτουργιών της IL-27 στα μονοκύτταρα/μακροφάγα, όπως η αύξηση της έντασης της φλεγμονώδους απόκρισης στους TLR-ligands (priming), μπορεί να αποδοθεί σε ενδεχόμενη επίδραση της IL-27 στην λειτουργία της IL-10. Στα ανθρώπινα μονοκύτταρα/μακροφάγα του περιφερικού αίματος, η IL-10 προκάλεσε την αναμενόμενη ισχυρή ενεργοποίηση του STAT-3 (**EIKONA 7A**), ισχνότερη ενεργοποίηση του STAT-1 (**EIKONA 7A**) και ισχυρή επαγωγή της έκφρασης των κλασικών γονιδίων στόχων της IL-10 (*SOCS3*, *PGDH*, *DEPP*, *CD163* και *CR1*) (**EIKONA 7B**). Όταν αυτά τα κύτταρα είχαν προηγουμένως εκτεθεί στην IL-27, η IL-10 διατήρησε την ικανότητά της να ενεργοποιεί το STAT-3 (**EIKONA 7A**), αλλά επιπλέον οδήγησε σε εντονότερη ενεργοποίηση του ανταγωνιστικού παράγοντα STAT-1 (**EIKONA 7A**). Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι η έκθεση των κυττάρων στην IL-27 οδήγησε σε σημαντική αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του ολικού STAT-1 (**EIKONA 7A**). Αυτό αποτελεί μια πιθανή εξήγηση για την ενεργοποίηση του STAT-1 από την IL-

10, καθώς έχει προταθεί ότι υπό συνθήκες αυξημένης ενδοκυττάριας διαθεσιμότητας, το STAT-1 είναι δυνατό να ανταγωνιστεί το STAT-3 στη σύνδεση με τον υποδοχέα της IL-10, κάτι που ακολούθως οδηγεί στην ενεργοποίηση του συνδεδεμένου STAT. Σε απόλυτη συμφωνία με το παρατηρούμενο reprogramming στο βιοχημικό επίπεδο της ενδοκυττάριας σηματοδότησης, η έκθεση των κυττάρων στην IL-27 οδήγησε και σε ανάλογο reprogramming στο επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης καθώς ανασχέθηκε η ικανότητα της IL-10 να επάγει την έκφραση των προαναφερθέντων γονιδίων-στόχων της IL-10 (**EIKONA 7B**).

EIKONA 8: Η IL-10 διατηρεί τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές της παρά την απορρυθμιστική δράση της IL-27.

Υπό το φως αυτών των ευρημάτων θελήσαμε να διερευνήσουμε τις ενδεχόμενες βιολογικές συνέπειες της IL-27 πάνω στις αντιφλεγμονώδεις λειτουργίες της IL-10. Συγκεκριμένα εξετάσαμε κατά πόσον η IL-27 μεταβάλλει την ικανότητα της IL-10 να περιορίζει τη φλεγμονώδη απόκριση των μονοκυττάρων στους TLR-ligands. Σε απόλυτη συμφωνία με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, διαπιστώσαμε ότι η IL-10 περιορίζει σημαντικά την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών (TNF-α και IL-6) από μονοκύτταρα που διεγείρονται με Pam₃CysSer(Lys)₄ (**EIKONA 8**). Όπως έχουμε περιγράψει και προηγουμένως, η έκθεση στην IL-27 οδήγησε σε priming, που συνίσταται σε σημαντική αύξηση της απόκρισης των κυττάρων στο Pam₃CysSer(Lys)₄ (**EIKONA 4** και **8**). Παραδόξως, σε αυτά τα κύτταρα που εκτέθηκαν στην IL-27, και παρά το προαναφερθέν reprogramming, η IL-10 διατήρησε την ισχυρή αντιφλεγμονώδη

δράση της καθώς περιόρισε σημαντικά την παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών μετά από τη διέγερση των κυττάρων με Pam₃CysSer(Lys)₄ (**EIKONA 8**).

Δεδομένου ότι η IL-27 δεν άλλαξε σημαντικά την αντιφλεγμονώδη λειτουργία της IL-10, διερευνήσαμε κατά πόσον επηρεάζει την ποσότητα της παραγόμενης IL-10 στο σύστημά μας. Τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος που διεγέρθηκαν με διάφορους TLR-ligands (LPS, Pam₃CysSer(Lys)₄ και Zymosan), παρήγαγαν όπως ήταν αναμενόμενο αρκετή ποσότητα IL-10 (**EIKONA 9A, 9Γ και 9E**).

EIKONA 9: Η IL-27 αναστέλλει την παραγωγή της IL-10 από τα ανθρώπινα μονοκύτταρα που διεγείρονται με TLR-ligands.

Όταν τα κύτταρα εκτέθηκαν στην IL-27, παρατηρήσαμε σημαντική αναστολή της παραγόμενης IL-10 (**EIKONA 9A, 9Γ και 9E**). Μάλιστα αυτή η αναστολή παρατηρήθηκε όχι μόνο στο επίπεδο της παραγόμενης πρωτεΐνης, αλλά και στο επίπεδο του mRNA της IL-10 (**EIKONA 9B και 9Δ**), κάτι που υποδηλώνει ότι η IL-27 αναστέλλει την παραγωγή της IL-10 στο επίπεδο της γονιδιακής

έκφρασης. Αυτή η παρατήρηση μας οδήγησε στην υπόθεση ότι ένας πιθανός μηχανισμός με τον οποίο η IL-27 αυξάνει τη φλεγμονώδη απόκριση των μονοκυττάρων στους TLR-ligands είναι η μείωση της ποσότητας της παραγόμενης IL-10. Παρόμοια αναστολή στην παραγωγή της IL-10 από τα μονοκύτταρα έχει περιγραφεί και για την IFN- γ (Hu et al., 2006), προσθέτοντας μια ακόμη ομοιότητα στον τρόπο δράσης της IL-27 και της IFN- γ .

4.2. Ο TNF-α οδηγεί στην παραγωγή IL-27 από τα μακροφάγα

Πρόσφατα δημοσιεύτηκε ότι η IL-27 είναι παρούσα στον αρθρικό υμένα ασθενών με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα (Niedbala et al., 2008). Είναι γνωστό στη βιβλιογραφία ότι η κύρια πηγή παραγωγής της IL-27 είναι τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (δενδριτικά κύτταρα, μονοκύτταρα και μακροφάγα) (Stumhofer and Hunter, 2008). Έχει περιγραφεί ότι το κύριο ερέθισμα για την παραγωγή της IL-27 από αυτά τα κύτταρα είναι η διέγερση των TLR κυρίως από LPS (Goriely et al., 2008; Liu et al., 2007; Molle et al., 2007; Wirtz et al., 2005; Yoshida et al., 2009). Οι TLR έχουν εμπλακεί στην παθογένεια της PA (Andreaskos et al., 2005; Brentano et al., 2009; Brentano et al., 2005; O'Neill, 2008) και έχει διατυπωθεί η θεωρία σύμφωνα με την οποία αυτοί οι υποδοχείς είναι δυνατό να διεγερθούν τόσο από μικροβιακής προέλευσης μόρια (εξωγενείς TLR-ligands) όσο και από προϊόντα αποδόμησης ενδογενών μορίων στα πλαίσια ιστικής βλάβης (ενδογενείς TLR-ligands) (Huang et al., 2007; Huang et al., 2009). Στο πλαίσιο μιας λοίμωξης η παρουσία των TLR-ligands είναι έντονη και η διέγερση των TLR είναι σχεδόν δεδομένη. Όμως η φλεγμονή της PA είναι κατεξοχήν στείρα φλεγμονή, στην οποία πρωταγωνιστούν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως TNF-α, IL-1β και IL-6 (McInnes and Schett, 2007). Σε αυτό το πλαίσιο σκέψης αναρωτηθήκαμε μήπως υπάρχει και κάποιο άλλο ερέθισμα, εκτός των TLR-ligands, που θα μπορούσε να συνεισφέρει στην παραγωγή της IL-27 στο φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον της άρθρωσης.

ένα ερέθισμα που πιθανά επάγει την παραγωγή της IL-27 στον αρθρικό υμένα ασθενών με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα.

EIKONA 11: Η IL-27 επάγει την έκφραση του STAT-1 στα ανθρώπινα μονοκύτταρα

4.3. Η IL-27 επάγει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα STAT-1

Με δεδομένα την παρουσία της IL-27 στον αρθρικό υμένα των ασθενών με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα (Niedbala et al., 2008) και την παραγωγή της από τα μακροφάγα ως απόκριση στον TNF- α (**EIKONA 10**), αναρωτηθήκαμε για τον ρόλο που ενδεχομένως διαδραματίζει η IL-27 στην παθογένεια της νόσου. Με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία ο ρόλος της παραμένει αινιγματικός (υπάρχει εκτενής ανάλυση σε σχετικό κεφάλαιο στην *Εισαγωγή*). Ένα βασικό χαρακτηριστικό του φλεγμαίνοντος αρθρικού υμένα είναι η αυξημένη έκφραση και ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα STAT-1 (Hu et al., 2002; Ivashkiv and Hu, 2003; van der Pouw Kraan et al., 2003). Ο κλασσικός ενεργοποιητής και επαγωγέας του STAT-1 είναι η IFN- γ (Schroder et al., 2004), η οποία όμως δεν ανιχνεύεται στον αρθρικό υμένα των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα (Firestein et al., 1990; Firestein and Zvaifler, 1987). Σε αυτό το πλαίσιο αναρωτηθήκαμε κατά πόσον η IL-27, που είναι παρούσα στον αρθρικό υμένα των ασθενών, θα μπορούσε να εξηγήσει την παρατηρούμενη επαγωγή του STAT-1. Διεγείροντας μονοκύτταρα περιφερικού αίματος από υγιείς δότες με IL-27, διαπιστώσαμε ότι εντός 24 ωρών αυξάνεται δραματικά ο μεταγραφικός παράγοντας STAT-1 στο επίπεδο της πρωτεΐνης (**EIKONA 7A** και **EIKONA 11**). Μάλιστα, διαπιστώσαμε ότι η παρατηρούμενη αύξηση είναι σε επίπεδα συγκρίσιμα με αυτά που επάγονται από την IFN- γ (**EIKONA 11**). Αυτό το εύρημα βρίσκεται σε συμφωνία με τις προηγούμενες παρατηρήσεις μας σύμφωνα με τις οποίες η IL-27 επάγει την έκφραση του

STAT-1 στο επίπεδο του mRNA (**ΕΙΚΟΝΑ 2B**) και έχει παρόμοιες λειτουργίες με την IFN- γ (**ΕΙΚΟΝΑ 2A**).

4.4. Αντιφλεγμονώδεις λειτουργίες της IL-27

Ακολουθώντας εξετάσαμε την επίδραση που ενδεχομένως έχει η IL-27 στα δύο κύρια χαρακτηριστικά της PA, που είναι η χρόνια φλεγμονή και οι οστικές διαβρώσεις. Στην ανάπτυξη και διαίωνιση της φλεγμονής των αρθρώσεων στην PA παίζουν καθοριστικό ρόλο οι κυτταροκίνες IL-1β και TNF-α (Burger et al., 2006; Dayer, 2003; Feldmann et al., 2001; Feldmann and Maini, 2002). Έτσι το πρώτο ερώτημα που θελήσαμε να διερευνήσουμε ήταν το ποια είναι η επίδραση της IL-27 στις λειτουργίες των κυτταροκινών αυτών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε φρέσκα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος από υγιείς δότες.

ΕΙΚΟΝΑ 12: Η IL-27 αναστέλλει τις προ-φλεγμονώδεις δράσεις της IL-1β στα ανθρώπινα μονοκύτταρα, τόσο στο βιοχημικό επίπεδο της ενδοκυττάριας σηματοδότησης (Α) όσο και στο επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης (Β και Γ).

4.4.1. Η IL-27 αναστέλλει τις προ-φλεγμονώδεις δράσεις της IL-1β

Όταν τα κύτταρα διεγέρθηκαν με IL-1β παρατηρήθηκε η αναμενόμενη απόκριση με ταχεία και έντονη ενεργοποίηση των MAPK (ErK και p38) (**ΕΙΚΟΝΑ 12Α**). Στα μονοκύτταρα που εκτέθηκαν στην IL-27, η ενεργοποίηση από την IL-1β τόσο του ErK όσο και του p38 αναστάλθηκε

σχεδόν πλήρως (**ΕΙΚΟΝΑ 12Α**). Δεδομένης της αναστολής στο βιοχημικό επίπεδο της ενδοκυττάριας σηματοδότησης εξετάσαμε την απόκριση των μονοκυττάρων στην IL-1β και στο επίπεδο της έκφρασης γονιδίων και της παραγωγής πρωτεϊνών. Η κλασσική απόκριση των μονοκυττάρων στην IL-1β περιλαμβάνει μεταξύ άλλων και την επαγωγή πλήθους προ-φλεγμονοδών κυτταροκινών, όπως είναι η ίδια η IL-1β, οι IL-6 και IL-8 και ο TNF-α (Dinarello, 1996; Dinarello, 2009). Η IL-27 αναχαίτησε σε πολύ μεγάλο βαθμό την παραγωγή όλων των ανωτέρω τόσο στο επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης όσο και στο επίπεδο της πρωτεΐνης (**ΕΙΚΟΝΑ 12Β** και **Γ**).

ΕΙΚΟΝΑ 13: Η IL-27 ρυθμίζει το σύστημα του υποδοχέα της IL-1 στα ανθρώπινα μονοκύτταρα. CD14+ κύτταρα περιφερικού αίματος υγιών ατόμων καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες παρουσία και απουσία IL-27. Τα επίπεδα του mRNA των IL-1RI, IL-1RII και IL-1R antagonist (IL-1Ra) μετρήθηκαν με qPCR.

Ακολούθως διερευνήσαμε το μηχανισμό με τον οποίο η IL-27 επιτυγχάνει μια τόσο ισχυρή αναστολή της δράσης της IL-1β στα ανθρώπινα μονοκύτταρα. Αρχικά εξετάσαμε την επίδραση της IL-27 στο σύστημα του υποδοχέα της IL-1 και διαπιστώσαμε ότι η IL-27 προκαλεί σημαντική ελάττωση της έκφρασης του υποδοχέα IL-1RI ενώ αυξάνει της έκφραση του IL-1RII (**ΕΙΚΟΝΑ 13Α**). Αυτή η παρατήρηση θεωρούμε ότι έχει σημασία στο σύστημά μας γιατί η σύνδεση της IL-

1β με τον υποδοχέα IL-1RI είναι απαραίτητη για την ευόδωση της δράσης της IL-1β, ενώ ο υποδοχέας IL-1RII λειτουργεί ως αναστολέας καθώς δεσμεύει την IL-1β και αποτρέπει τη σύνδεσή της με τον υποδοχέα IL-1RI (Dayer, 2002; Dinarello, 2002; Dinarello, 2009). Επιπλέον όμως, η IL-27 προκάλεσε σημαντική αύξηση της έκφρασης του ανταγωνιστή του υποδοχέα της IL-1 (IL-1R antagonist) (**ΕΙΚΟΝΑ 13B**), ο οποίος παρουσιάζει δομική ομολογία με την IL-1 και την ανταγωνίζεται για τη σύνδεση με τον IL-1RI, λειτουργώντας ως φυσικός αναστολέας της IL-1 (Dayer, 2002; Dinarello, 2009). Τα συμπεράσματα όλων αυτών των παρατηρήσεων είναι ότι η IL-27: 1) είναι ένας ισχυρότατος αναστολέας των προφλεγμονωδών δράσεων της IL-1β και 2) επιτυγχάνει την ανασταλτική της δράση με έναν σύνθετο μηχανισμό, που περιλαμβάνει τη ρύθμιση του συστήματος του υποδοχέα της IL-1 (ελάττωση του IL-1RI και αύξηση του IL-1RII) και την επαγωγή του φυσικού αναστολέα της IL-1.

A **B**

ΕΙΚΟΝΑ 14: Η IL-27 αναστέλλει τις προφλεγμονώδεις δράσεις του TNF- α στα ανθρώπινα μονοκύτταρα. CD14+ κύτταρα περιφερικού αίματος καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες παρουσία ή απουσία IL-27. Στο **A**, τα κύτταρα διεγέρθηκαν με TNF- α για 5, 10 και 15min και η ενεργοποίηση του Erk προσδιορίστηκε με ανοσοκαθήλωση πρωτεϊνών. Στο **B**, τα κύτταρα διεγέρθηκαν με TNF- α για 1h και τα επίπεδα του mRNA της IL-8 μετρήθηκαν με qPCR.

4.4.2. Η IL-27 αναστέλλει τις προ-φλεγμονώδεις δράσεις του TNF- α

Η αποτελεσματικότητα των βιολογικών παραγόντων που αναστέλλουν τη δράση του TNF- α στη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, είναι η καλύτερη απόδειξη για την εμπλοκή του TNF- α στην παθογένεια της νόσου (Taylor and Feldmann, 2009). Σε αυτό το πλαίσιο εξετάσαμε την επίδραση της IL-27 στις προφλεγμονώδεις λειτουργίες του TNF- α . Όπως και στην περίπτωση της IL-1 β , η παρουσία της IL-27 παρεμπόδισε τη δράση του TNF- α στα ανθρώπινα μονοκύτταρα, αναχαιτίζοντας τόσο την ενεργοποίηση των MAPK (**ΕΙΚΟΝΑ 14A**) όσο και την επαγωγή φλεγμονωδών γονιδίων-στόχων του TNF- α , όπως του γονιδίου της IL-8 (**ΕΙΚΟΝΑ 14B**).

ΕΙΚΟΝΑ 15: Η IL-27 αναστέλλει την οστεοκλαστογένεση. * = $p > 0.05$, ** = $p < 0.05$ και *** = $p < 0.01$.

4.5. Η IL-27 αναστέλλει την οστεοκλαστογένεση

Εκτός από τη χρόνια φλεγμονή, οι οστικές διαβρώσεις είναι το δεύτερο σημαντικό χαρακτηριστικό της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας (Schett, 2007). Οι οστικές διαβρώσεις είναι το αποτέλεσμα της δράσης των οστεοκλαστών (Schett and Teitelbaum, 2009). Οι οστεοκλάστες είναι πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα που προέρχονται από κύτταρα της οικογένειας των μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος (προ-οστεοκλάστες). Το κυριότερο ερέθισμα, που προάγει την οστεοκλαστογένεση είναι ο RANKL (Lacey et al., 1998), μια κυτταροκίνη η οποία ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια του TNF (TNF Super Family) (Anderson et al., 1997). Επίσης, άλλες κυτταροκίνες, όπως MCSF, TNF- α , IL-1 β και IL-17 συνεισφέρουν υπό κατάλληλες συνθήκες στην δημιουργία οστεοκλαστών (λεπτομέρειες αναφέρονται στο κεφάλαιο *Εισαγωγή*). Το μικροπεριβάλλον της φλεγμαίνουσας άρθρωσης είναι πλούσιο σε οστεοκλαστογόνους παράγοντες και ευνοεί την δημιουργία επιθετικών οστεοκλαστών, η αναχαίτηση των οποίων είναι στρατηγικής σημασίας για την πρόληψη της καταστροφής των αρθρώσεων (Cohen et al., 2008).

Σε αυτό το πλαίσιο αναρωτηθήκαμε κατά πόσον η IL-27 επηρεάζει τη διαδικασία της δημιουργίας οστεοκλαστών. Χρησιμοποιήσαμε ως προ-οστεοκλάστες μονοκύτταρα, που απομονώθηκαν από το περιφερικό αίμα υγιών ατόμων. Αυτή είναι μια κλασσική και ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος *ex vivo* οστεοκλαστογένεσης (Sorensen et al., 2007) και περιγράφεται λεπτομερώς στο κεφάλαιο *Υλικά και Μέθοδοι*. Όπως ήταν αναμενόμενο, οι προ-οστεοκλάστες, που εκτέθηκαν στο RANKL διαφοροποιήθηκαν σε οστεοκλάστες (πολυπύρρηνα TRAP+ κύτταρα) (**EIKONA 15A και B**). Όταν στο σύστημα προστέθηκε IL-27 από την αρχή της καλλιέργειας των κυττάρων, παρατηρήθηκε μια δόσοεξαρτώμενη αναστολή της οστεοκλαστογένεσης (**EIKONA 15A και B**). Μάλιστα, σε δόσεις 30-100ng/ml, η IL-27 προκάλεσε σχεδόν πλήρη αναστολή της δημιουργίας οστεοκλαστών (**EIKONA 15A και B**). Αντίστοιχη ισχυρότατη αναχαίτηση της οστεοκλαστογένεσης προκλήθηκε ακόμη και όταν η IL-27 προστέθηκε λίγο αργότερα στο σύστημά μας, κατά την τρίτη ημέρα από την έναρξη της καλλιέργειας (**EIKONA 15A και B**). Αντίθετα, η προσθήκη της IL-27 σε πιο προχωρημένο στάδιο, κατά την 5^η ημέρα της καλλιέργειας, είχε πολύ μικρή επίδραση στην ανάπτυξη οστεοκλαστών (**EIKONA 15A και B**). Παρόμοια δόσο-εξαρτώμενη και χρονο-εξαρτώμενη αναστολή παρατηρήσαμε και όταν μετρήσαμε με qPCR την έκφραση γονιδίων που ταυτοποιούν τους οστεοκλάστες (*Cathepsin K*, *TRAP*, *Calcitonin Receptor*, *Integrin β 3*) (**EIKONA 15Γ**). Εφαρμόζοντας μια δοκιμασία ελέγχου της επιβίωσης των κυττάρων (MTT assay), διαπιστώσαμε ότι η παρατηρούμενη ισχυρότατη αναστολή της οστεοκλαστογένεσης από την IL-27 δεν οφείλονταν σε κυτταρικό θάνατο των προ-οστεοκλαστών (**EIKONA 15Δ**).

Προκειμένου να διαπιστώσουμε τις πραγματικές λειτουργικές συνέπειες των ανωτέρω παρατηρήσεων, χρησιμοποιήσαμε τη δοκιμασία σχηματισμού βοθρίων (pit formation assay), που περιγράφεται στο κεφάλαιο *Υλικά και Μέθοδοι*. Τα κύτταρα που διαφοροποιήθηκαν κάτω από

την επίδραση του RANKL απορρόφησαν σημαντική ποσότητα οδοντίνης σχηματίζοντας ευδιάκριτα βοθρία (**EIKONA 15E**). Όταν η IL-27 προστέθηκε στο σύστημα εντός των πρώτων τριών ημερών της καλλιέργειας, δεν διαπιστώσαμε σχηματισμό βοθρίων απορρόφησης στην επιφάνεια της οδοντίνης (**EIKONA 15E**), κάτι που συμβαδίζει με την απουσία οστεοκλαστών κάτω από αυτές τις συνθήκες (**EIKONA 15A και B**). Αντίθετα, όταν η IL-27 προστέθηκε στις καλλιέργειές μας αργότερα, τα σχηματιζόμενα πολυπύρρηνα TRAP+ κύτταρα ήσαν λειτουργικοί οστεοκλάστες καθώς σχημάτισαν βοθρία απορρόφησης οδοντίνης (**EIKONA 15E**). Το τελευταίο συνεπάγεται ότι, η IL-27, ενώ αναστέλλει ισχυρότατα τη διαφοροποίηση των προ-οστεοκλαστών σε λειτουργικούς οστεοκλάστες, δεν μπορεί να αναστείλει σημαντικά τη διαφοροποίηση και τη λειτουργία των ώριμων οστεοκλαστών.

ΕΙΚΟΝΑ 16: Η IL-27 αποτρέπει την επαγωγή του μεταγραφικού παράγοντα NFATc1 στους προ-οστεοκλάστες. **A** και **B**: Η IL-27 προστέθηκε στο σύστημα από την αρχή της καλλιέργειας, δηλαδή πριν την χορήγηση του RANKL (pretreatment). **Γ** και **Δ**: Η IL-27 προστέθηκε την τρίτη ημέρα της καλλιέργειας μαζί με τον RANKL (simultaneous).

4.5.1. Η IL-27 αναστέλλει την επαγωγή του NFATc1 από τον RANKL

Για να ευοδωθεί η διαφοροποίηση των προ-οστεοκλαστών σε ώριμους οστεοκλάστες είναι απαραίτητη η επαγωγή του μεταγραφικού παράγοντα NFATc1 (Asagiri et al., 2005; Ishida et al., 2002; Koga et al., 2005; Negishi-Koga and Takayanagi, 2009; Stern, 2006; Takayanagi, 2007b; Yeo et al., 2006). Όπως ήταν αναμενόμενο, στα κύτταρα που εκτέθηκαν στον RANKL, παρατηρήσαμε έκφραση του NFATc1, που έγινε ορατή στο επίπεδο της πρωτεΐνης εντός 24 ωρών από τη διέγερση με RANKL και παρέμεινε ανιχνεύσιμη για τουλάχιστον 72 ώρες (**ΕΙΚΟΝΑ 16A** και **Γ**). Μια τέτοια έντονη και παρατεταμένη παρουσία του NFATc1 είναι απαραίτητη ώστε να κινητοποιηθεί το πρόγραμμα επαγωγής των γονιδίων που είναι αναγκαία για την οστεοκλαστογένεση (Negishi-Koga and Takayanagi, 2009; Takayanagi, 2007b). Η παρουσία της IL-27 στο σύστημα ανέστειλε σχεδόν πλήρως την παραγωγή της πρωτεΐνης NFATc1 και μείωσε σε σημαντικό βαθμό τα επίπεδα του NFATc1 mRNA (**ΕΙΚΟΝΑ 16A-Δ**). Αυτές οι παρατηρήσεις

μας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι ένας μηχανισμός με τον οποίο η IL-27 αναχαιτίζει την οστεοκλαστογένεση είναι η αναστολή του μεταγραφικού παράγοντα NFATc1.

EIKONA 17: Η IL-27 αναστέλλει τη λειτουργία του RANKL στους προ-οστεοκλάστες παρεμβαίνοντας στο επίπεδο της ενεργοποίησης των βιοχημικών οδών ενδοκυττάριας σηματοδότησης.

4.5.2. Η IL-27 αναστέλλει την ενεργοποίηση μονοπατιών ενδοκυττάριας σηματοδότησης και την επαγωγή του c-jun από τον RANKL

Με σκοπό να διερευνήσουμε περαιτέρω τον μηχανισμό αναστολής του NFATc1 και της οστεοκλαστογένεσης από την IL-27, εξετάσαμε την επίδραση που έχει η IL-27 σε όλο τον βιοχημικό καταρράκτη σημάτων, που είναι αναγκαία για την οστεοκλαστογένεση και προηγούνται της επαγωγής του NFATc1. Το πρώτο χρονικά γεγονός, που υποκινεί την οστεοκλαστογένεση στο σύστημά μας, είναι η σύνδεση του RANKL με τον υποδοχέα του RANK στην επιφάνεια των προ-οστεοκλαστών (Takayanagi, 2007a). Αυτή η σύνδεση οδηγεί σε ταχεία ενεργοποίηση τουλάχιστον δύο βιοχημικών μονοπατιών, των MAP κινασών (MAPK) και του NFκB (Wada et al., 2006; Xing et al., 2005). Πράγματι, εντός 5-15 λεπτών από την προσθήκη του RANKL παρατηρήσαμε ενεργοποίηση των MAPK ErK και p38 (**EIKONA 17A**). Παράλληλα διαπιστώσαμε, αρχικά φωσφορυλίωση και ακολούθως διάσπαση, της πρωτεΐνης IκBα (**EIKONA 17B**), φαινόμενα ενδεικτικά ενεργοποίησης από τον RANKL του κλασσικού μονοπατιού του NFκB

(Brown et al., 2008; Chiu et al., 2009; Vallabhapurapu and Karin, 2009). Η παρουσία της IL-27 απέτρεψε την ενεργοποίηση τόσο των MAPK όσο και του NF κ B (**EIKONA 17A** και **B**).

Έχει περιγραφεί από άλλη ερευνητική ομάδα ότι ένας μηχανισμός με τον οποίο η IFN- γ παρεμποδίζει την οστεοκλαστογένεση είναι η μείωση των επιπέδων του TRAF-6 (Takayanagi et al., 2000). Το τελευταίο είναι μια μοριακή πλατφόρμα (adaptor molecule), που προσδένεται πάνω στον υποδοχέα RANK και προσελκύει διάφορα μόρια, που είναι απαραίτητα για να αρχίσει ο καταρράκτης βιοχημικών σημάτων που ακολουθεί τη σύνδεση του RANKL με τον υποδοχέα RANK (Lomaga et al., 1999; Takayanagi, 2007a; Wong et al., 1998). Στο σύστημά μας η IL-27 δεν είχε καμία επίδραση στα επίπεδα του TRAF6 (**EIKONA 17Γ**), κάτι που συνεπάγεται ότι παρά τις όποιες ομοιότητες μεταξύ της IL-27 και της IFN- γ , οι δυο αυτές κυτταροκίνες αναστέλλουν την οστεοκλαστογένεση με διαφορετικούς μηχανισμούς.

Ανάμεσα στα μόρια που συμμετέχουν στην αλυσίδα των βιοχημικών γεγονότων που ακολουθούν την διέγερση των προ-οστεοκλαστών με τον RANKL είναι το c-Jun (Teitelbaum, 2004). Το τελευταίο συνδεόμενο με το c-fos συγκροτεί το AP-1 (Zenz et al., 2008), που μαζί με το NFATc1, είναι οι κυριότεροι μεταγραφικοί παράγοντες που καθοδηγούν την οστεοκλαστογένεση (Ikeda et al., 2004; Wagner and Eferl, 2005). 0.5-1 ώρα μετά την διέγερση των προ-οστεοκλαστών με RANKL, τα επίπεδα της πρωτεΐνης c-Jun, στο πυρηνικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα, αυξάνουν σημαντικά (**EIKONA 17Δ**). Η παρουσία της IL-27 απέτρεψε την επαγωγή της c-Jun πρωτεΐνης (**EIKONA 17Δ**).

4.5.3. Η IL-27 αναστέλλει την έκφραση του υποδοχέα RANK στους προ-οστεοκλάστες

Μέχρι τώρα έχουμε διαπιστώσει ότι η IL-27 είναι ισχυρότατος αναστολέας της οστεοκλαστογόνου δράσης του RANKL καθώς αποτρέπει την ενεργοποίηση των MAPK και του NFκB και αναστέλλει την επαγωγή των μεταγραφικών παραγόντων NFATc1 και c-Jun, χωρίς όμως να επηρεάζει τα επίπεδα του TRAF6 (**ΕΙΚΟΝΕΣ 15-17**). Σε αυτό το πλαίσιο εξετάσαμε το ενδεχόμενο όλα τα ανωτέρω να είναι το αποτέλεσμα απευθείας επίδρασης της IL-27 στο επίπεδο έκφρασης του υποδοχέα RANK στην κυτταρική επιφάνεια των προ-οστεοκλαστών. Πράγματι παρατηρήσαμε ότι η IL-27 ελαττώνει τα επίπεδα έκφρασης του RANK mRNA στους προ-οστεοκλάστες (**ΕΙΚΟΝΑ 18**), κάτι που συνεπάγεται ότι τους καθιστά λιγότερο ικανούς να ανταποκριθούν στην οστεοκλαστογόνο δράση του RANKL.

ΕΙΚΟΝΑ 18: Η IL-27 ελαττώνει τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα RANK στους προ-οστεοκλάστες.

Η ελάττωση των επιπέδων του υποδοχέα RANK στο σύστημά μας είναι της τάξεως του 50% (**ΕΙΚΟΝΑ 18**), ενώ η αναστολή της οστεοκλαστογένεσης από την IL-27 είναι σχεδόν πλήρης (**ΕΙΚΟΝΑ 15Α-Γ**). Αυτό υποδηλώνει ότι πιθανώς να συνεισφέρουν και άλλοι μηχανισμοί στο τελικό αποτέλεσμα της δράσης IL-27 στους προ-οστεοκλάστες.

ΕΙΚΟΝΑ 19: IL-27 ελαττώνει επιλεκτικά τα επίπεδα του συν-διεγερτικού (co-stimulatory) υποδοχέα TREM-2 στους προ-οστεοκλάστες.

4.5.4. Η IL-27 αναστέλλει την έκφραση του συν-διεγερτικού υποδοχέα TREM-2 στους προ-οστεοκλάστες

Μέσα σε αυτό το πλαίσιο εξετάσαμε την επίδραση της IL-27 στη παραγωγή του δεύτερου συνδιεγερτικού σήματος, που απαιτείται για να ευοδωθεί η οστεοκλαστογένεση (εκτενής ανάπτυξη της *θεωρίας των δύο σημάτων* στην οστεοκλαστογένεση υπάρχει στην *Εισαγωγή*). Με έκπληξη διαπιστώσαμε ότι η IL-27 προκαλεί σημαντικότερη μείωση στα επίπεδα έκφρασης του mRNA του TREM-2 (**ΕΙΚΟΝΑ 19Α**), χωρίς να ελαττώνει την έκφραση των άλλων μορίων (OSCAR, SIRPβ1, ILT7, DAP12 FcRγ) (**ΕΙΚΟΝΑ 19Β** και **Γ**), που συμμετέχουν στην δημιουργία του συνδιεγερτικού σήματος. Δεδομένου ότι ο ρόλος του TREM-2 στην ανθρώπινη οστεοκλαστογένεση είναι πολύ καλά τεκμηριωμένος (Humphrey et al., 2006; Paloneva et al., 2003; Park-Min et al., 2009), υποθέτουμε ότι η αναστολή στην έκφραση του TREM-2 είναι ένας

επιπλέον μηχανισμός που συμβάλλει καθοριστικά στην παρατηρούμενη αναχαίτηση της οστεοκλαστογένεσης από την IL-27.

ΕΙΚΟΝΑ 20: Τα μυελοειδή κύτταρα του ποντικού (μονοκύτταρα και μακροφάγα) αποκρίνονται ελάχιστα στην IL-27.

4.6. Τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα του ποντικού αποκρίνονται ελάχιστα στην IL-27

Έχοντας ως απώτερο σκοπό να αξιοποιήσουμε τα πλεονεκτήματα της χρήσης γενετικά τροποποιημένων πειραματόζων (knock-out), εξετάσαμε τις δράσεις της IL-27 σε κύτταρα ποντικών. Όταν διεγείραμε με IL-27 μονοκύτταρα ποντικού (**ΕΙΚΟΝΑ 20Α**) και μακροφάγα που έχουν δημιουργηθεί *ex vivo* από κύτταρα του μυελού των οστών του ποντικού (Bone Marrow Derived Macrophages/BMDM) (**ΕΙΚΟΝΑ 20Β** και **Γ**) διαπιστώσαμε με έκπληξη ότι σε αντίθεση με τα αντίστοιχα κύτταρα ανθρώπινης προέλευσης, τα εν λόγω κύτταρα του ποντικού δεν ανταποκρίνονται στην IL-27. Συγκεκριμένα, ενώ ανταποκρίνονται στη διέγερση με IFN- γ (positive control), όταν χορηγήθηκε σε μεγάλες δόσεις IL-27, δεν ενεργοποιήθηκαν ούτε τα STATs (STAT-1 και STAT-3) (**ΕΙΚΟΝΑ 20Α** και **Β**) ούτε τα αντίστοιχα γονίδια-στόχοι (**ΕΙΚΟΝΑ 20Γ**). Αντίθετα,

όταν χορηγήσαμε IL-27 σε σπληνοκύτταρα ποντικού, που είναι μείγμα κυρίως λεμφοκυττάρων, παρατηρήσαμε έντονη ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων STAT-1 και STAT-3 (**EIKONA 20Δ**). Αυτό συνεπάγεται ότι επιλεκτικά τα μυελοειδή (μονοκύτταρα και BMDM) και όχι τα λεμφοειδή κύτταρα του ποντικού υποαπαντούν στην IL-27.

EIKONA 21: Η IL-27 έχει πολύ ασθενή αντιστεοκλαστογόνο δράση στα ποντίκια (* $=p>0,05$ και ** $=p<0,05$).

Για να στηρίξουμε περισσότερο τις παρατηρήσεις μας, εξετάσαμε την επίδραση της IL-27 στην οστεοκλαστογένεση από προ-οστεοκλάστες ποντικού. Τόσο τα μονοκύτταρα του ποντικού όσο και τα BMDM είναι δύο καλά αποδεκτοί από την επιστημονική κοινότητα πληθυσμοί προ-οστεοκλαστών (Ishii et al., 2009; Koga et al., 2004; Takayanagi et al., 2002a; Wu et al., 2009). Διαπιστώσαμε ότι η IL-27, σε αντίθεση με την σχεδόν πλήρη αναστολή της ανθρώπινης οστεοκλαστογένεσης (**EIKONA 15**), στο σύστημα του ποντικού προκάλεσε μόνο μερική ανάσχεση της οστεοκλαστογένεσης (**EIKONA 21A και B**). Αυτό το εύρημα βρίσκεται σε απόλυτη συμφωνία με την προηγούμενη παρατήρησή μας ότι τα μονοκύτταρα και τα BMDM του ποντικού υποαπαντούν στην IL-27 (**EIKONA 20**).

4.6.1. Στα μακροφάγα του ποντικίου η έκφραση του υποδοχέα WSX-1 είναι ελάχιστη

Για να διαπιστώσουμε που οφείλεται η μικρή απαντητική ικανότητα των μυελοειδών κυττάρων του ποντικίου στην IL-27, εξετάσαμε τα επίπεδα έκφρασης της υπομονάδας WSX-1 του υποδοχέα IL-27. Χρησιμοποιώντας sqPCR παρατηρήσαμε ότι το επίπεδο έκφρασης του WSX-1 mRNA στα BMDM είναι εξαιρετικά χαμηλό συγκρινόμενο με αυτό στα σπληνοκύτταρα του ποντικίου και τα ανθρώπινα μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα (**ΕΙΚΟΝΑ 22**). Από το σύνολο των ανωτέρω παρατηρήσεων συνεπάγεται ότι υπάρχει μια ουσιώδης διαφορά μεταξύ ανθρώπου και ποντικίου στην απαντητική ικανότητα των μυελοειδών κυττάρων τους στις δράσεις της IL-27. Υποθέτουμε ότι αυτή η διαφορά είναι το αποτέλεσμα ενός εξελικτικού πλεονεκτήματος, που πιθανά παρέχει στον άνθρωπο η δυνατότητα των μονοκυττάρων και μακροφάγων του να ανταποκρίνονται στη δράση της IL-27.

ΕΙΚΟΝΑ 22: Η έκφραση του υποδοχέα WSX-1 στα μακροφάγα του ποντικίου είναι πολύ ασθενής.

4.7. Το φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον αναστέλλει τις δράσεις της IL-27 στα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα

Μέχρι τώρα έχουμε δείξει, χρησιμοποιώντας κύτταρα περιφερικού αίματος από υγιείς δότες, ότι η IL-27 αυξάνει την απόκριση των μονοκυττάρων/μακροφάγων στους TLR-ligands (προφλεγμονώδης λειτουργία), αναστέλλει την δράση των TNF- α και IL-1 β (αντιφλεγμονώδης λειτουργία) και αναχαιτίζει την οστεοκλαστογένεση. Από την άλλη, η Ρευματοειδής Αρθρίτιδα χαρακτηρίζεται από την παρουσία επιθετικών οστεοκλαστών που προκαλούν οστικές διαβρώσεις (Leibbrandt and Penninger, 2009; Schett, 2007; Schett, 2009), και από χρόνια φλεγμονή στις αρθρώσεις, στην οποία πρωταγωνιστούν οι κυτταροκίνες TNF- α και IL-1 β (Burger et al., 2006; Dayer, 2003; Feldmann, 2008; Feldmann et al., 2001; Feldmann and Maini, 2002). Σε αυτό το πλαίσιο εξετάσαμε κατά πόσον η IL-27 μπορεί να λειτουργήσει ευεργετικά στη Ρευματοειδή Αρθρίτιδα μπλοκάρωντας τη φλεγμονή και αναχαιτίζοντας την οστεοκλαστογένεση.

ΕΙΚΟΝΑ 23: CD14+ κύτταρα από το αρθρικό υγρό ασθενών με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα αποκρίνονται έντονα στην IFN- γ και ελάχιστα στην IL-27.

4.7.1. Το φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον της άρθρωσης αναστέλλει τις δράσεις της IL-27

Χρησιμοποιήθηκαν μονοκύτταρα/μακροφάγα (CD14+ κύτταρα), που απομονώθηκαν από τα αρθρικά υγρά ασθενών που έπασχαν από Ρευματοειδή Αρθρίτιδα (η διαδικασία απομόνωσης περιγράφεται στο κεφάλαιο *Υλικά και Μέθοδοι*). Η διάγνωση όλων των ασθενών έγινε σύμφωνα με τα κριτήρια του Αμερικανικού Κολλεγίου Ρευματολογίας (1987 revised ACR criteria). Εξετάσαμε το είδος της απόκρισης αυτών των κυττάρων στην IL-27 ακολουθώντας παρόμοια μεθοδολογία με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για τα κύτταρα του περιφερικού αίματος από υγιείς δότες. Τα κύτταρα που μόλις απομονώθηκαν από το αρθρικό υγρό των ασθενών, ανταποκρίθηκαν στη διέγερση με IFN- γ (χρησιμοποιήθηκε ως positive control) με την αναμενόμενη ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα STAT-1 (**ΕΙΚΟΝΑ 23Α**) και την έντονη επαγωγή των γνωστών γονιδίων-στόχων του STAT-1 (**ΕΙΚΟΝΑ 23Β**). Προς μεγάλη μας έκπληξη, τα φρέσκα κύτταρα των ασθενών δεν αποκρίθηκαν στην IL-27 ακόμη και σε δόσεις της τάξεως των 100ng/ml. Συγκεκριμένα παρατηρήσαμε, συγκριτικά με την IFN- γ , ελάχιστη

ενεργοποίηση του STAT-1 (**ΕΙΚΟΝΑ 23Α**) και ελάχιστη ως καθόλου επαγωγή των αντίστοιχων γονιδίων-στόχων (**ΕΙΚΟΝΑ 23Β**).

Υποθέσαμε ότι η έκθεση των μονοκυττάρων/μακροφάγων (CD14+ κύτταρα) στο φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον του αρθρικού υγρού καθιστά τα κύτταρα των ασθενών ανθεκτικά στη δράση της IL-27. Για να ελέγξουμε την υπόθεσή μας ακολουθήσαμε δύο στρατηγικές:

1) εξετάσαμε πως μεταβάλλεται η απόκριση των κυττάρων του αρθρικού υγρού ασθενών στην IL-27 όταν αυτά καλλιεργηθούν για 24 ώρες με και χωρίς την παρουσία αρθρικού υγρού.

2) εξετάσαμε πως μεταβάλλεται η απόκριση των κυττάρων περιφερικού αίματος υγιών ατόμων στην IL-27 όταν αυτά καλλιεργηθούν για 24 ώρες με την παρουσία αρθρικού υγρού από ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα.

ΕΙΚΟΝΑ 24: Τα CD14+ που απομονώθηκαν από το αρθρικό υγρό ασθενών με PA, ανακτούν, μετά την απομάκρυνσή τους από το φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον, μέρος της ικανότητας να αποκρίνονται στην IL-27. **A:** Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε κοινό καλλιεργητικό υλικό (RPMI 10% FBS) χωρίς την παρουσία αρθρικού υγρού για 3, 24 ή 48 ώρες. Ακολούθως διεγέρθηκαν για 3 ώρες με IL-27 (100ng/ml). **B:** Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε RPMI 10%FBS απουσία ή παρουσία αρθρικού υγρού (σε αραίωση 1:1 με RPMI). Ακολούθως διεγέρθηκαν για 3 ώρες με IL-27. Η έκφραση των κλασσικών γονιδίων-στόχων του STAT-1 (CXCL9 και CXCL10) μετρήθηκε με qPCR.

ΕΙΚΟΝΑ 25: Η έκθεση των μονοκυττάρων περιφερικού αίματος από υγιείς δότες σε αρθρικό υγρό από ασθενείς με ΡΑ, ελαττώνει την ικανότητα των κυττάρων να απαντούν στην IL-27. Τα κύτταρα, μετά την απομόνωσή τους από το περιφερικό αίμα, καλλιεργήθηκαν για 24h είτε σε κοινό καλλιεργητικό υλικό (RPMI 10%FBS) είτε σε μίγμα RPMI και αρθρικού υγρού (1:1). Ακολούθως τα κύτταρα διεγέρθηκαν με IL-27 (100ng/ml) για 3 ώρες και η έκφραση του *CXCL10* mRNA μετρήθηκε με qPCR.

Και στις δύο περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο της απόκρισης στην IL-27 η επαγωγή της έκφρασης του *CXCL10*, που είναι ένα κλασσικό γονίδιο στόχος του STAT-1 και όπως έχουμε δείξει προηγουμένως είναι ένας αξιόπιστος δείκτης απόκρισης των κυττάρων στην IL-27.

Στην πρώτη περίπτωση, παρατηρήσαμε ότι όταν τα CD14+ κύτταρα των ασθενών διατηρήθηκαν μακριά από το φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον του αρθρικού υγρού ανέκτησαν μέρος της ικανότητάς τους να απαντούν στην IL-27 επάγοντας την έκφραση του *CXCL9* (**ΕΙΚΟΝΑ 24Α**). Αντίθετα, όταν παρέμειναν σε συνθήκες παρουσίας φλεγμονώδους αρθρικού υγρού εξακολούθησαν να είναι ανθεκτικά στη δράση της IL-27 (**ΕΙΚΟΝΑ 24Β**). Στην δεύτερη περίπτωση, διαπιστώσαμε ότι όταν τα CD14+ κύτταρα του περιφερικού αίματος από υγιείς δότες εκτέθηκαν στο αρθρικό υγρό των ασθενών, απώλεσαν σημαντικό μέρος της ικανότητάς τους να απαντούν στην IL-27 (**ΕΙΚΟΝΑ 25**). Το συμπέρασμα από αυτές τις παρατηρήσεις είναι ότι στο φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον της άρθρωσης υπάρχουν παράγοντες, που επιδρώντας πάνω στα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα, τα καθιστούν ανθεκτικά στις δράσεις της IL-27.

ΕΙΚΟΝΑ 26: Ο TNF-α και η IL-1β αναστέλλουν τη δράση της IL-27 στα ανθρώπινα μονοκύτταρα.

4.7.2. Αναστολή της δράσης της IL-27 από τις κυτταροκίνες TNF-α και IL-1β

Στο επόμενο στάδιο της έρευνάς μας θελήσαμε να αναζητήσουμε αυτούς τους παράγοντες, που ευθύνονται για την αναστολή της λειτουργίας της IL-27. Δεδομένου του κεντρικού ρόλου που διαδραματίζουν, στην φλεγμονή της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, οι κυτταροκίνες TNF-α και IL-1β, εξετάσαμε την πιθανή εμπλοκή τους στην απώλεια της απαντητικής ικανότητας των κυττάρων στην IL-27. Εκθέσαμε μονοκύτταρα περιφερικού αίματος προερχόμενα από υγιείς δότες σε TNF-α ή IL-1β και εξετάσαμε την απόκριση στην IL-27. Με έκπληξη διαπιστώσαμε ότι στα κύτταρα που εκτέθηκαν τόσο σε TNF-α όσο και σε IL-1β υπήρξε σχεδόν πλήρης αναστολή της δράσης της IL-27. Η αναστολή ήταν εμφανής τόσο στο βιοχημικό επίπεδο της ενδοκυττάριας σηματοδότησης (ενεργοποίηση των STAT-1 και STAT-3) (**ΕΙΚΟΝΑ 26Α**) όσο και στο επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης (επαγωγή του *CXCL10*) (**ΕΙΚΟΝΑ 26Β**). Παρουσία etanercept (μπλοκάρει τη δράση του TNF-α) ή anakinra (μπλοκάρει την δράση της IL-1β), αυτή η αναστολή αποτράπηκε (**ΕΙΚΟΝΑ 26Α** και **Β**), επιβεβαιώνοντας την ειδικότητα των TNF-α και IL-1β στο να μπλοκάρουν τη δράση της IL-27.

A **B**

ΕΙΚΟΝΑ 27: Ο TNF-α αναστέλλει τη δράση της IL-27 μέσω της ενεργοποίησης του p38 ενώ η IL-1β μέσω ελάττωσης της έκφρασης του υποδοχέα gp130.

Τόσο ο TNF-α όσο και η IL-1β επιτυγχάνουν αρκετές από τις δράσεις τους ενεργοποιώντας το p38. Αποτρέψαμε την ενεργοποίηση του p38 στο σύστημά μας με τη χρήση ειδικού αναστολέα (SB203580) και διαπιστώσαμε ότι μόνο ο TNF-α, και όχι η IL-1β, απώλεσε σημαντικό μέρος της ικανότητας να αναστέλλει τη δράση της IL-27 (**ΕΙΚΟΝΑ 27Α**). Επιπλέον, διαπιστώσαμε ότι μόνο η IL-1β, και όχι ο TNF-α, ελαττώνει την έκφραση του gp130 (υπομονάδα του υποδοχέα της IL-27) στην επιφάνεια των μονοκυττάρων (**ΕΙΚΟΝΑ 27Β**). Από τα ανωτέρω προκύπτει ότι ο TNF-α και η IL-1β χρησιμοποιούν διαφορετικούς μηχανισμούς για να περιορίσουν την απαντητικότητα των μονοκυττάρων στη δράση της IL-27. Ο TNF-α επιτυγχάνει την ανασταλτική του δράση ενεργοποιώντας το p38 ενώ η IL-1β με το να μειώνει τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα της IL-27 στην κυτταρική επιφάνεια.

CXCL10) (**EIKONA 28B**). Χρησιμοποιώντας αναστολείς της πρωτεϊνσύνθεσης (Cycloheximide) και της βιοσύνθεσης νέου mRNA (Actinomycin) διαπιστώσαμε ότι ο LPS αναστέλλει τη δράση της IL-27 στα ανθρώπινα μονοκύτταρα απευθείας, δηλαδή χωρίς να απαιτείται η σύνθεση κάποιου νέου μορίου (**EIKONA 28Γ**). Υπέρ μιας απευθείας δράσης είναι και το γεγονός ότι η αναστολή παρατηρήθηκε εντός μικρού διαστήματος (μόλις 30 λεπτά της ώρας) από την έκθεση των μονοκυττάρων στον LPS (**EIKONA 28Α**). Επίσης, με τη χρήση κατάλληλων αναστολέων των MAPK (U0126 που αναστέλλει την MEK1/2 και SB203580 που μπλοκάρει το p38), διαπιστώσαμε ότι ο LPS αναχαιτίζει τη δράση της IL-27 μέσω της ενεργοποίησης του p38 (**EIKONA 28Δ**).

EIKONA 29: Ο LPS ενώ αναστέλλει τη δράση των κυτταροκινών IL-6 και IL-27 στα ανθρώπινα μονοκύτταρα, δεν επηρεάζει τη δράση της IFN-γ.

Τέλος εξετάσαμε κατά πόσον αυτή η ανασταλτική δράση του LPS είναι ειδική για την IL-27 ή αφορά και άλλες κυτταροκίνες που ενεργοποιούν το μονοπάτι Jak-STAT. Διαπιστώσαμε ότι ο LPS περιόρισε σημαντικά την ικανότητα της IL-6 να ενεργοποιεί τα STATs, ενώ διατηρήθηκε ανέπαφη η απαντητική ικανότητα των κυττάρων στην IFN-γ (**EIKONA 29**). Το ότι τόσο η IL-6 όσο και η IL-27 αναστέλλονται από τον LPS μας οδηγεί στην υπόθεση ότι ο LPS πιθανότατα ρυθμίζει το gp130, που είναι μέρος του υποδοχέα και των δυο κυτταροκινών. Χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής, πράγματι διαπιστώσαμε ότι η έκθεση των μονοκυττάρων στον LPS ελαττώνει τα επίπεδα έκφρασης του gp130 στην επιφάνεια των κυττάρων (**EIKONA 30**). Μάλιστα αυτή η ελάττωση διαμεσολαβείται από την ενεργοποίηση του p38 γιατί όταν χρησιμοποιήσαμε

ειδικό αναστολέα του p38 (SB 203580, 10 μ M), η διέγερση των κυττάρων με LPS δεν οδήγησε σε μείωση της μεμβρανικής έκφρασης του gp130 (**EIKONA 30**). Επειδή όμως η ελάττωση του gp130 είναι μερική, ενώ η αναστολή των IL-6 και IL-27 είναι σχεδόν πλήρης, υποθέτουμε ότι ο LPS πιθανόν να ρυθμίζει εκτός από τα επίπεδα και τη λειτουργία του gp130. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές ενδείξεις, που εισηγούνται ότι ο LPS, επάγοντας τα ανασταλτικά μορια SHP-2 και SOCS3, ρυθμίζει τη λειτουργία του gp130 (Fischer et al., 2004; Sengupta et al., 1996).

EIKONA 30: Ο LPS προκαλεί μερική ελάττωση της έκφρασης του υποδοχέα gp130 στα μονοκύτταρα μέσω ενεργοποίησης του p38.

5. Συζήτηση

5.1. Η παρατεταμένη ενεργοποίηση του STAT-1 ερμηνεύει τη δράση της IL-27 στα μονοκύτταρα και μακροφάγα

Μελετώντας την επίδραση της IL-27 στα ανθρώπινα μονοκύτταρα και μακροφάγα διαπιστώσαμε ότι, αν και στο βιοχημικό επίπεδο προκαλεί αντίστοιχης έντασης ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων STAT-1 και STAT-3, στο επίπεδο της βιολογικής δράσης επικρατεί η λειτουργία του STAT-1. Συγκεκριμένα παρατηρήσαμε ότι όταν διεγείρονται ανθρώπινα μονοκύτταρα και μακροφάγα με IL-27 επάγεται η έκφραση μόνο των γονιδίων-στόχων του STAT-1 (*CXCL9*, *CXCL10*, *IRF-1*, *SOCS1*, *STAT-1*) και όχι των γονιδίων-στόχων του STAT-3 (*SOCS3*). Μάλιστα αποδείξαμε περαιτέρω τον καθοριστικό ρόλο του STAT-1 όταν η IL-27 απώλεσε τη δράση της σε κύτταρα που η ενδοκυττάρια έκφραση του STAT-1 ήταν ελάχιστη (THP-1 STAT-1 Low).

Από τις κυτταροκίνες που ενεργοποιούν το μονοπάτι ενδοκυττάριας σηματοδότησης Jak-STAT, η IFN- γ είναι αυτή που κατ'εξοχήν διαμεσολαβεί τις δράσεις της μέσω του STAT-1 (Schroder et al., 2004) ενώ η IL-10 μέσω του STAT-3 (Moore et al., 2001). Στην περίπτωση της IFN- γ η σχετική ένταση της ενεργοποίησης του STAT-1 στο βιοχημικό επίπεδο βρίσκεται σε απόλυτη συνάρτηση με την κυρίαρχη δράση του STAT-1 στο επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης. Συγκεκριμένα, στα μονοκύτταρα και μακροφάγα η IFN- γ προκαλεί έντονη ενεργοποίηση του STAT-1 και ελάχιστη ενεργοποίηση του STAT-3, οπότε είναι απολύτως αναμενόμενη η επαγωγή κυρίως γονιδίων-στόχων του STAT-1. Αντίστοιχα, στην περίπτωση της IL-10 κυριαρχεί η λειτουργία του μεταγραφικού παράγοντα STAT-3 και επάγονται κυρίως οι γονιδιακοί στόχοι του STAT-3 γιατί μετά τη σύνδεση της IL-10 με τον υποδοχέα της παρατηρείται μια ισχυρότατη ενεργοποίηση του STAT-3 και ασθενέστατη ενεργοποίηση του STAT-1. Όμως στην περίπτωση της IL-27, η κυρίαρχη δράση του STAT-1 δεν μπορεί να ερμηνευτεί με απλούς ποσοτικούς όρους

καθώς στο βιοχημικό επίπεδο η IL-27 προκαλεί μια σχετικά ισόρροπη, ως προς την ένταση, ενεργοποίηση τόσο του STAT-1 όσο και του STAT-3.

Ελέγχοντας όμως την κινητική της ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων από την IL-27, διαπιστώσαμε ότι η ενεργοποίηση του STAT-1 ήταν παρατεταμένη ενώ αυτή του STAT-3 ήταν βραχείας διάρκειας. Σε αυτή την διαφορά στη διάρκεια ενεργοποίησης των STATs αποδίδουμε το ότι η IL-27 επάγει στα μονοκύτταρα μόνο γονίδια-στόχους του STAT-1 και όχι στόχους του STAT-3. Η σημασία της διάρκειας της ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας STAT για την επαγωγή της έκφρασης γονιδίων-στόχων έχειδειχθεί στο παρελθόν και σε περιπτώσεις άλλων κυτταροκινών (El Kasmi et al., 2006; Murray, 2007; Yoshimura et al., 2007).

5.2. Ομοιότητες και διακριτοί ρόλοι ανάμεσα στην IL-27 και την IFN-γ

Οι παρατηρήσεις μας σχετικά με τον κεντρικό ρόλο του STAT-1 στη λειτουργία της IL-27, αποτελούν τη βιοχημική βάση που εξηγεί μια σειρά ομοιότητες στη βιολογική δράση ανάμεσα στην IL-27 και την IFN-γ. Οι κυριότερες ομοιότητες που διαπιστώσαμε είναι ότι: 1) επάγουν στα μονοκύτταρα και μακροφάγα την έκφραση της ίδιας ομάδας γονιδίων (*CXCL9*, *CXCL10*, *IRF-1*, *SOCS1*, *STAT-1*), 2) και οι δυο ευαισθητοποιούν τα μονοκύτταρα στο να απαντούν εντονότερα στους TLR-ligands (priming effect), 3) στα μονοκύτταρα και μακροφάγα ελαττώνουν την παραγωγή και αναπρογραμματίζουν (reprogramming) τη λειτουργία της IL-10, 4) αναστέλλουν την προ-φλεγμονώδη δράση της IL-1β με παρόμοιο μηχανισμό (ελάττωση της έκφρασης του υποδοχέα IL-1RI) και 5) είναι και οι δυο ισχυρότατοι αναστολείς της οστεοκλαστογένεσης (Herrero et al., 2003; Hu et al., 2005; Hu et al., 2006; Takayanagi et al., 2000). Οι ομοιότητες που παρατηρήσαμε στη λειτουργία ανάμεσα στην IL-27 και στην IFN-γ έρχονται να προστεθούν σε μια σειρά άλλων που έχουν ήδη αναφερθεί στη βιβλιογραφία και είναι: 1) η επαγωγή της έκφρασης των μορίων MHC II στα μυελοειδή κύτταρα και η αύξηση της αντιγονοπαρουσιαστικής ικανότητας των δενδριτικών κυττάρων και 2) η παρόμοια δράση τους στα διαφοροποιούμενα T-λεμφοκύτταρα (επάγουν την έναρξη της διαφοροποίησης προς την κατεύθυνση Th1 και αναστέλλουν τις Th2 και Th17) (Feng et al., 2008; Schroder et al., 2004; Yoshida and Miyazaki, 2008).

Παρά τις όποιες ομοιότητες τους, η IL-27 και η IFN-γ πιστεύεται ότι έχουν διακριτούς ρόλους στη διάρκεια της ανοσολογικής αντίδρασης. Η IL-27 είναι προϊόν των κυττάρων της φυσικής ανοσίας (δενδριτικά κύτταρα, μονοκύτταρα και μακροφάγα) (Stumhofer and Hunter, 2008; Yoshida et al., 2009) ενώ η IFN-γ παράγεται κυρίως από κύτταρα της επίκτητης ανοσίας (Th1 λεμφοκύτταρα) (Schroder et al., 2004). Τα μόνα κύτταρα της φυσικής ανοσίας που

παράγουν μικρές μόνο ποσότητες IFN- γ είναι τα NK κύτταρα (Hunter et al., 2004). Στην διάρκεια μιας ανοσολογικής απόκρισης είναι γνωστό ότι κινητοποιείται χρονικά πρώτα η φυσική ανοσία και μετά από μέρες ως εβδομάδες η επίκτητη ανοσία. Αυτό συνεπάγεται ότι στην πορεία μιας ανοσολογικής αντίδρασης ενάντια σε κάποιο παθογόνο η IFN- γ , που είναι πολύ σημαντική για την άμυνα, θα παραχθεί σε επαρκείς ποσότητες αρκετές μέρες μετά της εισβολή του παθογόνου. Αυτό μάλιστα είναι ιδιαίτερα σημαντικό σε περιπτώσεις λοιμώξεων που δεν προκαλούν εξ' αρχής ιδιαίτερη ενεργοποίηση των NK κυττάρων (Hunter et al., 2004). Αντίθετα η IL-27, ως άμεσο προϊόν της φυσικής ανοσίας, είναι παρούσα από την αρχή και πιστεύεται ότι κατευθύνει την ανοσολογική απόκριση στην έναρξή της και μέχρι να αναλάβει αυτό το ρόλο η IFN- γ (Yoshida et al., 2007). Συγκεκριμένα για το πρώτο αυτό διάστημα η IL-27 παίζει διεγερτικό ρόλο 1) ενισχύοντας την απόκριση των μακροφάγων στα παθογόνα (priming της απόκρισης στους TLR-ligands) και 2) κινητοποιώντας την έναρξη της διαφοροποίησης των λεμφοκυττάρων προς την κατεύθυνση Th1 (Villarino et al., 2004; Villarino and Hunter, 2004). Στη συνέχεια, όταν η IFN- γ είναι πλέον παρούσα, η IL-27 αλλάζει ρόλο και από διεγέρτης γίνεται αναστολέας της ανοσολογικής απόκρισης (αναστέλλει τις δράσεις των κυτταροκινών TNF- α και IL-1 β και περιορίζει τα Th1 και Th17 λεμφοκύτταρα), με κύριο σκοπό να ελεγχθεί η ένταση και η διάρκεια της ανοσολογικής απόκρισης ώστε να περιοριστεί η ανεπιθύμητη ιστική βλάβη (Batten and Ghilardi, 2007; Stumhofer and Hunter, 2008; Yoshida et al., 2009).

5.3. Οι αντιφλεγμονώδεις λειτουργίες της IL-27 στο πλαίσιο στείρας φλεγμονής

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι το κύριο ερέθισμα για την παραγωγή της IL-27 είναι οι TLR-ligands και τα παθογόνα (Goriely et al., 2008; Stumhofer and Hunter, 2008; Yoshida et al., 2009). Αυτό συνεπάγεται ότι η IL-27 παράγεται κυρίως στα πλαίσια λοιμώξεων. Η παρατήρησή μας ότι και ο TNF- α οδηγεί στην παραγωγή της, υποδηλώνει ότι η IL-27 μπορεί να παραχθεί και στο πλαίσιο μιας φλεγμονής μη λοιμώδους αιτιολογίας. Πράγματι έχει αναφερθεί η ανίχνευση IL-27 στον αρθρικό υμένα ασθενών με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα και σε κοκκιωματώδεις βλάβες ασθενών με Σαρκοείδωση και νόσο Crohn (Larousserie et al., 2004; Niedbala et al., 2008). Ενώ ο σύνθετος ρόλος της IL-27 στην έναρξη και την εξέλιξη μιας λοίμωξης έχει αρχίσει να γίνεται κατανοητός (περιγράφεται αναλυτικά προηγουμένως), ο πιθανός ρόλος της στο πλαίσιο χρόνιων φλεγμονωδών παθήσεων μη λοιμώδους αιτιολογίας παραμένει άγνωστος. Στην έρευνά μας χρησιμοποιήσαμε ως μοντέλο τη χρόνια φλεγμονή του αρθρικού υμένα της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας. Σε αυτή την περίπτωση τα μακροφάγα και τα προϊόντα τους TNF- α και IL-1 β παίζουν κυρίαρχο ρόλο τόσο στην έναρξη και τη διαιώνιση της φλεγμονής όσο και στην πρόκληση της αρθρικής καταστροφής (Firestein, 2003). Η έρευνά μας απέδειξε ότι σε ένα τέτοιο πλαίσιο στείρας φλεγμονής, η IL-27 έχει ισχυρότερες αντιφλεγμονώδεις δράσεις καθώς, εκτός από την γνωστή ισχυρή αναστολή των Th17 λεμφοκυττάρων, αναστέλλει και τη φλεγμονώδη ενεργοποίηση των μακροφάγων από τον TNF- α και την IL-1 β .

Η κυτταροκίνη με την ισχυρότερη ίσως αντιφλεγμονώδη δράση είναι η IL-10 (Moore et al., 2001). Στα πλαίσια μιας λοίμωξης, όταν τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα διεγερθούν με TLR-ligands παράγουν από τη μια μεριά προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (όπως TNF- α , IL-1 β και IL-6) και από την άλλη παράγουν IL-10, που προσπαθεί να περιορίσει την ένταση και τη διάρκεια της φλεγμονής (Hu et al., 2008b; Hu et al., 2006). Έτσι η IL-10 είναι ένας σημαντικός

αντιρροπιστικός μηχανισμός (feed-back), που ρυθμίζει την απάντηση των μονοκυττάρων και μακροφάγων στους TLR-ligands. Ο TNF- α είναι ένα άλλο ισχυρότατο φλεγμονώδες ερέθισμα για τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα το οποίο, σύμφωνα με τις παρατηρήσεις μας, ενώ δεν οδηγεί σε παραγωγή IL-10 προκαλεί την παραγωγή IL-27. Σε αυτό το πλαίσιο υποθέτουμε ότι η IL-27 λειτουργεί αντιρροπιστικά προσπαθώντας να περιορίσει τις φλεγμονώδεις δράσεις του TNF- α στα μονοκύτταρα και μακροφάγα.

5.4. Η IL-27 είναι ισχυρός αναστολέας της οστεοκλαστογένεσης

Η IL-27 έρχεται να προστεθεί στη λίστα των κυτταροκινών που ενεργοποιούν το βιοχημικό μονοπάτι ενδοκυττάριας σηματοδότησης Jak-STAT και ταυτόχρονα αναστέλλουν την οστεοκλαστογένεση. Σε αυτή τη λίστα συμπεριλαμβάνονται οι ιντερφερόνες (κυρίως IFN-β και IFN-γ) (Takayanagi et al., 2002b; Takayanagi et al., 2002c; Takayanagi et al., 2000), η IL-4 (Bendixen et al., 2001; Moreno et al., 2003) και η IL-10 (Evans and Fox, 2007). Όπως έχουμε δείξει στην αρχή της έρευνάς μας, η IL-27 παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με την IFN-γ, με κυριότερη την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα STAT-1 και την επαγωγή γονιδίων στόχων του STAT-1. Έχει είδη αναδειχθεί από άλλες ερευνητικές ομάδες η σημασία του STAT-1 στην αναστολή της οστεοκλαστογένεσης από την IFN-β και την IFN-γ (Takayanagi et al., 2002c; Takayanagi et al., 2005). Σε αυτό το πλαίσιο είναι πιθανό η IL-27 και οι ιντερφερόνες να χρησιμοποιούν παρόμοιο μηχανισμό για να αποτρέψουν τη δημιουργία οστεοκλαστών. Έχει προταθεί στο παρελθόν ότι η IFN-γ αναστέλλει την οστεοκλαστογένεση επάγοντας την πρωτεολυτική διάσπαση του TRAF-6 από το πρωτεάσωμα (proteasome degradation) (Takayanagi et al., 2000). Αξίζει όμως να σημειωθεί ότι στο σύστημά μας δεν διαπιστώσαμε κάτι τέτοιο καθώς η IL-27 δεν επηρέασε τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης TRAF-6 στους προ-οστεοκλάστες.

Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις μας η IL-27 είναι ένας ισχυρός αναστολέας της οστεοκλαστογένεσης δρώντας απευθείας στους προ-οστεοκλάστες. Ένας μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνει αυτό το αποτέλεσμα είναι η μερική ελάττωση της έκφρασης του υποδοχέα RANK στην επιφάνεια των προ-οστεοκλαστών. Αυτή η μερική αναστολή του RANK μπορεί να ερμηνεύσει τουλάχιστον ένα μέρος της παρατηρούμενης αδυναμίας του RANKL να ενεργοποιήσει τα βιοχημικά μονοπάτια ενδοκυττάριας σηματοδότησης p38, Erk και NFκ-B, να επάγει την

έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα c-jun και τελικά να επάγει την οστεοκλαστογένεση. Πάντως μια μερική αναστολή της έκφρασης του RANK μπορεί να έχει σημαντικές λειτουργικές συνέπειες σε συνθήκες σαν και αυτές που επικρατούν στο μικροπεριβάλλον του αρθρικού υμένα ασθενών με ΡΑ, όπου η οστεοκλαστογένεση καθοδηγείται από χαμηλά επίπεδα RANKL (Gravallese et al., 2000; Pettit et al., 2006). Στη Ρευματοειδή Αρθρίτιδα, και παρά την χαμηλή του έκφραση, ο RANKL παίζει καθοριστικό ρόλο, όπως αποδεικνύεται από την αποτελεσματικότητα του denosumab (μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του RANKL) στην αναστολή της αρθρικής καταστροφής (Cohen et al., 2008).

Το γεγονός ότι ενώ η αναστολή της έκφρασης του RANK είναι μερική, η αναστολή των βιοχημικών σημάτων και της οστεοκλαστογένεσης είναι σχεδόν πλήρης, ίσως υποδηλώνει ότι η IL-27 επιδρά και σε άλλους στόχους πέραν του RANK. Σε αυτό το πλαίσιο η ισχυρή αναστολή από την IL-27 του συν-διεγερτικού υποδοχέα TREM-2 είναι κατά τη γνώμη μας πολύ σημαντική. Όπως αναλύθηκε εκτενώς στην *Εισαγωγή*, για να ευοδωθεί η διαφοροποίηση των προ-οστεοκλαστών σε ώριμους και λειτουργικούς οστεοκλάστες απαιτείται, εκτός από το διεγερτικό σήμα που παρέχει ο υποδοχέας RANK, και ένα δεύτερο συν-διεγερτικό σήμα που παρέχουν κάποιοι υποδοχείς μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνεται και ο υποδοχέας TREM-2 (Colonna et al., 2007). Αν και δεν είναι ακόμη γνωστός ο συνδέτης (ligand) του TREM-2, ο καθοριστικός ρόλος του στην ανθρώπινη οστεοκλαστογένεση έχει αποδειχθεί πρόσφατα. Ορισμένες μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί το TREM-2 (loss of function mutations) οδηγούν σε μια κατάσταση που χαρακτηρίζεται από άνοια και οστικές κύστες και είναι γνωστή ως νόσος Nasu-Hakola (Paloneva et al., 2002). Όταν χρησιμοποιήθηκαν μονοκύτταρα ασθενών με τη νόσο Nasu-Hakola ως προ-οστεοκλάστες, παρατηρήθηκε *in vitro* πολύ σοβαρή αδυναμία σχηματισμού λειτουργικών οστεοκλαστών (Cella et al., 2003; Paloneva et al., 2003), αποδεικνύοντας τον

καθοριστικό ρόλο του TREM-2 στην ανθρώπινη οστεοκλαστογένεση. Επιπλέον, πολύ πρόσφατα το εργαστήριό μας έδειξε ότι η IL-10, μια άλλη κυτταροκίνη που ενεργοποιεί το μονοπάτι Jak-STAT, αναστέλλει την οστεοκλαστογένεση καταστέλλοντας την έκφραση του TREM-2 στους προ-οστεοκλάστες (Park-Min et al., 2009).

Η παρατηρούμενη αναστολή της επαγωγής του NFATc1 στο σύστημά μας θεωρούμε ότι είναι το τελικό αποτέλεσμα της συνδυασμένης αναστολής τόσο του RANK όσο και του TREM-2 από την IL-27. Ο μεταγραφικός παράγοντας NFATc1 είναι ένα μόριο κλειδί (master regulator) στην διαδικασία της οστεοκλαστογένεσης (Takayanagi, 2007b). Το βιοχημικό μονοπάτι που ελέγχει την ενεργοποίηση και επαγωγή του NFATc1 περιλαμβάνει έναν καταρράκτη βιοχημικών γεγονότων, που οδηγεί στην αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου και την ενεργοποίηση μιας φωσφατάσης που ονομάζεται καλσινευρίνη (Negishi-Koga and Takayanagi, 2009; Stern, 2006). Για την επαρκή ενεργοποίηση αυτού του μονοπατιού απαιτούνται τόσο διεγερτικά σήματα προερχόμενα τον υποδοχέα RANK όσο και συν-διεγερτικά σήματα από το TREM-2 (Humphrey et al., 2006; Koga et al., 2004). Η ταυτόχρονη ελάττωση της έκφρασης των RANK και TREM-2 από την IL-27 πιστεύουμε ότι αναχαίτησε την παραγωγή των κατάλληλων διεγερτικών και συν-διεγερτικών σημάτων που απαιτούνται για την επαγωγή του NFATc1 και την ευόδωση της οστεοκλαστογένεσης. Στο σύστημά μας η ένταση της αναστολής της οστεοκλαστογένεσης από την IL-27 συμβαδίζει με την ένταση της αναστολής της επαγωγής του NFATc1.

Εκτός από την απευθείας δράση της στους προ-οστεοκλάστες που μόλις περιγάψαμε, η IL-27 μπορεί ενδεχομένως να αποτρέπει την οστεοκλαστογένεση και έμμεσα, δηλαδή δρώντας σε άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς που εμπλέκονται στην δημιουργία των οστεοκλαστών. Έχει αναφερθεί ότι η IL-27 ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα STAT-3 στους οστεοβλάστες, αλλά το αποτέλεσμα αυτής της ενεργοποίησης παραμένει αδιευκρίνιστο (Kamiya et al., 2007).

Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η IL-27 επιδρώντας στα T-λεμφοκύτταρα αναστέλλει *in vitro* την δημιουργία οστεοκλαστών με άγνωστο μηχανισμό (Chen et al., 2008). Μια άλλη ερευνητική ομάδα έχει περιγράψει ότι σε ένα μοντέλο αυτοάνοσης αρθρίτιδας σε τρωκτικά, ο κατεξοχήν οστεοκλαστογόνος πληθυσμός λεμφοκυττάρων είναι τα Th17 (Sato et al., 2006). Αν αυτό είναι αληθές, είναι λογικό να υποθέσουμε ότι η IL-27, που είναι ένας ισχυρότατος αναστολέας των Th17 λεμφοκυττάρων, μπορεί να περιορίσει έμμεσα την οστεοκλαστογένεση σε μοντέλα αρθρίτιδας στα οποία πρωταγωνιστούν τα Th17.

5.5. Η IL-27 ως μελλοντική θεραπεία για τη Ρευματοειδή Αρθρίτιδα: προσδοκίες, προβλήματα και προοπτικές

Παρά τις σημαντικές προόδους την τελευταία δεκαετία στην αντιμετώπιση της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας, περίπου το 1/3 των ασθενών δεν ανταποκρίνονται επαρκώς στις υπάρχουσες θεραπείες (Singh et al., 2009; Yazici, 2009). Αυτό καθιστά επιτακτική την ανάγκη ανεύρεσης νέων θεραπευτικών στρατηγικών, που θα συνεκτιμούν την ετερογένεια της νόσου και την ανάγκη έγκαιρης αναχαίτισης της χρόνιας φλεγμονής και των οστικών διαβρώσεων. Οι ιδιότητες της IL-27 να αναστέλλει 1) τα Th1 και Th17 λεμφοκύτταρα, 2) τις φλεγμονώδεις κυτταροκίνες TNF- α και IL-1 β και 3) την οστεοκλαστογένεση, την καθιστούν υποψήφιο θεραπευτικό μέσο για τη Ρευματοειδή Αρθρίτιδα. Είναι πολύ ελκυστική η προοπτική της χορήγησης ενός παράγοντα με τις θεραπευτικές δυνατότητες της IL-27, που να στοχεύει ταυτόχρονα την χρόνια φλεγμονή και την οστική καταστροφή. Όμως σε ένα τέτοιο ενδεχόμενο υπάρχουν προς το παρόν κάποιες δυσκολίες και σημαντικές επιφυλάξεις.

Όπως δείξαμε, η κύρια δυσκολία έγκειται στο ότι το φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον της άρθρωσης καθιστά τα μακροφάγα ανθεκτικά στις δράσεις της IL-27. Στον φλεγμαίνοντα αρθρικό υμένα υπάρχουν ερεθίσματα, όπως η ενεργοποίηση του p38 (Schett et al., 2008), ο TNF- α και η IL-1 β (Feldmann et al., 2001), που αποδείξαμε ότι αναστέλλουν τις λειτουργίες της IL-27. Αυτές οι παρατηρήσεις μας δημιουργούν ερωτηματικά για την αποτελεσματικότητα της εξωγενώς χορηγούμενης IL-27 σε ασθενείς με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα. Στο παρελθόν τόσο η IL-10 όσο και η IFN- β χορηγήθηκαν σε κλινικές μελέτες με παρόμοια ελπιδοφόρες θεραπευτικές προοπτικές, στην πράξη όμως δεν επιβεβαίωσαν τις προσδοκίες (St Clair, 1999; St Clair, 2000; van Holten et al., 2005). Μια πιθανή εξήγηση για την αποτυχία τους είναι ότι φλεγμονώδη ερεθίσματα αναστέλλουν την ικανότητα των κυττάρων να απαντούν σε αντιφλεγμονώδεις παράγοντες. Ένας

τρόπος να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα είναι να αναγνωριστούν αυτά τα ερεθίσματα και να κατανοηθούν οι μηχανισμοί με τους οποίους προκαλούν την ανοχή στους αντιφλεγμονώδεις παράγοντες. Έτσι μπορεί στο μέλλον να γίνει εφικτό να στοχευτούν ειδικά αυτοί οι μηχανισμοί ώστε να ανακτήσουν τα κύτταρα την ικανότητά τους να αποκρίνονται στους ενδογενώς παραγόμενους και εξωγενώς χορηγούμενους αντιφλεγμονώδεις παράγοντες.

Η κύρια επιφύλαξη για τη χορήγηση της IL-27 σε ασθενείς με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα είναι το ζήτημα της ασφάλειας. Κατά πρώτον, η ισχυρή ανοσοκατασταλτική δράση της IL-27 μπορεί να προδιαθέσει σε λοιμώξεις. Η IL-27 καταστέλλει 1) τα Th1 κύτταρα που είναι σημαντικά για την αντιμετώπιση ενδοκυττάρων παθογόνων (Kaufmann, 1993), 2) τα Th2 κύτταρα, που παίζουν ρόλο στη χυμική ανοσία κατά ελμίνθων και παρασίτων (Mosmann and Coffman, 1989) και 3) τα Th17 κύτταρα, που συμβάλλουν στην άμυνα κατά βακτηρίων και μυκήτων (Curtis and Way, 2009). Κατά δεύτερον, η IL-27 εκτός από ισχυρό αντιφλεγμονώδες έχει και προφλεγμονώδεις δράσεις, που ίσως αποβούν επιζήμιες για κάποιους ασθενείς (Mensah-Brown et al., 2006; Villarino et al., 2008; Wang et al., 2008).

Όλα αυτά επιβάλλουν, πριν την οποιαδήποτε απόφαση για τη χορήγηση της IL-27 σε ασθενείς, να γίνει μια προσεκτική συνεκτίμηση των θεραπευτικών της προοπτικών από τη μια και των όποιων δυσκολιών και επιφυλάξεων από την άλλη.

6. Βιβλιογραφία

Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.

Amadi-Obi, A., Yu, C. R., Liu, X., Mahdi, R. M., Clarke, G. L., Nussenblatt, R. B., Gery, I., Lee, Y. S., and Egwuagu, C. E. (2007). TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat Med* 13, 711-718.

Anderson, D. M., Maraskovsky, E., Billingsley, W. L., Dougall, W. C., Tometsko, M. E., Roux, E. R., Teepe, M. C., DuBose, R. F., Cosman, D., and Galibert, L. (1997). A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390, 175-179.

Andreaskos, E., Sacre, S., Foxwell, B. M., and Feldmann, M. (2005). The toll-like receptor-nuclear factor kappaB pathway in rheumatoid arthritis. *Front Biosci* 10, 2478-2488.

Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Maggi, E., and Romagnani, S. (2009). Type 17 T helper cells-origins, features and possible roles in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol* 5, 325-331.

Asagiri, M., Sato, K., Usami, T., Ochi, S., Nishina, H., Yoshida, H., Morita, I., Wagner, E. F., Mak, T. W., Serfling, E., and Takayanagi, H. (2005). Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *J Exp Med* 202, 1261-1269.

Asquith, D. L., Miller, A. M., McInnes, I. B., and Liew, F. Y. (2009). Animal models of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 39, 2040-2044.

Athanasou, N. A., Quinn, J., Heryet, A., Puddle, B., Woods, C. G., and McGee, J. O. (1988). The immunohistology of synovial lining cells in normal and inflamed synovium. *J Pathol* 155, 133-142.

Awasthi, A., Carrier, Y., Peron, J. P., Bettelli, E., Kamanaka, M., Flavell, R. A., Kuchroo, V. K., Oukka, M., and Weiner, H. L. (2007). A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat Immunol* 8, 1380-1389.

Banchereau, J., and Pascual, V. (2006). Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Immunity* 25, 383-392.

Barton, A., Thomson, W., Ke, X., Eyre, S., Hinks, A., Bowes, J., Plant, D., Gibbons, L. J., Wilson, A. G., Bax, D. E., *et al.* (2008). Rheumatoid arthritis susceptibility loci at chromosomes 10p15, 12q13 and 22q13. *Nat Genet* 40, 1156-1159.

Barton, G. M., and Medzhitov, R. (2003). Toll-like receptor signaling pathways. *Science* 300, 1524-1525.
Batten, M., and Ghilardi, N. (2007). The biology and therapeutic potential of interleukin 27. *J Mol Med* 85, 661-672.

- Batten, M., Li, J., Yi, S., Kljavin, N. M., Danilenko, D. M., Lucas, S., Lee, J., de Sauvage, F. J., and Ghilardi, N. (2006). Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* 7, 929-936.
- Beebe, A. M., Cua, D. J., and de Waal Malefyt, R. (2002). The role of interleukin-10 in autoimmune disease: systemic lupus erythematosus (SLE) and multiple sclerosis (MS). *Cytokine Growth Factor Rev* 13, 403-412.
- Begovich, A. B., Carlton, V. E., Honigberg, L. A., Schrodi, S. J., Chokkalingam, A. P., Alexander, H. C., Ardlie, K. G., Huang, Q., Smith, A. M., Spoeke, J. M., *et al.* (2004). A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 75, 330-337.
- Bendixen, A. C., Shevde, N. K., Dienger, K. M., Willson, T. M., Funk, C. D., and Pike, J. W. (2001). IL-4 inhibits osteoclast formation through a direct action on osteoclast precursors via peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2443-2448.
- Berenbaum, F. (2008). New horizons and perspectives in the treatment of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 10 Suppl 2, S1.
- Boulanger, M. J., and Garcia, K. C. (2004). Shared cytokine signaling receptors: structural insights from the gp130 system. *Adv Protein Chem* 68, 107-146.
- Bowes, J., and Barton, A. (2008). Recent advances in the genetics of RA susceptibility. *Rheumatology (Oxford)* 47, 399-402.
- Boyle, W. J., Simonet, W. S., and Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423, 337-342.
- Bravo, J., and Heath, J. K. (2000). Receptor recognition by gp130 cytokines. *Embo J* 19, 2399-2411.
- Brennan, F. M., Chantry, D., Jackson, A., Maini, R., and Feldmann, M. (1989a). Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet* 2, 244-247.
- Brennan, F. M., Chantry, D., Jackson, A. M., Maini, R. N., and Feldmann, M. (1989b). Cytokine production in culture by cells isolated from the synovial membrane. *J Autoimmun* 2 Suppl, 177-186.
- Brennan, F. M., and McInnes, I. B. (2008). Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 118, 3537-3545.
- Brent, L. H. (2009). Inflammatory arthritis: an overview for primary care physicians. *Postgrad Med* 121, 148-162.
- Brentano, F., Kyburz, D., and Gay, S. (2009). Toll-like receptors and rheumatoid arthritis. *Methods Mol Biol* 517, 329-343.

- Brentano, F., Kyburz, D., Schorr, O., Gay, R., and Gay, S. (2005). The role of Toll-like receptor signalling in the pathogenesis of arthritis. *Cell Immunol* 233, 90-96.
- Bresnihan, B., Tak, P. P., Emery, P., Klareskog, L., and Breedveld, F. (2000). Synovial biopsy in arthritis research: five years of concerted European collaboration. *Ann Rheum Dis* 59, 506-511.
- Brown, K. D., Claudio, E., and Siebenlist, U. (2008). The roles of the classical and alternative nuclear factor-kappaB pathways: potential implications for autoimmunity and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 10, 212.
- Burger, D., Dayer, J. M., Palmer, G., and Gabay, C. (2006). Is IL-1 a good therapeutic target in the treatment of arthritis? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 20, 879-896.
- Cao, Y., Doodes, P. D., Glant, T. T., and Finnegan, A. (2008). IL-27 induces a Th1 immune response and susceptibility to experimental arthritis. *J Immunol* 180, 922-930.
- Carbia-Nagashima, A., and Arzt, E. (2004). Intracellular proteins and mechanisms involved in the control of gp130/JAK/STAT cytokine signaling. *IUBMB Life* 56, 83-88.
- Carl, J. W., and Bai, X. F. (2008). IL27: Its Roles in the Induction and Inhibition of Inflammation. *Int J Clin Exp Pathol* 1, 117-123.
- Cella, M., Buonsanti, C., Strader, C., Kondo, T., Salmaggi, A., and Colonna, M. (2003). Impaired differentiation of osteoclasts in TREM-2-deficient individuals. *J Exp Med* 198, 645-651.
- Chen, L., Wei, X. Q., Evans, B., Jiang, W., and Aeschlimann, D. (2008). IL-23 promotes osteoclast formation by up-regulation of receptor activator of NF-kappaB (RANK) expression in myeloid precursor cells. *Eur J Immunol* 38, 2845-2854.
- Chen, Q., Ghilardi, N., Wang, H., Baker, T., Xie, M. H., Gurney, A., Grewal, I. S., and de Sauvage, F. J. (2000). Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR. *Nature* 407, 916-920.
- Chiu, Y. H., Zhao, M., and Chen, Z. J. (2009). Ubiquitin in NF-kappaB signaling. *Chem Rev* 109, 1549-1560.
- Chow, D. C., Brevnova, L., He, X. L., Martick, M. M., Bankovich, A., and Garcia, K. C. (2002). A structural template for gp130-cytokine signaling assemblies. *Biochim Biophys Acta* 1592, 225-235.
- Choy, E. H., and Panayi, G. S. (2001). Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 344, 907-916.
- Chung, S. A., and Criswell, L. A. (2007). PTPN22: its role in SLE and autoimmunity. *Autoimmunity* 40, 582-590.

- Clark, W., Jobanputra, P., Barton, P., and Burls, A. (2004). The clinical and cost-effectiveness of anakinra for the treatment of rheumatoid arthritis in adults: a systematic review and economic analysis. *Health Technol Assess* 8, iii-iv, ix-x, 1-105.
- Coenen, M. J., and Gregersen, P. K. (2009). Rheumatoid arthritis: a view of the current genetic landscape. *Genes Immun* 10, 101-111.
- Coffman, R. L. (2006). Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective. *Nat Immunol* 7, 539-541.
- Coffman, R. L., and Carty, J. (1986). A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-gamma. *J Immunol* 136, 949-954.
- Cohen, S. B., Dore, R. K., Lane, N. E., Ory, P. A., Peterfy, C. G., Sharp, J. T., van der Heijde, D., Zhou, L., Tsuji, W., and Newmark, R. (2008). Denosumab treatment effects on structural damage, bone mineral density, and bone turnover in rheumatoid arthritis: a twelve-month, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II clinical trial. *Arthritis Rheum* 58, 1299-1309.
- Colgan, J., and Rothman, P. (2006). All in the family: IL-27 suppression of T(H)-17 cells. *Nat Immunol* 7, 899-901.
- Collison, L. W., and Vignali, D. A. (2008). Interleukin-35: odd one out or part of the family? *Immunol Rev* 226, 248-262.
- Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R. S., and Vignali, D. A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450, 566-569.
- Colonna, M., Turnbull, I., and Klesney-Tait, J. (2007). The enigmatic function of TREM-2 in osteoclastogenesis. *Adv Exp Med Biol* 602, 97-105.
- Costenbader, K. H., and Karlson, E. W. (2006). Cigarette smoking and autoimmune disease: what can we learn from epidemiology? *Lupus* 15, 737-745.
- Coulomb-L'Hermine, A., Larousserie, F., Pflanz, S., Bardel, E., Kastelein, R. A., and Devergne, O. (2007). Expression of interleukin-27 by human trophoblast cells. *Placenta* 28, 1133-1140.
- Curtis, M. M., and Way, S. S. (2009). Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology* 126, 177-185.
- Daoussis, D., Andonopoulos, A. P., and Liossis, S. N. (2008). Wnt Pathway and IL-17: Novel Regulators of Joint Remodeling in Rheumatic Diseases. Looking Beyond the RANK-RANKL-OPG Axis. *Semin Arthritis Rheum*.
- Darnell, J. E., Jr. (1997). STATs and gene regulation. *Science* 277, 1630-1635.

- Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M., and Stark, G. R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264, 1415-1421.
- Davidson, A., and Diamond, B. (2001). Autoimmune diseases. *N Engl J Med* 345, 340-350.
- Day, C. J., Kim, M. S., Lopez, C. M., Nicholson, G. C., and Morrison, N. A. (2005). NFAT expression in human osteoclasts. *J Cell Biochem* 95, 17-23.
- Dayer, J. M. (2002). Evidence for the biological modulation of IL-1 activity: the role of IL-1Ra. *Clin Exp Rheumatol* 20, S14-20.
- Dayer, J. M. (2003). The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 42 Suppl 2, ii3-10.
- de Vries, R. R., Huizinga, T. W., and Toes, R. E. (2006). HLA and RA revisited: citrullinated food for the SE hypothesis, the DR6 effect, and NIMA. *Hum Immunol* 67, 454-459.
- Devergne, O., Hummel, M., Koeppen, H., Le Beau, M. M., Nathanson, E. C., Kieff, E., and Birkenbach, M. (1996). A novel interleukin-12 p40-related protein induced by latent Epstein-Barr virus infection in B lymphocytes. *J Virol* 70, 1143-1153.
- Dinarello, C. A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87, 2095-2147.
- Dinarello, C. A. (2002). The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol* 20, S1-13.
- Dinarello, C. A. (2007). Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol* 37 Suppl 1, S34-45.
- Dinarello, C. A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 27, 519-550.
- Diveu, C., McGeachy, M. J., Boniface, K., Stumhofer, J. S., Sathe, M., Joyce-Shaikh, B., Chen, Y., Tato, C. M., McClanahan, T. K., de Waal Malefyt, R., *et al.* (2009). IL-27 blocks RORc expression to inhibit lineage commitment of Th17 cells. *J Immunol* 182, 5748-5756.
- Dubin, P. J., and Kolls, J. K. (2008). Th17 cytokines and mucosal immunity. *Immunol Rev* 226, 160-171.
- El Kasmi, K. C., Holst, J., Coffre, M., Mielke, L., de Pauw, A., Lhocine, N., Smith, A. M., Rutschman, R., Kaushal, D., Shen, Y., *et al.* (2006). General nature of the STAT3-activated anti-inflammatory response. *J Immunol* 177, 7880-7888.
- Elliott, M. J., Maini, R. N., Feldmann, M., Kalden, J. R., Antoni, C., Smolen, J. S., Leeb, B., Breedveld, F. C., Macfarlane, J. D., Bijl, H., and *et al.* (1994). Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* 344, 1105-1110.

- Elliott, M. J., Maini, R. N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Charles, P., Katsikis, P., Brennan, F. M., Walker, J., Bijl, H., Ghrayeb, J., and et al. (1993). Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum* 36, 1681-1690.
- Ernst, M., and Jenkins, B. J. (2004). Acquiring signalling specificity from the cytokine receptor gp130. *Trends Genet* 20, 23-32.
- Evans, K. E., and Fox, S. W. (2007). Interleukin-10 inhibits osteoclastogenesis by reducing NFATc1 expression and preventing its translocation to the nucleus. *BMC Cell Biol* 8, 4.
- Feldmann, M. (2008). Many cytokines are very useful therapeutic targets in disease. *J Clin Invest* 118, 3533-3536.
- Feldmann, M. (2009). Translating molecular insights in autoimmunity into effective therapy. *Annu Rev Immunol* 27, 1-27.
- Feldmann, M., Brennan, F. M., Foxwell, B. M., and Maini, R. N. (2001). The role of TNF alpha and IL-1 in rheumatoid arthritis. *Curr Dir Autoimmun* 3, 188-199.
- Feldmann, M., and Maini, R. N. (2002). Discovery of TNF-alpha as a therapeutic target in rheumatoid arthritis: preclinical and clinical studies. *Joint Bone Spine* 69, 12-18.
- Feldmann, M., and Maini, S. R. (2008). Role of cytokines in rheumatoid arthritis: an education in pathophysiology and therapeutics. *Immunol Rev* 223, 7-19.
- Feng, X. M., Liu, N., Yang, S. G., Hu, L. Y., Chen, X. L., Fang, Z. H., Ren, Q., Lu, S. H., Liu, B., and Han, Z. C. (2008). Regulation of the class II and class I MHC pathways in human THP-1 monocytic cells by interleukin-27. *Biochem Biophys Res Commun* 367, 553-559.
- Fernando, M. M., Stevens, C. R., Walsh, E. C., De Jager, P. L., Goyette, P., Plenge, R. M., Vyse, T. J., and Rioux, J. D. (2008). Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis. *PLoS Genet* 4, e1000024.
- Firestein, G. S. (2003). Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423, 356-361.
- Firestein, G. S. (2007). Biomedicine. Every joint has a silver lining. *Science* 315, 952-953.
- Firestein, G. S. (2009). Rheumatoid arthritis in a mouse? *Nat Clin Pract Rheumatol* 5, 1.
- Firestein, G. S., Alvaro-Gracia, J. M., and Maki, R. (1990). Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 144, 3347-3353.
- Firestein, G. S., and Zvaifler, N. J. (1987). Peripheral blood and synovial fluid monocyte activation in inflammatory arthritis. II. Low levels of synovial fluid and synovial tissue interferon suggest that gamma-interferon is not the primary macrophage activating factor. *Arthritis Rheum* 30, 864-871.

- Firestein, G. S., and Zvaifler, N. J. (2002). How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis?: II. T cell-independent mechanisms from beginning to end. *Arthritis Rheum* 46, 298-308.
- Fischer, P., Lehmann, U., Sobota, R. M., Schmitz, J., Niemand, C., Linnemann, S., Haan, S., Behrmann, I., Yoshimura, A., Johnston, J. A., *et al.* (2004). The role of the inhibitors of interleukin-6 signal transduction SHP2 and SOCS3 for desensitization of interleukin-6 signalling. *Biochem J* 378, 449-460.
- Fitzgerald, D. C., Ciric, B., Touil, T., Harle, H., Grammatikopolou, J., Das Sarma, J., Gran, B., Zhang, G. X., and Rostami, A. (2007a). Suppressive effect of IL-27 on encephalitogenic Th17 cells and the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 179, 3268-3275.
- Fitzgerald, D. C., Zhang, G. X., El-Behi, M., Fonseca-Kelly, Z., Li, H., Yu, S., Saris, C. J., Gran, B., Ciric, B., and Rostami, A. (2007b). Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells. *Nat Immunol* 8, 1372-1379.
- Fukada, T., Yoshida, Y., Nishida, K., Ohtani, T., Shirogane, T., Hibi, M., and Hirano, T. (1999). Signaling through Gp130: toward a general scenario of cytokine action. *Growth Factors* 17, 81-91.
- Furuzawa-Carballeda, J., Vargas-Rojas, M. I., and Cabral, A. R. (2007). Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. *Autoimmun Rev* 6, 169-175.
- Gabay, C., and McInnes, I. B. (2009). The biological and clinical importance of the 'new generation' cytokines in rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 11, 230.
- Gabriel, S. E. (2001). The epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 27, 269-281.
- Gaffen, S. L. (2009). Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol* 9, 556-567.
- Galibert, L., Tometsko, M. E., Anderson, D. M., Cosman, D., and Dougall, W. C. (1998). The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF-kappaB, a member of the TNFR superfamily. *J Biol Chem* 273, 34120-34127.
- Gee, K., Guzzo, C., Che Mat, N. F., Ma, W., and Kumar, A. (2009). The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflamm Allergy Drug Targets* 8, 40-52.
- Gohda, J., Akiyama, T., Koga, T., Takayanagi, H., Tanaka, S., and Inoue, J. (2005). RANK-mediated amplification of TRAF6 signaling leads to NFATc1 induction during osteoclastogenesis. *Embo J* 24, 790-799.
- Goldberg, R., Wildbaum, G., Zohar, Y., Maor, G., and Karin, N. (2004). Suppression of ongoing adjuvant-induced arthritis by neutralizing the function of the p28 subunit of IL-27. *J Immunol* 173, 1171-1178.
- Goldring, M. B., and Goldring, S. R. (2007). Osteoarthritis. *J Cell Physiol* 213, 626-634.
- Goriely, S., Neurath, M. F., and Goldman, M. (2008). How microorganisms tip the balance between interleukin-12 family members. *Nat Rev Immunol* 8, 81-86.

- Gorman, J. D., and Criswell, L. A. (2002). The shared epitope and severity of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 28, 59-78.
- Grassi, W., De Angelis, R., Lamanna, G., and Cervini, C. (1998). The clinical features of rheumatoid arthritis. *Eur J Radiol* 27 *Suppl 1*, S18-24.
- Graudal, N. (2004). The natural history and prognosis of rheumatoid arthritis: association of radiographic outcome with process variables, joint motion and immune proteins. *Scand J Rheumatol Suppl*, 1-38.
- Gravallese, E. M., Harada, Y., Wang, J. T., Gorn, A. H., Thornhill, T. S., and Goldring, S. R. (1998). Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* 152, 943-951.
- Gravallese, E. M., Manning, C., Tsay, A., Naito, A., Pan, C., Amento, E., and Goldring, S. R. (2000). Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum* 43, 250-258.
- Gregersen, P. K., and Olsson, L. M. (2009). Recent advances in the genetics of autoimmune disease. *Annu Rev Immunol* 27, 363-391.
- Haddad, J. J. (2002). Cytokines and related receptor-mediated signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 297, 700-713.
- Halverson, P. B. (1995). Extraarticular manifestations of rheumatoid arthritis. *Orthop Nurs* 14, 47-50.
- Hamilton, J. A. (1983). Hypothesis: in vitro evidence for the invasive and tumor-like properties of the rheumatoid pannus. *J Rheumatol* 10, 845-851.
- Harel, M., and Shoenfeld, Y. (2006). Predicting and preventing autoimmunity, myth or reality? *Ann N Y Acad Sci* 1069, 322-345.
- Haworth, C., Brennan, F. M., Chantry, D., Turner, M., Maini, R. N., and Feldmann, M. (1991). Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid arthritis: regulation by tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Immunol* 21, 2575-2579.
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F., and Graeve, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334 (Pt 2), 297-314.
- Helming, L., and Gordon, S. (2007). The molecular basis of macrophage fusion. *Immunobiology* 212, 785-793.
- Herrero, C., Hu, X., Li, W. P., Samuels, S., Sharif, M. N., Kotenko, S., and Ivashkiv, L. B. (2003). Reprogramming of IL-10 activity and signaling by IFN-gamma. *J Immunol* 171, 5034-5041.

- Hibbert, L., Pflanz, S., De Waal Malefyt, R., and Kastelein, R. A. (2003). IL-27 and IFN- α signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12R β 2 in naive T cells. *J Interferon Cytokine Res* 23, 513-522.
- Hideshima, T., Podar, K., Chauhan, D., and Anderson, K. C. (2005). Cytokines and signal transduction. *Best Pract Res Clin Haematol* 18, 509-524.
- Hitchon, C. A., and el-Gabalawy, H. S. (2003). The histopathology of early synovitis. *Clin Exp Rheumatol* 21, S28-36.
- Ho, H. H., and Ivashkiv, L. B. (2006). Role of STAT3 in type I interferon responses. Negative regulation of STAT1-dependent inflammatory gene activation. *J Biol Chem* 281, 14111-14118.
- Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J., and Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 17, 2205-2232.
- Hu, X., Chakravarty, S. D., and Ivashkiv, L. B. (2008a). Regulation of interferon and Toll-like receptor signaling during macrophage activation by opposing feedforward and feedback inhibition mechanisms. *Immunol Rev* 226, 41-56.
- Hu, X., Chung, A. Y., Wu, I., Foldi, J., Chen, J., Ji, J. D., Tateya, T., Kang, Y. J., Han, J., Gessler, M., *et al.* (2008b). Integrated regulation of Toll-like receptor responses by Notch and interferon- γ pathways. *Immunity* 29, 691-703.
- Hu, X., Herrero, C., Li, W. P., Antoniv, T. T., Falck-Pedersen, E., Koch, A. E., Woods, J. M., Haines, G. K., and Ivashkiv, L. B. (2002). Sensitization of IFN- γ Jak-STAT signaling during macrophage activation. *Nat Immunol* 3, 859-866.
- Hu, X., Ho, H. H., Lou, O., Hidaka, C., and Ivashkiv, L. B. (2005). Homeostatic role of interferons conferred by inhibition of IL-1-mediated inflammation and tissue destruction. *J Immunol* 175, 131-138.
- Hu, X., Paik, P. K., Chen, J., Yamilina, A., Kockeritz, L., Lu, T. T., Woodgett, J. R., and Ivashkiv, L. B. (2006). IFN- γ suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. *Immunity* 24, 563-574.
- Huang, Q., Ma, Y., Adebayo, A., and Pope, R. M. (2007). Increased macrophage activation mediated through toll-like receptors in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 56, 2192-2201.
- Huang, Q. Q., Sobkoviak, R., Jockheck-Clark, A. R., Shi, B., Mandelin, A. M., 2nd, Tak, P. P., Haines, G. K., 3rd, Nicchitta, C. V., and Pope, R. M. (2009). Heat shock protein 96 is elevated in rheumatoid arthritis and activates macrophages primarily via TLR2 signaling. *J Immunol* 182, 4965-4973.
- Huber, M., Steinwald, V., Guralnik, A., Brustle, A., Kleemann, P., Rosenplanter, C., Decker, T., and Lohoff, M. (2008). IL-27 inhibits the development of regulatory T cells via STAT3. *Int Immunol* 20, 223-234.

- Humphrey, M. B., Daws, M. R., Spusta, S. C., Niemi, E. C., Torchia, J. A., Lanier, L. L., Seaman, W. E., and Nakamura, M. C. (2006). TREM2, a DAP12-associated receptor, regulates osteoclast differentiation and function. *J Bone Miner Res* 21, 237-245.
- Hunter, C. A. (2005). New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol* 5, 521-531.
- Hunter, C. A., Villarino, A., Artis, D., and Scott, P. (2004). The role of IL-27 in the development of T-cell responses during parasitic infections. *Immunol Rev* 202, 106-114.
- Ikeda, F., Nishimura, R., Matsubara, T., Tanaka, S., Inoue, J., Reddy, S. V., Hata, K., Yamashita, K., Hiraga, T., Watanabe, T., *et al.* (2004). Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation. *J Clin Invest* 114, 475-484.
- Ishida, N., Hayashi, K., Hoshijima, M., Ogawa, T., Koga, S., Miyatake, Y., Kumegawa, M., Kimura, T., and Takeya, T. (2002). Large scale gene expression analysis of osteoclastogenesis in vitro and elucidation of NFAT2 as a key regulator. *J Biol Chem* 277, 41147-41156.
- Ishii, M., Egen, J. G., Klauschen, F., Meier-Schellersheim, M., Saeki, Y., Vacher, J., Proia, R. L., and Germain, R. N. (2009). Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature* 458, 524-528.
- Ivanov, II, Zhou, L., and Littman, D. R. (2007). Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Semin Immunol* 19, 409-417.
- Ivashkiv, L. B. (2009). Cross-regulation of signaling by ITAM-associated receptors. *Nat Immunol* 10, 340-347.
- Ivashkiv, L. B., and Hu, X. (2003). The JAK/STAT pathway in rheumatoid arthritis: pathogenic or protective? *Arthritis Rheum* 48, 2092-2096.
- Ivashkiv, L. B., and Hu, X. (2004). Signaling by STATs. *Arthritis Res Ther* 6, 159-168.
- Iwanaga, T., Shikichi, M., Kitamura, H., Yanase, H., and Nozawa-Inoue, K. (2000). Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch Histol Cytol* 63, 17-31.
- Janeway, C. A., Jr., and Medzhitov, R. (1998). Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin Immunol* 10, 349-350.
- Kamimura, D., Ishihara, K., and Hirano, T. (2003). IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 149, 1-38.
- Kamiya, S., Nakamura, C., Fukawa, T., Ono, K., Ohwaki, T., Yoshimoto, T., and Wada, S. (2007). Effects of IL-23 and IL-27 on osteoblasts and osteoclasts: inhibitory effects on osteoclast differentiation. *J Bone Miner Metab* 25, 277-285.

- Kamiya, S., Owaki, T., Morishima, N., Fukai, F., Mizuguchi, J., and Yoshimoto, T. (2004). An indispensable role for STAT1 in IL-27-induced T-bet expression but not proliferation of naive CD4⁺ T cells. *J Immunol* 173, 3871-3877.
- Kanazawa, K., and Kudo, A. (2005). TRAF2 is essential for TNF-alpha-induced osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res* 20, 840-847.
- Kaplan, M. J. (2009). Management of cardiovascular disease risk in chronic inflammatory disorders. *Nat Rev Rheumatol* 5, 208-217.
- Kastelein, R. A., Hunter, C. A., and Cua, D. J. (2007). Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol* 25, 221-242.
- Kaufmann, S. H. (1993). Immunity to intracellular bacteria. *Annu Rev Immunol* 11, 129-163.
- Keffer, J., Probert, L., Cazlaris, H., Georgopoulos, S., Kaslari, E., Kioussis, D., and Kollias, G. (1991). Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *Embo J* 10, 4025-4031.
- Kelso, A. (2000). Cytokines and their receptors: an overview. *Ther Drug Monit* 22, 40-43.
- Klareskog, L., Padyukov, L., Lorentzen, J., and Alfredsson, L. (2006a). Mechanisms of disease: Genetic susceptibility and environmental triggers in the development of rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2, 425-433.
- Klareskog, L., Padyukov, L., Ronnelid, J., and Alfredsson, L. (2006b). Genes, environment and immunity in the development of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Immunol* 18, 650-655.
- Kobayashi, K., Takahashi, N., Jimi, E., Udagawa, N., Takami, M., Kotake, S., Nakagawa, N., Kinoshita, M., Yamaguchi, K., Shima, N., *et al.* (2000). Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med* 191, 275-286.
- Kobayashi, N., Kadono, Y., Naito, A., Matsumoto, K., Yamamoto, T., Tanaka, S., and Inoue, J. (2001). Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis. *Embo J* 20, 1271-1280.
- Kobayashi, S., Ikari, K., Kaneko, H., Kochi, Y., Yamamoto, K., Shimane, K., Nakamura, Y., Toyama, Y., Mochizuki, T., Tsukahara, S., *et al.* (2008a). Association of STAT4 with susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in the Japanese population. *Arthritis Rheum* 58, 1940-1946.
- Kobayashi, S., Momohara, S., Kamatani, N., and Okamoto, H. (2008b). Molecular aspects of rheumatoid arthritis: role of environmental factors. *Febs J* 275, 4456-4462.
- Kochi, Y., Suzuki, A., Yamada, R., and Yamamoto, K. (2009). Genetics of rheumatoid arthritis: underlying evidence of ethnic differences. *J Autoimmun* 32, 158-162.

- Koga, T., Inui, M., Inoue, K., Kim, S., Suematsu, A., Kobayashi, E., Iwata, T., Ohnishi, H., Matozaki, T., Kodama, T., *et al.* (2004). Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature* 428, 758-763.
- Koga, T., Matsui, Y., Asagiri, M., Kodama, T., de Crombrughe, B., Nakashima, K., and Takayanagi, H. (2005). NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nat Med* 11, 880-885.
- Kolls, J. K., and Linden, A. (2004). Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21, 467-476.
- Kruthof, E., Baeten, D., De Rycke, L., Vandooren, B., Foell, D., Roth, J., Canete, J. D., Boots, A. M., Veys, E. M., and De Keyser, F. (2005). Synovial histopathology of psoriatic arthritis, both oligo- and polyarticular, resembles spondyloarthritis more than it does rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 7, R569-580.
- Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2009). Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 388, 621-625.
- Kurth, I., Horsten, U., Pflanz, S., Timmermann, A., Kuster, A., Dahmen, H., Tacke, I., Heinrich, P. C., and Muller-Newen, G. (2000). Importance of the membrane-proximal extracellular domains for activation of the signal transducer glycoprotein 130. *J Immunol* 164, 273-282.
- Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H. L., Kelley, M. J., Dunstan, C. R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., *et al.* (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93, 165-176.
- Lang, R. (2005). Tuning of macrophage responses by Stat3-inducing cytokines: molecular mechanisms and consequences in infection. *Immunobiology* 210, 63-76.
- Larousserie, F., Pflanz, S., Coulomb-L'Hermine, A., Brousse, N., Kastelein, R., and Devergne, O. (2004). Expression of IL-27 in human Th1-associated granulomatous diseases. *J Pathol* 202, 164-171.
- Lee, D. M., Kiener, H. P., Agarwal, S. K., Noss, E. H., Watts, G. F., Chisaka, O., Takeichi, M., and Brenner, M. B. (2007). Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. *Science* 315, 1006-1010.
- Lee, S. K., Goldring, S. R., and Lorenzo, J. A. (1995). Expression of the calcitonin receptor in bone marrow cell cultures and in bone: a specific marker of the differentiated osteoclast that is regulated by calcitonin. *Endocrinology* 136, 4572-4581.
- Leibbrandt, A., and Penninger, J. M. (2009). RANKL/RANK as key factors for osteoclast development and bone loss in arthropathies. *Adv Exp Med Biol* 649, 100-113.
- Levy, D. E., and Darnell, J. E., Jr. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 651-662.

- Ling, P., Gately, M. K., Gubler, U., Stern, A. S., Lin, P., Hollfelder, K., Su, C., Pan, Y. C., and Hakimi, J. (1995). Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity. *J Immunol* 154, 116-127.
- Linn-Rasker, S. P., van der Helm-van Mil, A. H., van Gaalen, F. A., Kloppenburg, M., de Vries, R. R., le Cessie, S., Breedveld, F. C., Toes, R. E., and Huizinga, T. W. (2006). Smoking is a risk factor for anti-CCP antibodies only in rheumatoid arthritis patients who carry HLA-DRB1 shared epitope alleles. *Ann Rheum Dis* 65, 366-371.
- Lipsky, P. E. (2007). Why does rheumatoid arthritis involve the joints? *N Engl J Med* 356, 2419-2420.
- Lipsky, P. E., van der Heijde, D. M., St Clair, E. W., Furst, D. E., Breedveld, F. C., Kalden, J. R., Smolen, J. S., Weisman, M., Emery, P., Feldmann, M., *et al.* (2000). Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. *N Engl J Med* 343, 1594-1602.
- Liu, J., Guan, X., and Ma, X. (2007). Regulation of IL-27 p28 gene expression in macrophages through MyD88- and interferon-gamma-mediated pathways. *J Exp Med* 204, 141-152.
- Lleo, A., Battezzati, P. M., Selmi, C., Gershwin, M. E., and Podda, M. (2008). Is autoimmunity a matter of sex? *Autoimmun Rev* 7, 626-630.
- Lohr, J., Knoechel, B., and Abbas, A. K. (2006). Regulatory T cells in the periphery. *Immunol Rev* 212, 149-162.
- Lomaga, M. A., Yeh, W. C., Sarosi, I., Duncan, G. S., Furlonger, C., Ho, A., Morony, S., Capparelli, C., Van, G., Kaufman, S., *et al.* (1999). TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev* 13, 1015-1024.
- Lucas, S., Ghilardi, N., Li, J., and de Sauvage, F. J. (2003). IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4⁺ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15047-15052.
- Maini, R., St Clair, E. W., Breedveld, F., Furst, D., Kalden, J., Weisman, M., Smolen, J., Emery, P., Harriman, G., Feldmann, M., and Lipsky, P. (1999). Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. *Lancet* 354, 1932-1939.
- Marino, C., and McDonald, E. (1991). Osteoarthritis and rheumatoid arthritis in elderly patients. Differentiation and treatment. *Postgrad Med* 90, 237-243.
- Matsuo, K., and Irie, N. (2008). Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys* 473, 201-209.

- McInnes, I. B., and Schett, G. (2007). Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 7, 429-442.
- McKellar, G. E., McCarey, D. W., Sattar, N., and McInnes, I. B. (2009). Role for TNF in atherosclerosis? Lessons from autoimmune disease. *Nat Rev Cardiol* 6, 410-417.
- Medzhitov, R., and Janeway, C. A., Jr. (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91, 295-298.
- Medzhitov, R., and Janeway, C. A., Jr. (1998a). An ancient system of host defense. *Curr Opin Immunol* 10, 12-15.
- Medzhitov, R., and Janeway, C. A., Jr. (1998b). Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin Immunol* 10, 351-353.
- Medzhitov, R., and Janeway, C. A., Jr. (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296, 298-300.
- Mensah-Brown, E. P., Shahin, A., Al-Shamsi, M., and Lukic, M. L. (2006). New members of the interleukin-12 family of cytokines: IL-23 and IL-27 modulate autoimmune diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 1079, 157-160.
- Mertens, M., and Singh, J. A. (2009). Anakinra for rheumatoid arthritis: a systematic review. *J Rheumatol* 36, 1118-1125.
- Mills, K. H. (2004). Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* 4, 841-855.
- Miossec, P., Korn, T., and Kuchroo, V. K. (2009). Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 361, 888-898.
- Mizukami, J., Takaesu, G., Akatsuka, H., Sakurai, H., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., and Sakurai, N. (2002). Receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) activates TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase through a signaling complex containing RANK, TAB2, and TRAF6. *Mol Cell Biol* 22, 992-1000.
- Mjaavatten, M. D., Haugen, A. J., Helgetveit, K., Nygaard, H., Sidenvall, G., Uhlig, T., and Kvien, T. K. (2009). Pattern of joint involvement and other disease characteristics in 634 patients with arthritis of less than 16 weeks' duration. *J Rheumatol* 36, 1401-1406.
- Molle, C., Nguyen, M., Flamand, V., Renneson, J., Trottein, F., De Wit, D., Willems, F., Goldman, M., and Goriely, S. (2007). IL-27 synthesis induced by TLR ligation critically depends on IFN regulatory factor 3. *J Immunol* 178, 7607-7615.
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., and O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19, 683-765.

- Moreland, L. W., Schiff, M. H., Baumgartner, S. W., Tindall, E. A., Fleischmann, R. M., Bulpitt, K. J., Weaver, A. L., Keystone, E. C., Furst, D. E., Mease, P. J., *et al.* (1999). Etanercept therapy in rheumatoid arthritis. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 130, 478-486.
- Moreno, J. L., Kaczmarek, M., Keegan, A. D., and Tondravi, M. (2003). IL-4 suppresses osteoclast development and mature osteoclast function by a STAT6-dependent mechanism: irreversible inhibition of the differentiation program activated by RANKL. *Blood* 102, 1078-1086.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., and Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136, 2348-2357.
- Mosmann, T. R., and Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7, 145-173.
- Murakami, M., Kamimura, D., and Hirano, T. (2004). New IL-6 (gp130) family cytokine members, CLC/NNT1/BSF3 and IL-27. *Growth Factors* 22, 75-77.
- Murray, P. J. (2007). The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol* 178, 2623-2629.
- Narvaez, J. A., Narvaez, J., Serrallonga, M., De Lama, E., de Albert, M., Mast, R., and Nolla, J. M. (2008). Cervical spine involvement in rheumatoid arthritis: correlation between neurological manifestations and magnetic resonance imaging findings. *Rheumatology (Oxford)* 47, 1814-1819.
- Negishi-Koga, T., and Takayanagi, H. (2009). Ca²⁺-NFATc1 signaling is an essential axis of osteoclast differentiation. *Immunol Rev* 231, 241-256.
- Neufert, C., Becker, C., Wirtz, S., Fantini, M. C., Weigmann, B., Galle, P. R., and Neurath, M. F. (2007). IL-27 controls the development of inducible regulatory T cells and Th17 cells via differential effects on STAT1. *Eur J Immunol* 37, 1809-1816.
- Niedbala, W., Cai, B., Wei, X., Patakas, A., Leung, B. P., McInnes, I. B., and Liew, F. Y. (2008). Interleukin 27 attenuates collagen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis* 67, 1474-1479.
- Niedbala, W., Wei, X. Q., Cai, B., Hueber, A. J., Leung, B. P., McInnes, I. B., and Liew, F. Y. (2007). IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur J Immunol* 37, 3021-3029.
- Nurmohamed, M. T. (2009). Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 8, 663-667.
- O'Dell, J. R. (2004). Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 350, 2591-2602.
- O'Neill, L. A. (2008). Primer: Toll-like receptor signaling pathways--what do rheumatologists need to know? *Nat Clin Pract Rheumatol* 4, 319-327.

- Olsen, N. J., and Stein, C. M. (2004). New drugs for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 350, 2167-2179.
- Oppenheim, J. J. (2001). Cytokines: past, present, and future. *Int J Hematol* 74, 3-8.
- Orbach, H., and Shoenfeld, Y. (2007). Hyperprolactinemia and autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 6, 537-542.
- Owaki, T., Asakawa, M., Fukai, F., Mizuguchi, J., and Yoshimoto, T. (2006). IL-27 induces Th1 differentiation via p38 MAPK/T-bet- and intercellular adhesion molecule-1/LFA-1/ERK1/2-dependent pathways. *J Immunol* 177, 7579-7587.
- Owaki, T., Asakawa, M., Morishima, N., Hata, K., Fukai, F., Matsui, M., Mizuguchi, J., and Yoshimoto, T. (2005). A role for IL-27 in early regulation of Th1 differentiation. *J Immunol* 175, 2191-2200.
- Paloneva, J., Mandelin, J., Kiialainen, A., Bohling, T., Prudlo, J., Hakola, P., Haltia, M., Konttinen, Y. T., and Peltonen, L. (2003). DAP12/TREM2 deficiency results in impaired osteoclast differentiation and osteoporotic features. *J Exp Med* 198, 669-675.
- Paloneva, J., Manninen, T., Christman, G., Hovanes, K., Mandelin, J., Adolfsson, R., Bianchin, M., Bird, T., Miranda, R., Salmaggi, A., *et al.* (2002). Mutations in two genes encoding different subunits of a receptor signaling complex result in an identical disease phenotype. *Am J Hum Genet* 71, 656-662.
- Park-Min, K. H., Ji, J. D., Antoniv, T., Reid, A. C., Silver, R. B., Humphrey, M. B., Nakamura, M., and Ivashkiv, L. B. (2009). IL-10 suppresses calcium-mediated costimulation of receptor activator NF-kappa B signaling during human osteoclast differentiation by inhibiting TREM-2 expression. *J Immunol* 183, 2444-2455.
- Pascual, V., Farkas, L., and Banchereau, J. (2006). Systemic lupus erythematosus: all roads lead to type I interferons. *Curr Opin Immunol* 18, 676-682.
- Pettit, A. R., Walsh, N. C., Manning, C., Goldring, S. R., and Gravalles, E. M. (2006). RANKL protein is expressed at the pannus-bone interface at sites of articular bone erosion in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 45, 1068-1076.
- Pflanz, S., Hibbert, L., Mattson, J., Rosales, R., Vaisberg, E., Bazan, J. F., Phillips, J. H., McClanahan, T. K., de Waal Malefyt, R., and Kastelein, R. A. (2004). WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J Immunol* 172, 2225-2231.
- Pflanz, S., Timans, J. C., Cheung, J., Rosales, R., Kanzler, H., Gilbert, J., Hibbert, L., Churakova, T., Travis, M., Vaisberg, E., *et al.* (2002). IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* 16, 779-790.
- Plenge, R. M., Seielstad, M., Padyukov, L., Lee, A. T., Remmers, E. F., Ding, B., Liew, A., Khalili, H., Chandrasekaran, A., Davies, L. R., *et al.* (2007). TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis--a genomewide study. *N Engl J Med* 357, 1199-1209.

- Pratt, A. G., Isaacs, J. D., and Matthey, D. L. (2009). Current concepts in the pathogenesis of early rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 23, 37-48.
- Rawlins, B. A., Girardi, F. P., and Boachie-Adjei, O. (1998). Rheumatoid arthritis of the cervical spine. *Rheum Dis Clin North Am* 24, 55-65.
- Reinhardt, R. L., Kang, S. J., Liang, H. E., and Locksley, R. M. (2006). T helper cell effector fates--who, how and where? *Curr Opin Immunol* 18, 271-277.
- Remmers, E. F., Plenge, R. M., Lee, A. T., Graham, R. R., Hom, G., Behrens, T. W., de Bakker, P. I., Le, J. M., Lee, H. S., Batliwalla, F., *et al.* (2007). STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 357, 977-986.
- Revaz, S., Dudler, J., and Kai-Lik So, A. (2006). Fever and musculoskeletal symptoms in an adult: differential diagnosis and management. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 20, 641-651.
- Romas, E., Gillespie, M. T., and Martin, T. J. (2002). Involvement of receptor activator of NFkappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha in bone destruction in rheumatoid arthritis. *Bone* 30, 340-346.
- Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T., and Nomura, T. (2006). Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 212, 8-27.
- Sato, K. (2008). Th17 cells and rheumatoid arthritis--from the standpoint of osteoclast differentiation. *Allergol Int* 57, 109-114.
- Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., Tanaka, S., Kodama, T., Akira, S., Iwakura, Y., *et al.* (2006). Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 203, 2673-2682.
- Scheller, J., and Rose-John, S. (2006). Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Med Microbiol Immunol* 195, 173-183.
- Scheller, J., Schuster, B., Holscher, C., Yoshimoto, T., and Rose-John, S. (2005). No inhibition of IL-27 signaling by soluble gp130. *Biochem Biophys Res Commun* 326, 724-728.
- Schett, G. (2007). Erosive arthritis. *Arthritis Res Ther* 9 Suppl 1, S2.
- Schett, G. (2009). Osteoimmunology in rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 11, 210.
- Schett, G., and Teitelbaum, S. L. (2009). Osteoclasts and arthritis. *J Bone Miner Res* 24, 1142-1146.
- Schett, G., Zwerina, J., and Firestein, G. (2008). The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 67, 909-916.

- Schmitz, J., Dahmen, H., Grimm, C., Gendo, C., Muller-Newen, G., Heinrich, P. C., and Schaper, F. (2000). The cytoplasmic tyrosine motifs in full-length glycoprotein 130 have different roles in IL-6 signal transduction. *J Immunol* 164, 848-854.
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., and Hume, D. A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75, 163-189.
- Scott, D. L., and Kingsley, G. H. (2006). Tumor necrosis factor inhibitors for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 355, 704-712.
- Scott, D. L., Symmons, D. P., Coulton, B. L., and Popert, A. J. (1987). Long-term outcome of treating rheumatoid arthritis: results after 20 years. *Lancet* 1, 1108-1111.
- Sengupta, T. K., Schmitt, E. M., and Ivashkiv, L. B. (1996). Inhibition of cytokines and JAK-STAT activation by distinct signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9499-9504.
- Shahrara, S., Huang, Q., Mandelin, A. M., 2nd, and Pope, R. M. (2008). TH-17 cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 10, R93.
- Sharif, M. N., Tassiulas, I., Hu, Y., Mecklenbrauker, I., Tarakhovsky, A., and Ivashkiv, L. B. (2004). IFN-alpha priming results in a gain of proinflammatory function by IL-10: implications for systemic lupus erythematosus pathogenesis. *J Immunol* 172, 6476-6481.
- Sharpe, A. H. (2009). Mechanisms of costimulation. *Immunol Rev* 229, 5-11.
- Shinohara, M., and Takayanagi, H. (2007). Novel osteoclast signaling mechanisms. *Curr Osteoporos Rep* 5, 67-72.
- Singh, J. A., Christensen, R., Wells, G. A., Suarez-Almazor, M. E., Buchbinder, R., Lopez-Olivo, M. A., Tanjong Ghogomu, E., and Tugwell, P. (2009). Biologics for rheumatoid arthritis: an overview of Cochrane reviews. *Cochrane Database Syst Rev* 4, CD007848.
- Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A., and Jordan, M. S. (2009). T cell activation. *Annu Rev Immunol* 27, 591-619.
- Sokka, T. (2009). Long-term outcomes of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 21, 284-290.
- Sorensen, M. G., Henriksen, K., Schaller, S., Henriksen, D. B., Nielsen, F. C., Dziegiel, M. H., and Karsdal, M. A. (2007). Characterization of osteoclasts derived from CD14+ monocytes isolated from peripheral blood. *J Bone Miner Metab* 25, 36-45.
- St Clair, E. W. (1999). Interleukin 10 treatment for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 58 Suppl 1, I99-I102.
- St Clair, E. W. (2000). Interleukin-10: therapeutic prospects in rheumatoid arthritis. *Curr Dir Autoimmun* 2, 126-149.

- Steinman, L. (2007). A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 13, 139-145.
- Stern, P. H. (2006). The calcineurin-NFAT pathway and bone: intriguing new findings. *Mol Interv* 6, 193-196.
- Stumhofer, J. S., and Hunter, C. A. (2008). Advances in understanding the anti-inflammatory properties of IL-27. *Immunol Lett* 117, 123-130.
- Stumhofer, J. S., Laurence, A., Wilson, E. H., Huang, E., Tato, C. M., Johnson, L. M., Villarino, A. V., Huang, Q., Yoshimura, A., Sehy, D., *et al.* (2006). Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol* 7, 937-945.
- Stumhofer, J. S., Silver, J. S., Laurence, A., Porrett, P. M., Harris, T. H., Turka, L. A., Ernst, M., Saris, C. J., O'Shea, J. J., and Hunter, C. A. (2007). Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol* 8, 1363-1371.
- Takayanagi, H. (2007a). Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* 7, 292-304.
- Takayanagi, H. (2007b). The role of NFAT in osteoclast formation. *Ann N Y Acad Sci* 1116, 227-237.
- Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J., *et al.* (2002a). Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* 3, 889-901.
- Takayanagi, H., Kim, S., Matsuo, K., Suzuki, H., Suzuki, T., Sato, K., Yokochi, T., Oda, H., Nakamura, K., Ida, N., *et al.* (2002b). RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta. *Nature* 416, 744-749.
- Takayanagi, H., Kim, S., and Taniguchi, T. (2002c). Signaling crosstalk between RANKL and interferons in osteoclast differentiation. *Arthritis Res* 4 Suppl 3, S227-232.
- Takayanagi, H., Ogasawara, K., Hida, S., Chiba, T., Murata, S., Sato, K., Takaoka, A., Yokochi, T., Oda, H., Tanaka, K., *et al.* (2000). T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature* 408, 600-605.
- Takayanagi, H., Sato, K., Takaoka, A., and Taniguchi, T. (2005). Interplay between interferon and other cytokine systems in bone metabolism. *Immunol Rev* 208, 181-193.
- Takeda, A., Hamano, S., Yamanaka, A., Hanada, T., Ishibashi, T., Mak, T. W., Yoshimura, A., and Yoshida, H. (2003). Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. *J Immunol* 170, 4886-4890.

- Taylor, P. C., and Feldmann, M. (2009). Anti-TNF biologic agents: still the therapy of choice for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 5, 578-582.
- Teitelbaum, S. L. (2000). Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289, 1504-1508.
- Teitelbaum, S. L. (2004). RANKing c-Jun in osteoclast development. *J Clin Invest* 114, 463-465.
- Theofilopoulos, A. N. (1995a). The basis of autoimmunity: Part I. Mechanisms of aberrant self-recognition. *Immunol Today* 16, 90-98.
- Theofilopoulos, A. N. (1995b). The basis of autoimmunity: Part II. Genetic predisposition. *Immunol Today* 16, 150-159.
- Tracey, D., Klareskog, L., Sasso, E. H., Salfeld, J. G., and Tak, P. P. (2008). Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 117, 244-279.
- Turesson, C., and Matteson, E. L. (2009). Vasculitis in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 21, 35-40.
- Vallabhapurapu, S., and Karin, M. (2009). Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 27, 693-733.
- Vallbracht, I., and Helmke, K. (2005). Additional diagnostic and clinical value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies compared with rheumatoid factor isotypes in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 4, 389-394.
- van der Pouw Kraan, T. C., van Gaalen, F. A., Kasperkovitz, P. V., Verbeet, N. L., Smeets, T. J., Kraan, M. C., Fero, M., Tak, P. P., Huizinga, T. W., Pieterman, E., *et al.* (2003). Rheumatoid arthritis is a heterogeneous disease: evidence for differences in the activation of the STAT-1 pathway between rheumatoid tissues. *Arthritis Rheum* 48, 2132-2145.
- van Holten, J., Pavelka, K., Vencovsky, J., Stahl, H., Rozman, B., Genovese, M., Kivitz, A. J., Alvaro, J., Nuki, G., Furst, D. E., *et al.* (2005). A multicentre, randomised, double blind, placebo controlled phase II study of subcutaneous interferon beta-1a in the treatment of patients with active rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 64, 64-69.
- van Oosterhout, M., Bajema, I., Levarht, E. W., Toes, R. E., Huizinga, T. W., and van Laar, J. M. (2008). Differences in synovial tissue infiltrates between anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis and anti-cyclic citrullinated peptide-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 58, 53-60.
- van Venrooij, W. J., Vossenaar, E. R., and Zendman, A. J. (2004). Anti-CCP antibodies: the new rheumatoid factor in the serology of rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 3 Suppl 1, S17-19.
- van Vollenhoven, R. F. (2009). Treatment of rheumatoid arthritis: state of the art 2009. *Nat Rev Rheumatol* 5, 531-541.

- Vang, T., Miletic, A. V., Arimura, Y., Tautz, L., Rickert, R. C., and Mustelin, T. (2008). Protein tyrosine phosphatases in autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 26, 29-55.
- Villarino, A., Hibbert, L., Lieberman, L., Wilson, E., Mak, T., Yoshida, H., Kastelein, R. A., Saris, C., and Hunter, C. A. (2003). The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection. *Immunity* 19, 645-655.
- Villarino, A. V., Artis, D., Bezbradica, J. S., Miller, O., Saris, C. J., Joyce, S., and Hunter, C. A. (2008). IL-27R deficiency delays the onset of colitis and protects from helminth-induced pathology in a model of chronic IBD. *Int Immunol* 20, 739-752.
- Villarino, A. V., Huang, E., and Hunter, C. A. (2004). Understanding the pro- and anti-inflammatory properties of IL-27. *J Immunol* 173, 715-720.
- Villarino, A. V., and Hunter, C. A. (2004). Biology of recently discovered cytokines: discerning the pro- and anti-inflammatory properties of interleukin-27. *Arthritis Res Ther* 6, 225-233.
- Wada, T., Nakashima, T., Hiroshi, N., and Penninger, J. M. (2006). RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med* 12, 17-25.
- Wagner, E. F., and Eferl, R. (2005). Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. *Immunol Rev* 208, 126-140.
- Wang, R., Han, G., Wang, J., Chen, G., Xu, R., Wang, L., Li, X., Shen, B., and Li, Y. (2008). The pathogenic role of interleukin-27 in autoimmune diabetes. *Cell Mol Life Sci* 65, 3851-3860.
- Weaver, C. T., Harrington, L. E., Mangan, P. R., Gavrieli, M., and Murphy, K. M. (2006). Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 24, 677-688.
- Weinblatt, M. E., Keystone, E. C., Furst, D. E., Moreland, L. W., Weisman, M. H., Birbara, C. A., Teoh, L. A., Fischkoff, S. A., and Chartash, E. K. (2003). Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial. *Arthritis Rheum* 48, 35-45.
- Williams, R. O., Feldmann, M., and Maini, R. N. (1992). Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9784-9788.
- Wirtz, S., Becker, C., Fantini, M. C., Nieuwenhuis, E. E., Tubbe, I., Galle, P. R., Schild, H. J., Birkenbach, M., Blumberg, R. S., and Neurath, M. F. (2005). EBV-induced gene 3 transcription is induced by TLR signaling in primary dendritic cells via NF-kappa B activation. *J Immunol* 174, 2814-2824.
- Wong, B. R., Besser, D., Kim, N., Arron, J. R., Vologodskaya, M., Hanafusa, H., and Choi, Y. (1999). TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol Cell* 4, 1041-1049.

- Wong, B. R., Josien, R., Lee, S. Y., Vologodskaya, M., Steinman, R. M., and Choi, Y. (1998). The TRAF family of signal transducers mediates NF-kappaB activation by the TRANCE receptor. *J Biol Chem* 273, 28355-28359.
- Wong, B. R., Rho, J., Arron, J., Robinson, E., Orlinick, J., Chao, M., Kalachikov, S., Cayani, E., Bartlett, F. S., 3rd, Frankel, W. N., *et al.* (1997). TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem* 272, 25190-25194.
- Wu, Y., Tworkoski, K., Michaud, M., and Madri, J. A. (2009). Bone marrow monocyte PECAM-1 deficiency elicits increased osteoclastogenesis resulting in trabecular bone loss. *J Immunol* 182, 2672-2679.
- Xing, L., Schwarz, E. M., and Boyce, B. F. (2005). Osteoclast precursors, RANKL/RANK, and immunology. *Immunol Rev* 208, 19-29.
- Yago, T., Nanke, Y., Ichikawa, N., Kobashigawa, T., Mogi, M., Kamatani, N., and Kotake, S. (2009). IL-17 induces osteoclastogenesis from human monocytes alone in the absence of osteoblasts, which is potently inhibited by anti-TNF-alpha antibody: A novel mechanism of osteoclastogenesis by IL-17. *J Cell Biochem*.
- Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., *et al.* (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3597-3602.
- Yazici, Y. (2009). Treatment of rheumatoid arthritis: we are getting there. *Lancet* 374, 178-180.
- Yazici, Y., and Yazici, H. (2008). Tumor necrosis factor alpha inhibitors, methotrexate or both? An inquiry into the formal evidence for when they are to be used in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 26, 449-452.
- Yeo, H., McDonald, J. M., and Zayzafoon, M. (2006). NFATc1: a novel anabolic therapeutic target for osteoporosis. *Ann N Y Acad Sci* 1068, 564-567.
- Yoshida, H., and Miyazaki, Y. (2008). Regulation of immune responses by interleukin-27. *Immunol Rev* 226, 234-247.
- Yoshida, H., Miyazaki, Y., Wang, S., and Hamano, S. (2007). Regulation of Defense Responses against Protozoan Infection by Interleukin-27 and Related Cytokines. *J Biomed Biotechnol* 2007, 79401.
- Yoshida, H., Nakaya, M., and Miyazaki, Y. (2009). Interleukin 27: a double-edged sword for offense and defense. *J Leukoc Biol*.
- Yoshimura, A., Naka, T., and Kubo, M. (2007). SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 7, 454-465.

Zenz, R., Eferl, R., Scheinecker, C., Redlich, K., Smolen, J., Schonthaler, H. B., Kenner, L., Tschachler, E., and Wagner, E. F. (2008). Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis Res Ther* 10, 201.

Zhao, Q., Shao, J., Chen, W., and Li, Y. P. (2007). Osteoclast differentiation and gene regulation. *Front Biosci* 12, 2519-2529.

7. Περίληψη

Η IL-27 είναι μια ετεροδιμερής κυτταροκίνη, που παράγεται κυρίως από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και αποτελείται από τις υπομονάδες p28 και EBI3. Στα κύτταρα-στόχους ενεργοποιεί το μονοπάτι ενδοκυττάριας σηματοδότησης Jak-STAT και έχει τόσο αντι-φλεγμονώδεις όσο και προ-φλεγμονώδεις λειτουργίες. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ως κυριότερη προ-φλεγμονώδης δράση της IL-27 η επαγωγή του αρχικού σταδίου διαφοροποίησης των Th1 λεμφοκυττάρων. Εμείς επιπλέον διαπιστώσαμε ότι η IL-27 ενισχύει την φλεγμονώδη απόκριση των μονοκυττάρων στους TLR-ligands. Οι αντι-φλεγμονώδεις δράσεις της συνοψίζονται 1) στην αναστολή των Th1, Th2 και Th17 λεμφοκυττάρων και 2) στην παραγωγή IL-10 από τα T-λεμφοκύτταρα. Ενώ ο ρόλος της στην πορεία των λοιμώξεων έχει μελετηθεί εκτενώς, ελάχιστα γνωρίζουμε για τις δράσεις της στο πλαίσιο χρόνιων φλεγμονωδών παθήσεων, όπως είναι η Ρευματοειδής Αρθρίτιδα. Στην παρούσα εργασία δείξαμε ότι ο TNF- α προκαλεί την παραγωγή της IL-27 από τα μονοκύτταρα και μακροφάγα, κάτι που ίσως ερμηνεύει την προέλευση της IL-27 που ανιχνεύεται στον αρθρικό υμένα ασθενών με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα. Αποδείξαμε ότι η IL-27 έχει ισχυρές αντι-φλεγμονώδεις δράσεις αποτρέποντας τη φλεγμονώδη ενεργοποίηση των μονοκυττάρων και των μακροφάγων από τις κυτταροκίνες TNF- α και IL-1 β . Σε αυτό το πλαίσιο, θεωρούμε ότι η IL-27 ίσως αποτελεί έναν αντιρροπιστικό μηχανισμό, που αποσκοπεί στον περιορισμό της έντασης της φλεγμονής. Επιπλέον βρήκαμε ότι είναι ισχυρός αναστολέας της οστεοκλαστογένεσης ελαττώνοντας την έκφραση των υποδοχέων RANK και TREM-2 στην επιφάνεια των προ-οστεοκλαστών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την

αναστολή της επαγωγής των βιοχημικών σημάτων (MAPK και NFκ-B) και των μεταγραφικών παραγόντων (NFATc1 και c-jun), που είναι αναγκαία για την ευόδωση της οστεοκλαστογένεσης. Τα ευρήματά μας, σε συνδυασμό με τις κατασταλτικές δράσεις της στα T-λεμφοκύτταρα, υποδεικνύουν ότι η IL-27 θα μπορούσε ίσως να θεωρηθεί μια ελκυστική θεραπευτική προοπτική σε ασθενείς με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα αφού στοχεύει τόσο στην καταστολή της χρόνιας φλεγμονής όσο και στην αναχαίτιση των οστικών διαβρώσεων. Αυτή όμως η προοπτική προσκρούει πάνω στο γεγονός ότι, όπως διαπιστώσαμε, φλεγμονώδη ερεθίσματα (το αρθρικό υγρό ασθενών με PA, ο TNF-α και η IL-1β) καθιστούν τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα ανθεκτικά στις δράσεις της IL-27. Συγκεκριμένα βρήκαμε ότι τα μακροφάγα που προέρχονται από τις φλεγμαίνουσες αρθρώσεις ασθενών δεν απαντούν στην IL-27 και ότι ο TNF-α αναστέλλει την IL-27 μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από την ενεργοποίηση του p38. Επιπλέον αποδείξαμε ότι η IL-1β καθιστά τα κύτταρα ανθεκτικά στην IL-27 μέσω ελάττωσης της έκφρασης του μεμβρανικού υποδοχέα της IL-27. Είναι πολύ πιθανό τέτοιοι μηχανισμοί αντοχής να ενεργοποιούνται και στο φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον του αρθρικού υμένα και να καθιστούν τα κύτταρα ανθεκτικά στην δράση των αντιφλεγμονωδών παραγόντων, που είναι παρόντες στην άρθρωση (όπως IL-27, IL-10 και TGF-β), συμβάλλοντας έτσι στη διαιώνιση της υμενικής φλεγμονής.

8. Summary

IL-27 is a cytokine mainly produced by antigen presenting cells and is comprised of p28 and EBI3 subunits. IL-27 activates the Jak-STAT signaling pathway and has both anti- and pro-inflammatory functions. The main pro-inflammatory function of IL-27 is the initiation of Th1 differentiation. We have also found that IL-27 primes human monocytes for more robust responses to TLR-ligands. The dominant anti-inflammatory functions of IL-27 are: 1) the inhibition of Th1, Th2 and Th17 differentiation and 2) the production of IL-10 by lymphocytes. While the functions of IL-27 in the course of infections are well-known, the potential role of IL-27 in chronic inflammatory diseases, like Rheumatoid Arthritis (RA), is still unclear. In our current study we have found that TNF- α stimulates production of IL-27 from monocytes and macrophages and this is a potential explanation for the reported expression of IL-27 in synovial tissues from patients with RA. We have also found that IL-27 has potent anti-inflammatory functions by inhibiting the effects of TNF- α and IL-1 β on human monocytes and macrophages. In this context we hypothesize that IL-27 represents a feed-back inhibition mechanism that aims to restrain inflammation. Additionally, we observed that IL-27 is a potent inhibitor of human osteoclastogenesis by down-regulating the expression of RANK and TREM-2 on osteoclast precursors and abrogating RANKL-mediated activation of MAPK and NF κ -B pathways and induction of NFATc1 and c-jun. Our observations suggest that IL-27, by targeting concurrently inflammation and joint destruction, could be a potential attractive therapeutic strategy for RA. The main limitation for this perspective is that inflammatory stimuli (including synovial fluids derived from RA patients, TNF- α and IL-1 β) render monocytes and macrophages refractory to the

regulatory functions of IL-27. We have found that: 1) synovial macrophages derived from RA do not respond to IL-27 and 2) TNF- α and IL-1 β inhibit IL-27 functions by a p38-dependent mechanism and by down-regulating expression of IL-27 receptor respectively. In rheumatoid arthritis, within the inflamed synovium, p38 is active and the cytokines TNF- α and IL-1 β are abundant. In this context, we believe that these inflammatory stimuli render cells refractory to the anti-inflammatory factors that are expressed within the synovial microenvironment (including IL-27, IL-10 and TGF- β), contributing to the perpetuation of joint inflammation.

9. Άρθρα

IL-27 Activates Human Monocytes via STAT1 and Suppresses IL-10 Production but the Inflammatory Functions of IL-27 Are Abrogated by TLRs and p38¹

George D. Kalliolias* and Lionel B. Ivashkiv^{2,*†}

IL-27 is a member of the IL-12 family of cytokines that activates the Jak-STAT signaling pathway in a context-dependent manner and has pleiotropic effects on acquired immunity. IL-27 has the capacity to promote early stages of Th1 generation, but recent evidence has suggested a predominant suppressive effect on Th1, Th2, and Th17 differentiation. Although modest suppressive effects of IL-27 on myeloid lineage cells have been observed, there is limited knowledge about the role of IL-27 in the regulation of innate immunity. In this study we report that although in resting murine macrophages IL-27 had minimal if any effects, in resting human monocytes IL-27 had profound proinflammatory functions. IL-27 activated a STAT1-dominant pattern of signaling in human monocytes with the consequent activation of STAT1-dependent inflammatory target genes. IL-27 primed monocytes for augmented responses to TLR stimulation in a STAT1-dependent manner, altered IL-10 signaling, and attenuated IL-10-induced gene expression. Strikingly, IL-27 strongly suppressed TLR-induced IL-10 production in human monocytes. However, the proinflammatory effects of IL-27 on human monocytes were rapidly abrogated by LPS via a p38-mediated mechanism that inhibited IL-27 signaling. Our findings identify a predominantly proinflammatory function for IL-27 in human monocytes and suggest a mechanism by which the activating effects of IL-27 on innate immunity are attenuated as an immune response proceeds and IL-27 transitions to predominantly suppressive effects on acquired immunity. *The Journal of Immunology*, 2008, 180: 6325–6333.

Interleukin-27 is a member of the IL-12 family of cytokines that are produced by APCs and play a key role in regulating T cell differentiation and function (1). IL-27 is predominantly produced early after stimulation of APCs by TLR ligands or infectious agents. Initial studies of IL-27 function revealed a role in promoting early stages of activation of naive CD4⁺ cells and differentiation to the Th1 lineage (2–4). It was proposed that IL-27 amplifies early responses to weak infectious stimuli to achieve a robust response (5). More recent work has highlighted a regulatory role for IL-27 in suppressing acquired immunity. Indeed, IL-27 suppresses the development of Th1, Th2, and Th17 T cell subsets, and mice deficient in the IL-27 receptor exhibit enhanced inflammation and related toxicity in several infectious disease models (6–8). Strikingly, IL-27 has recently been shown to induce IL-10 production in activated T cells (9–11), thus identifying one mechanism for the suppressive effects of IL-27. However, the molecular basis for its pleiotropic actions during the course of immune responses has not been elucidated.

IL-27 is a heterodimeric cytokine comprised of EBI3 (EBV-induced protein 3) and p28 subunits that share similarity with the p40 and p35 subunits of IL-12, respectively (12). The IL-27 receptor is a heterodimer composed of a WSX-1 subunit (also termed TCCR for T cell cytokine receptor), which confers ligand specificity, and the gp130 signaling subunit, which is also used by the IL-6 family of cytokines and activates the Jak-STAT signal transduction pathway (13). IL-27 activates STATs in a context-dependent manner, depending on cell type and activation state. In resting lymphocytes IL-27 activates STAT1, STAT3, STAT5, and low amounts of STAT4 (14, 15), whereas activation of STAT1 is decreased in fully activated relative to resting CD4⁺ T cells (16). STAT1 plays a key role in mediating the suppressive effects of IL-27 on Th17 (17–19) and Th2 differentiation (15), whereas both STAT1 and STAT3 are required for IL-27-induced IL-10 production in T cells (10, 11). In myeloid cells, IL-27-induced phosphorylation of STAT1 and STAT3 has been observed (8, 13, 20–22), but activation of these STATs has not been linked to IL-27 function in the myeloid lineage.

STAT1 and STAT3 have many antagonistic functions in myeloid cells. For example, STAT1 mediates inflammatory, proapoptotic and antiproliferative effects, while STAT3 mediates anti-inflammatory, antiapoptotic, and proliferative effects (22, 23). Several cytokines, including IFN- γ , IFN- $\alpha\beta$, IL-6 and IL-10, activate both STAT1 and STAT3 in myeloid cells, and we and others have proposed that the relative balance of STAT1 and STAT3 activation by a given cytokine will determine its proinflammatory vs anti-inflammatory functional profile (24–30). For example, proinflammatory IFN- γ activates predominantly STAT1 (31) while the potent anti-inflammatory IL-10 activates predominantly STAT3 (22, 32). More pleiotropic cytokines, such as IL-6 and IFN- α , activate both STAT1 and STAT3 (33, 34) and we have shown that conditions that augment STAT1 activation, such as

*Arthritis and Tissue Degeneration Program, Department of Medicine, Hospital for Special Surgery, New York, NY 10021; and [†]Graduate Program in Immunology, Weill Graduate School of Medical Sciences of Cornell University, New York, NY 10021

Received for publication December 18, 2007. Accepted for publication February 28, 2008.

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.

¹ This work was supported by The Stavros S. Niarchos International Fellowship Exchange Program (to G.D.K.) and by a grant from the National Institutes of Health (to L.B.I.).

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Lionel B. Ivashkiv, Department of Medicine, Hospital for Special Surgery, 535 East 70th Street, New York, NY 10021. E-mail address: ivashkiv1@hss.edu

priming macrophages (M ϕ s)³ with IFN- γ , increase the proinflammatory properties of cytokines and can even confer activating functions to IL-10 (24, 26, 35). IL-27 activates both STAT1 and STAT3 in myeloid cells and thus has the potential to induce both proinflammatory and anti-inflammatory effects.

There is limited knowledge about the role of IL-27 in the regulation of innate immunity. An early study showed that IL-27 can induce proinflammatory cytokines in human monocytes and mast cells (13). Follow-up studies in murine systems have suggested a moderately suppressive function of IL-27 on activated myeloid cells. IL-27 inhibited the function of murine mast cells (36), partially suppressed the production of proinflammatory cytokines by activated murine M ϕ s (8), and attenuated the Ag-presenting capacity and Th1-promoting function of activated murine dendritic cells in vitro (21). We investigated the function and signaling of IL-27 in monocytes and M ϕ s. We found that resting murine M ϕ are minimally responsive to IL-27, but human monocytes are strongly activated by IL-27 in a STAT1-dominant manner. IL-27 primed human monocytes to produce augmented inflammatory responses to TLR ligation, strongly suppressed TLR-induced IL-10 production, and altered IL-10 function by increasing IL-10-induced STAT1 activation and attenuating IL-10-induced gene expression. IL-27 signaling to STAT1 and downstream gene activation were rapidly abrogated by TLR signaling via a p38-dependent mechanism. These results identify STAT1-dependent inflammatory functions for IL-27 in human monocytes and suggest a mechanism by which the inflammatory properties of IL-27 are extinguished as the immune response proceeds and IL-27 assumes a more regulatory role.

Materials and Methods

Cell culture

Bone marrow-derived M ϕ s, resident peritoneal M ϕ s, and splenocytes were obtained as described (25) from C57BL/6J mice (The Jackson Laboratory). Cells were cultured in DMEM supplemented with 20% FBS (HyClone), 100 U/ml penicillin, and streptomycin in the presence or absence of 10 ng/ml murine M-CSF (PeproTech). The following murine (m) cytokines were used to stimulate cells as indicated: mIFN- γ (100 U/ml) (PeproTech), mIL-27 (100 ng/ml), and mIL-6 (50 ng/ml) (R&D Systems). PBMCs were obtained from whole blood from healthy volunteers by density gradient centrifugation using Ficoll (Invitrogen). CD14⁺ monocytes were purified from fresh PBMCs using anti-CD14 magnetic beads (Miltenyi Biotec) as recommended by the manufacturer. Purity of monocytes was >97% as verified by FACS. Cells were cultured in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 10% FBS (HyClone), 100 U/ml penicillin, and streptomycin in the presence or absence of 10 ng/ml human (h) M-CSF (hM-CSF) (PeproTech). The following human cytokines were used to stimulate cells as indicated: hIFN- γ (100 U/ml) (Roche), hIL-10 (100 ng/ml) (PeproTech), hIL-27 (100 ng/ml) (R&D Systems), hIL-6 (50 ng/ml) (R&D Systems), and soluble IL-6R (100 ng/ml). Monocytes were stimulated with (S)-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2-*RS*)-propyl]-*N*-palmitoyl-(*R*)-Cys-(*S*)-Ser-(*S*)-Lys₄-OH, 3HCl (Pam₃Cys; ECM Microcollections), LPS (Sigma), CL097 (InvivoGen), and zymosan (Molecular Probes) as indicated in the figure legends. In some experiments cells were pre-treated with cycloheximide (A.G. Scientific), actinomycin D (Sigma), the p38 inhibitor SB203580, or the MEK inhibitor U0126 (Calbiochem). The experiments using human and murine cells were approved by the Hospital for Special Surgery Institutional Review Board and Institutional Animal Care and Use Committee (New York, NY), respectively.

Immunoblotting and ELISA

Whole cell extracts were obtained and protein levels were quantitated using the Bradford assay (Bio-Rad). For immunoblotting, 5 μ g of whole cell lysates were fractionated on 7.5% polyacrylamide gels using SDS-PAGE, transferred to polyvinylidene fluoride membranes (Millipore), and incubated with specific Abs. ECL was used for detection. mAbs against STAT1 and STAT3 were purchased from BD Transduction Laboratories. Phosphorylation-specific (tyrosine 701) STAT1 Ab and phosphorylation-specific (tyrosine 705) STAT3 Ab were obtained from Cell Signaling Technology. For ELISA, paired TNF- α , IL-6, and IL-10 capture and detection Abs were purchased from R&D Systems and used in a sandwich ELISA according to the instructions of the manufacturer.

Real-time quantitative RT-PCR

For real-time PCR, total RNA was extracted using an RNeasy mini kit (Qiagen) and 1 μ g of total RNA was reverse transcribed using a first strand cDNA synthesis kit (Fermentas). Quantitative PCR was performed using iQ SYBR Green Supermix and iCycler iQ thermal cycler (Bio-Rad) following the manufacturer's protocols. Triplicate reactions were run for each sample and expression of a tested gene was normalized relative to levels of GAPDH. The oligonucleotide primers used are as follows: mGAPDH, 5'-ATCAAGAAGGTGGTGAAGCA-3' (forward) and 5'-AGACAACCTGTCCTCAGTGT-3' (reverse); murine suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1, 5'-CATCCCTCTTAACCCGGTAC-3' (forward) and 5'-TGGAAGGGAAGGAAGTCAAG-3' (reverse); mSOCS3, 5'-ATTGCTCAATCACTTTTAT-3' (forward) and 5'-ACTGGGATTGGTTGAGTTT-3' (reverse); murine IFN regulatory factor 1 (IRF-1), 5'-CCCACAGAAGAGCATAGCAC-3' (forward) and 5'-AGCAGTCTTTGGGAATAGG-3' (reverse); mouse inducible protein-10 (IP-10), 5'-ATTCTTTAAGGGCTGGTCTGA-3' (forward) and 5'-CACCTCCACATAGCTTACAGT-3' (reverse); hGAPDH, 5'-ATCAAGAAGGTGGTGAAGCA-3' (forward) and 5'-GTGCTGTGTTGAAGTCAGAGGA-3' (reverse); hSOCS1, 5'-TGTTGTAGCAGCTTAAGTGTATC-3' (forward) and 5'-AGAGGTAGGAGGTGCGAGT-3' (reverse); hSOCS3, 5'-CACTCTCTCAGCATCTCTGTCGGAAG-3' (forward) and 5'-CATAGGAGTCCAGGTGGCCGCTTGAC-3' (reverse); hCXCL10, 5'-ATTGCTGCCTTATCTTTCTGTG-3' (forward) and 5'-TCTCACCTTCTTTTTCATTGTAG-3' (reverse); human complement receptor 1 (CR-1), 5'-GGATCCCTGCTGGCGGTTGTG-3' (forward) and 5'-CCAGGCGCGCATTCATAGTTTCAGA-3' (reverse); human decidual protein-induced progesterone (DEPP), 5'-GGCCGCCCTGCTGTGTCC-3' (forward) and 5'-CCTCTGGCTTGGCTGCTTTCTCTG-3' (reverse); hCD163, 5'-CCAGTCCCAAACTGTCCT-3' (forward) and 5'-CACTCTCTATGCAAGGCCACA-3' (reverse); human 15-hydroxy prostaglandin dehydrogenase (PGDH), 5'-GCTGGAGTGAAATAGAGAAAAAC-3' (forward) and 5'-CAATAAACCGGCTGCTGTG-3' (reverse); hCXCL9, 5'-ATCAGCACCAACCAAGGGACT-3' (forward) and 5'-GCTTTTCTTTTGGCTGACCTG-3' (reverse); hSTAT1, 5'-TGGGTTTGACAAGGTTCTT-3' (forward) and 5'-TATGCA GTGCCACGGAAAG-3' (reverse); hIRF-1, 5'-GCACTAAGCGAAAAATTGCA-3' (forward) and 5'-GGGAGTTTCCTTCACATTCA-3' (reverse); hTNF- α , 5'-AATAGGCTGTTCCCATGTAGC-3' (forward) and 5'-AGAGGTCAGCAATGAGTGA-3' (reverse); hIL-6, 5'-TAATGGGCATTCCTTCTTCT-3' (forward) and 5'-TGTCCTAACGCTCATACTTTT-3' (reverse); hIL-10, 5'-TTATCTTGCTCTGGGCTTGG-3' (forward) and 5'-GTTGGGGAATGAGGTTAGGG-3' (reverse).

Results

Nonactivated murine M ϕ s are minimally responsive to IL-27

IL-27 strongly suppresses murine T cells via STAT1 and STAT3 (12, 16), and IL-27-induced STAT3 activation, along with moderately suppressive effects on activation-induced cytokine production, has been described in murine myeloid cells (8). We wished to investigate the effects of IL-27 on resting M ϕ s not exposed to activation stimuli. We analyzed IL-27-induced activation of STAT tyrosine phosphorylation and downstream gene expression. Stimulation of murine splenocytes, which are comprised predominantly of lymphocytes, with IL-27 rapidly induced tyrosine phosphorylation of STAT1 and STAT3 as expected (Fig. 1A). Surprisingly, tyrosine phosphorylation of STAT1 and STAT3 was not observed after the stimulation of bone marrow-derived M ϕ s (BMDMs) with the same preparation of IL-27 in parallel wells in the same experiment (Fig. 1B), and similar results were obtained using resident peritoneal M ϕ (data not shown). In contrast, IFN- γ and IL-6, used

³ Abbreviations used in this paper: M ϕ , macrophage; BMDM, bone marrow-derived macrophage; CR1, complement receptor 1; DEPP, decidual protein-induced progesterone; h (prefix), human; IRF-1, IFN regulatory factor 1; m (prefix), murine; Pam₃CysSer(Lys)₄, (S)-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2-*RS*)-propyl]-*N*-palmitoyl-(*R*)-Cys-(*S*)-Ser-(*S*)-Lys₄-OH, 3HCl; PGDH, 15-hydroxy prostaglandin dehydrogenase; SHP-2, Src homology domain 2-containing phosphatase; shRNA, short hairpin RNA; SOCS, suppressor of cytokine signaling.

FIGURE 1. Nonactivated murine Mφs are minimally responsive to IL-27. *A*, Splenocytes obtained from C57BL/6J mice were stimulated with mIFN- γ (100 U/ml) for 20 min or mIL-27 (100 ng/ml) for 10, 20, and 30 min, and STAT1 and STAT3 tyrosine phosphorylation (pY) was measured by immunoblotting. *B*, BMDMs obtained from C57BL/6J mice were stimulated with mIFN- γ (100 U/ml) or IL-6 (50 ng/ml) for 20 min or mIL-27 (100 ng/ml) for 10, 20, and 30 min, and STAT1 and STAT3 tyrosine phosphorylation (pY) was measured by immunoblotting. *C*, BMDMs were cultured for 3 h with mIFN- γ (300 U/ml), IL-6 (50 ng/ml), or mIL-27 (100 ng/ml) and mRNA was measured using real-time PCR and normalized relative to mGAPDH expression. Results are depicted as expression in cytokine-stimulated monocytes relative to unstimulated monocytes (set as 1) and the means $\pm$ SD of triplicate determinants in a representative experiment of three independent experiments are shown; small SDs are not readily apparent because of large inductions.

here as positive controls, activated STAT1 and STAT3 in murine Mφs (Fig. 1*B*). These results suggest that IL-27 activates STAT1 and STAT3 weakly in murine Mφs, below the limits of detection by the immunoblotting of whole cell lysates. Activation of STAT target genes is a very sensitive measure of STAT activation, and robust gene activation can be observed downstream of minimal or undetectable signals (24). Thus, we tested the effects of IL-27 stimulation on the expression of the STAT1-target genes *SOCS1*, *IRF1*, and *IP-10* and the STAT3 target gene *SOCS3*. IL-27 stimulation had minimal, if any, effect on expression of these STAT target genes, in contrast to the robust activation of STAT1 target genes by IFN- γ and *SOCS3* by IL-6 (Fig. 1*C*). Overall, these results indicate that resting mBMDMs (and peritoneal Mφs) are minimally responsive to IL-27, which is consistent with low or undetectable expression of the IL-27 receptor component WSX-1 in these cells (Ref. 3 and C. Hunter, unpublished observations).

IL-27 activates predominantly STAT1-mediated responses in human monocytes and Mφ

We next tested whether human monocytes and Mφs were responsive to IL-27. IL-27 induced tyrosine phosphorylation of both STAT1 and STAT3 in freshly isolated human monocytes (Fig. 2, *A* and *B*). IL-27 appeared to activate moderate levels of both of these STATs relative to the strong activation of STAT1 by IFN- γ and the strong activation of STAT3 by IL-10 (Fig. 2, *A* and *B*). Thus, at the time point tested (20 min after cytokine stimulation), IL-27 appeared to activate a balanced signal mediated by both STAT1 and STAT3 (Fig. 2, *A* and *B*) that oppose each other's activity in many contexts (22, 23). In contrast, the activating cytokine IFN- γ induced a STAT1-dominant signal and the suppressive cytokine IL-10 induced a STAT3-dominant signal (Fig. 2, *A* and *B*). Our next step was to investigate the induction of gene expression by IL-27. IL-27 strongly induced expression of the STAT1 target genes *SOCS1*, *IRF1*, *CXCL10*, and *STAT1* comparably to the activation observed with saturating concentrations of IFN- γ at several time points (Fig. 2, *C* and *D*, and data not shown). IL-27 activated the expression of STAT1-dependent genes when de novo protein synthesis was blocked using cycloheximide (Fig. 2*D*), indicating that gene induction was direct and not dependent

FIGURE 2. IL-27 activates STAT1 and STAT1 target genes in human monocytes. *A* and *B*, Freshly isolated human monocytes were stimulated with IFN- γ (100 U/ml), IL-10 (100 ng/ml), or IL-27 (100 ng/ml) for 15 min and STAT1 (*A*) or STAT3 (*B*) tyrosine phosphorylation (pY) was measured by immunoblotting. Representative results of at least three independent experiments are shown. *C*, Monocytes were cultured for 3 h with IFN- γ (100 U/ml) or IL-27 (100 ng/ml) and mRNA expression was measured using real-time PCR and normalized relative to GAPDH expression. Representative results of at least 15 independent experiments are shown. *D*, Monocytes were cultured in the presence or absence of cycloheximide (CHX; 15 μ g/ml) for 30 min, then stimulated with IL-27 (100 ng/ml) for 3 h, and mRNA was measured using real-time PCR. *E*, Monocytes were cultured for 3 h with IL-10 (100 ng/ml) or IL-27 (100 ng/ml) and mRNA was measured using real-time PCR. For *D* and *E*, representative results from at least three independent experiments are shown. Results are depicted as expression in cytokine-stimulated monocytes relative to unstimulated monocytes (set as 1) and the means $\pm$ SD of triplicate determinants in a representative experiment are shown.

on synthesis of other cytokines. In contrast to the robust activation of STAT1 target genes, the induction of the STAT3 target gene *SOCS3* in response to saturating concentrations of IL-27 was very modest and markedly lower compared with induction by IL-10 (Fig. 2E). The effects of IL-27 on STAT activation and gene expression were highly reproducible and were observed in >15 experiments with monocytes derived from different blood donors. These results suggest that IL-27 has a STAT1-dominant (IFN- γ -like) effect on gene activation in human monocytes despite the simultaneous activation of STAT3.

The duration of STAT activation is an important determinant of downstream gene expression, such that sustained activation of STATs is more effective in inducing gene expression than transient activation of comparable magnitude (37, 38). Therefore, we investigated the kinetics of STAT activation downstream of the IL-27 receptor. In these experiments we compared IL-27 to IL-6, which also activates both STAT1 and STAT3 (33). The IL-27 and IL-6 receptors both use the gp130 signaling subunit that activates STAT1 and STAT3 (Fig. 3A). In addition, the IL-27 receptor contains the WSX-1 subunit that confers ligand specificity and activates STAT1 (13). Comparable levels of STAT1 tyrosine phosphorylation were induced after 15 min of stimulation with IL-6 and IL-27 (Fig. 3A). IL-6-induced STAT1 tyrosine phosphorylation decayed rapidly and returned almost to baseline 30 min after the addition of IL-6. In contrast, IL-27 induced sustained STAT1 tyrosine phosphorylation that was still elevated 120 min after the addition of IL-27 (Fig. 3A). Activation of STAT3 by IL-6 and IL-27, mediated in both cases by gp130, followed similar kinetics (Fig. 3A). Subsequently, we tested whether the substantial difference in the duration of STAT1 activation by IL-27 and IL-6 was associated with differential induction of STAT1 target genes. The STAT1 target genes *SOCS1*, *IRF1*, and *CXCL10* were induced by IL-27 (Fig. 3B), consistent with our previous observations (Fig. 2, C and D). In contrast, IL-6 had a minimal effect on the expression of STAT1 target genes (Fig. 3B). These results suggest that WSX-1 contributes to a sustained STAT1 response that is transduced into effective activation of downstream genes.

IL-27 primes monocytes for enhanced TLR responses by a STAT1-dependent mechanism

We wished to investigate the functional consequences of IL-27 signaling on inflammatory cytokine production by monocytes. IFN- γ enhances TLR-induced inflammatory cytokine production, whereas IL-10 suppresses cytokine production by a STAT3-dependent mechanism (31, 32). We tested whether IL-27 would enhance or suppress TLR-induced cytokine production in primary human monocytes. We cultured human monocytes in the presence or absence of IL-27, and then stimulated cells with TLR ligands and measured cytokine production using ELISA. As expected, stimulation of monocytes with Pam₃Cys (TLR2 ligand) induced the production of the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-6 (Fig. 4A, open bars). Cells that had been pretreated with IL-27 produced substantially higher levels of TNF- α and IL-6 in response to Pam₃Cys (Fig. 4A, gray bars). In parallel, IL-27 pretreatment augmented TLR2-induced accumulation of TNF- α and IL-6 mRNA (Fig. 4B), and similar results were obtained when IL-1 β and IL-12 p40 mRNA were measured (data not shown). IL-27 also augmented inflammatory cytokine production in response to the TLR4 ligand LPS (Fig. 4, C and D) and the TLR7/8 ligand CL097 (data not shown).

The priming effects of IL-27 on TLR-induced inflammatory cytokine production are similar to those exerted by IFN- γ , a strong activator of STAT1 (31). Therefore, we wished to test whether augmented cytokine production was dependent on

FIGURE 3. Prolonged activation of STAT1 correlates with induction of STAT1 target genes downstream of the IL-27 receptor. **A**, IL-6 signals via gp130 homodimers whereas IL-27 signals via WSX-1 and gp130 heterodimers. gp130 is subject to negative regulation by SOCS3 and the phosphatase SHP2 via tyrosine 759 (Y759) and by p38. gp130 tyrosines 767, 814, 905, and 915 recruit STAT3, tyrosines 905 and 915 also recruit STAT1, and the membrane-distal tyrosine of WSX-1 recruits STAT1. Monocytes were cultured with IL-6 (50 ng/ml) plus IL-6R α (100 ng/ml) or IL-27 (100 ng/ml) for the indicated times and STAT1 and STAT3 tyrosine phosphorylation (pY) was measured by immunoblotting. Representative results of two independent experiments are shown. **B**, Monocytes were cultured for 3 h with IL-6 (50 ng/ml) plus IL-6R α (100 ng/ml) or IL-27 (100 ng/ml), and mRNA was measured using real-time PCR. Representative results from at least three independent experiments are shown. Results are depicted as expression in cytokine-stimulated monocytes relative to unstimulated monocytes (set as 1) and the means $\pm$ SD of triplicate determinants in a representative experiment are shown.

STAT1. We approached this question by using human monocytic THP-1 cells that had been stably transduced with lentiviral vectors encoding short hairpin RNA (shRNA) that effectively silences STAT1 expression (or control shRNA) as previously described (27). Consistent with our observations using primary monocytes, THP-1 cells transduced with control shRNA produced increased levels of TLR2-induced IL-6 after priming with IL-27 (Fig. 4E). In contrast, this priming effect on TLR2-induced IL-6 production was abolished in cells in which STAT1 expression was silenced (Fig. 4E). These results show that IL-27 augments TLR-induced inflammatory cytokine production by a STAT1-dependent mechanism.

IL-27 modulates IL-10 function and suppresses IL-10 production

Effective priming and activation of monocytes involves overcoming suppression by regulatory factors such as IL-10 and

FIGURE 4. IL-27 primes monocytes for enhanced TLR responses by a STAT1-dependent mechanism. *A–D*, Monocytes were cultured with M-CSF (10 ng/ml) in the presence or absence of IL-27 (100 ng/ml) for 24 h and stimulated for the indicated times with Pam₃Cys (Pam; 10 ng/ml) (*A* and *B*) or LPS (10 ng/ml) (*C* and *D*). TNF-α and IL-6 protein were measured in culture supernatants using ELISA (*A* and *C*) and mRNA was measured using real time PCR (*B* and *D*). Representative results of at least five independent experiments are shown. For *B* and *D*, results are depicted as expression in cytokine-stimulated monocytes relative to unstimulated monocytes (set as 1) and the means $\pm$ SD of triplicate determinants in a representative experiment are shown. *E*, THP-1 monocytic cells transduced with lentiviral vectors encoding control or STAT1-specific shRNA interference cells (STAT1 Low) were cultured in the presence or absence of IL-27 (200 ng/ml) for 24 h, stimulated with Pam₃Cys, and IL-6 in culture supernatants was measured using ELISA. Representative results of at least three independent experiments are shown.

TGF-β (39). As IL-10 is a key deactivator of monocytes (22, 32), we investigated the effects of IL-27 on IL-10 signaling and function. The suppressive effects of IL-10 are mediated by STAT3, and we tested the effects of IL-27 on IL-10-induced STAT activation. IL-10 induced tyrosine phosphorylation of STAT3 as expected, and this induction was not affected by IL-27 (Fig. 5A). As predicted based on the mRNA results (Fig. 2D), IL-27 strongly increased STAT1 protein expression (Fig. 5A). Concomitant with increased STAT1 expression, IL-10 in-

duced increased levels of STAT1 tyrosine phosphorylation in monocytes that had been primed with IL-27 (Fig. 5A). Because STAT1 can suppress the expression of STAT3 target genes (27), we tested the effects of IL-27 on IL-10-induced gene expression. Interestingly, IL-27 attenuated the induction of *SOCS3*, *PGDH*, *DEPP*, *CD163*, and *CR1* genes by IL-10 (Fig. 5B), suggesting that IL-27 may attenuate IL-10 function, including suppressive functions mediated by SOCS3 and PGDH (38, 40).

FIGURE 5. IL-27 modulates IL-10 signaling and function. Monocytes were cultured with M-CSF (10 ng/ml) in the presence or absence of IL-27 (30 or 100 ng/ml) for 24 h. *A*, Control and IL-27-primed cells were stimulated with or without IL-10 (20 ng/ml) for 20 min and cell lysates were analyzed by immunoblotting. PY, Tyrosine phosphorylation. *B*, Control and IL-27-primed cells were stimulated with IL-10 (20 ng/ml) for 3 h and *SOCS3*, *PGDH*, *DEPP*, *CD163*, and *CR1* mRNA were measured using real-time PCR and normalized relative to GAPDH expression. *C*, Control and IL-27-primed cells were cultured for 3 h in the presence or absence of IL-10 (20 ng/ml) and then stimulated for 6 h with Pam₃Cys (Pam). Production of TNF-α and IL-6 protein was measured in the culture supernatants using ELISA. Representative results from at least three independent experiments are shown. For *B*, results are depicted as expression in cytokine-stimulated monocytes relative to unstimulated monocytes (set as 1), and the means $\pm$ SD of triplicate determinants in a representative experiment are shown.

FIGURE 6. IL-27 suppresses IL-10 production from human monocytes. Monocytes were cultured with M-CSF (10 ng/ml) in the presence or absence of IL-27 (100 ng/ml) for 24 h, stimulated for the indicated times with Pam₃Cys (Pam; 10 ng/ml) (A and B), LPS (10 ng/ml) (C and D) or zymosan (Zym; 40 μ g/ml) (E). IL-10 protein in culture supernatants was measured using ELISA, and IL-10 mRNA was measured using real time PCR. Representative results from at least four independent experiments are shown. For B and D, results are depicted as expression in cytokine-stimulated monocytes relative to unstimulated monocytes (set as 1) and the means $\pm$ SD of triplicate determinants in a representative experiment are shown.

We then tested whether IL-27 could attenuate a key suppressive function of IL-10, namely IL-10-mediated down-regulation of inflammatory cytokine production. As expected, IL-10 suppressed Pam₃Cys-induced production of TNF- α and IL-6 (Fig. 5C). In accord with our previous results, IL-27 augmented TLR-induced TNF- α and IL-6 production (Fig. 5C). This augmented cytokine production was still effectively suppressed by IL-10. However, even though IL-10 still maintained suppressive effects on cytokine production in IL-27-primed monocytes, monocytes that were treated with both IL-27 and IL-10 produced relatively high levels of TNF- α and IL-6 (Fig. 5C, light gray bars), comparable to or higher than cytokine levels produced by control monocytes stimulated with TLR ligands in the absence of IL-10 (Fig. 5C, open bars). Similar results were obtained when monocytes were stimulated with LPS (data not shown). These results make two points: 1) when the total monocyte output of TNF- α and IL-6 are considered, the proinflammatory effects of IL-27 dominate over the suppressive effects of IL-10; and 2) despite these quantitative differences, IL-10 retains its ability to suppress TLR-induced cytokine production in the presence of IL-27.

Because IL-27 did not abrogate the suppressive effects of IL-10 on cytokine production, we next addressed whether IL-27 regulated TLR-induced IL-10 production, which serves an important feedback inhibitory and homeostatic function (32). Treatment of monocytes with IL-27 resulted in a striking inhibition of Pam₃Cys induction of IL-10 protein and mRNA (Fig. 6, A and B). IL-27 had similar inhibitory effects on the induction of IL-10 by LPS (Fig. 6, C and D) and by zymosan (Fig. 6E), in which case IL-10 production is mainly dependent on dectin-1, which signals by tyrosine kinase pathways (41). Thus, in striking contrast to T cells where IL-27 induces IL-10 production (9–11), IL-27 broadly suppresses IL-10 production in human monocytes. Collectively, the results indicate that disruption of IL-10-mediated feedback inhibition and suppression is a component of the activating function of IL-27 on human monocytes.

Activation of monocytes by IL-27 is abrogated by TLRs via a p38-dependent mechanism

The activating effects of IL-27 on fresh human monocytes that we have described stand in stark contrast to reports that document a predominantly suppressive function of IL-27 on acquired immunity at later stages of immune responses (6–8, 12, 16–19, 36). We reasoned that IL-27 may prime the first steps of innate immune responses, similar to early activation of naive T cells (2–4, 16, 42–44), but that these priming functions may be blocked as the immune response evolves and IL-27 function shifts to a suppressive mode. We tested this notion by investigating whether activated monocytes became refractory to the effects of IL-27. Strikingly, activation of primary human monocytes with LPS strongly inhibited IL-27-induced STAT1 activation over a sustained time period (Fig. 7A). Concomitant with the inhibition of signaling, LPS inhibited IL-27-induced activation of the STAT1 target genes *IRF1*, *STAT1*, *CXCL10*, and *CXCL9* (Fig. 7B); the time frame of these experiments is short, such that the LPS-mediated induction of *CXCL9* and *CXCL10* that occurs indirectly via autocrine IFN- β is not readily detectable. The IL-27 receptor is comprised of gp130 and WSX-1 subunits (13), and we and others have shown that gp130-mediated signaling is strongly inhibited by TLRs via a rapidly induced mechanism that is dependent on p38 and independent of de novo protein synthesis (45–51). Interestingly, inhibition of IL-27 signaling was induced rapidly, within 30 min of TLR stimulation (Fig. 7A), and was independent of de novo RNA or protein synthesis (Fig. 7C). In addition, LPS-induced suppression was reversed when the p38 inhibitor SB203580 was used (Fig. 7D) and, thus, was dependent on the activation of p38. As LPS inhibits IL-6 and IL-27 signaling under the same conditions (Fig. 7E) by a similar p38-dependent but RNA and protein synthesis-independent mechanism (45–51), these results suggest that TLRs inhibit IL-27 signaling in part by targeting the gp130 receptor subunit. This raises the possibility that although IL-27 and IFN- γ share STAT1-activating properties, the functions of these cytokines may be differentially regulated by TLRs. This notion was supported by the

FIGURE 7. Activation of monocytes by IL-27 is abrogated by TLRs by a p38-dependent mechanism. *A*, Monocytes were cultured in the presence or absence of LPS (10 ng/ml) for the indicated times, stimulated with IL-27 (100 ng/ml) and STAT1, and STAT3 tyrosine phosphorylation (pY) was measured by immunoblotting. Representative results of at least five independent experiments are shown. *B*, Monocytes were cultured in the presence or absence of LPS for 30 min, stimulated with IL-27 for 3 h, and IRF1, STAT1, CXCL10, and CXCL9 mRNA were measured using real-time PCR and normalized relative to GAPDH expression. Representative results of at least three independent experiments are shown. *C*, Monocytes were cultured in the presence or absence of cycloheximide (CHX; 15 μ g/ml) or actinomycin D (Act-D; 5 μ g/ml) for 30 min before stimulation with LPS (30 min) and then with IL-27 (20 min) as in *A*. STAT1 and STAT3 tyrosine phosphorylation (pY) was measured by immunoblotting. *D*, Monocytes were cultured in the presence or absence of SB203580 (p38 inhibitor; 10 μ M) or U0126 (MEK inhibitor; 10 μ M) before LPS and IL-27 stimulation as in *C*. For *C* and *D*, representative results of at least two independent experiments are shown. *E*, Monocytes were cultured in the presence (+) or absence (–) of LPS for 30 min and then stimulated with IL-6 (50 ng/ml) plus IL-6R α (100 ng/ml), IL-27 (100 ng/ml), or IFN- γ (100 U/ml) for 20 min and STAT1 and STAT3 activation was measured by immunoblotting. *F*, Monocytes were cultured in the presence or absence of LPS for 30 min, stimulated with IL-27 or IFN- γ for 3 h and mRNA was measured using real-time PCR. Expression of CXCL9 mRNA in LPS-pretreated cells relative to cells stimulated with cytokines alone (each set as 100) is shown. For *E* and *F*, representative results from at least three independent experiments are shown. For *B* and *F*, results are depicted as expression in cytokine-stimulated monocytes relative to unstimulated monocytes (set as 1), and the means $\pm$ SD of triplicate determinants in a representative experiment are shown.

finding that, in contrast to the inhibition of IL-27 responses, IFN- γ -induced activation of STAT1 and downstream expression of STAT1 target genes were preserved in LPS-activated monocytes (Fig. 7, *E* and *F*). Collectively, the results show that IL-27 function in human monocytes is tightly regulated, and the activating functions of IL-27 that can promote the earliest steps of innate responses are rapidly attenuated as monocytes become activated and the immune response matures.

Discussion

Emerging paradigms about the role of IL-27 in the orchestration of immune responses suggest that IL-27 is pleiotropic and has opposite activating or suppressing effects dependent on timing and context. Recent work suggests a predominant suppressive role for IL-27 that dampens acquired immunity and attenuates the later phases of immune activation by suppressing T cells. We found that IL-27 has strong activating effects on human monocytes, leading to IFN- γ -like activation of STAT1 target genes, increased production of chemokines and inflammatory cytokines, and attenuated IL-10

function and production. These findings suggest an activating function of IL-27 on human innate immunity that contrasts with its suppressive effects on acquired immunity. However, this activating function of IL-27 is transient, as IL-27 signaling was inactivated by TLR ligands via a rapidly induced p38-dependent inhibitory mechanism. Inhibition of IL-27 signaling in M ϕ s provides a mechanism by which IL-27 transitions from early activating effects on innate immunity to switch to predominantly suppressive effects on acquired immunity.

The activation of human monocytes by IL-27 has similarities but also significant differences from activation by IFN- γ , the prototypic M ϕ -activating cytokine. Many of these similar actions can be explained on the basis of STAT1 activation, which leads to expression of canonical inflammatory STAT1 target genes such as chemokines (27) and to suppression of IL-10 production in myeloid cells in vitro (39) and in vivo (52). Interestingly, STAT1 appears to have the opposite effect on IL-10 production in T cells, where IL-27 induces IL-10 production by a STAT1-dependent (and also STAT3-dependent) mechanism (10, 11). We have also

shown for the first time that priming for increased TLR-induced inflammatory cytokine production is dependent on STAT1; it is likely that priming by IFN- γ depends on STAT1, similar to priming by IL-27 (Fig. 4). Interesting differences between IL-27 and IFN- γ include cellular source, regulation of production, regulation of cellular responses to these cytokines, and different effects on acquired immunity. IL-27 is produced mainly by APCs in response to microbial products. IFN- γ is also produced by NK and NKT cells that participate in innate immunity; however, Ag-specific T cells are a major source of IFN- γ , and thus IFN- γ production can be finely regulated in an Ag-specific manner. In contrast, M ϕ responses to IL-27 are more tightly regulated than responses to IFN- γ , as TLR stimulation inhibited IL-27 but not IFN- γ signaling. Thus it appears that IL-27 and IFN- γ have similar functions on human monocytes, but the expression of and signaling by these cytokines are differentially regulated to tune M ϕ responses to be appropriate for the environment.

IL-27 uses gp130 that is also used by IL-6 family cytokines; gp130 activates both STAT3 and STAT1 with a tendency to activate a STAT3-dominant response (53, 54). In contrast to IL-6 that activated STAT1 transiently in monocytes, IL-27 activated sustained tyrosine phosphorylation of STAT1 that correlated with a much stronger IL-27 induction of STAT1 target gene expression (Fig. 3). The duration of STAT activation has been associated with the magnitude of target gene expression (28, 37, 38), and the sustained pattern of STAT1 activation by IL-27 is likely conferred by WSX-1, because the activation of STATs by gp130 was transient in monocytes (Fig. 3) and WSX-1 has been shown to activate STAT1 in other systems (13). Interestingly, our group and others have shown that gp130 signaling is highly regulated and is targeted for inhibition by multiple mechanisms, including SOCS3 and Src homology domain 2-containing phosphatase (SHP-2), that bind to tyrosine 759 in the gp130 cytoplasmic domain and by a rapidly acting p38-dependent pathway (45–51, 55, 56) that likely induces receptor internalization (Ref. 57 and G. Kalliolias, unpublished observations) (Fig. 3A). Thus, gp130 functions not just as a signal transducer but as a target for inhibition that confers suppression on signaling by receptor subunits such as WSX-1, with which it associates. In contrast, activation of STAT1 by IFN- γ is resistant to inhibition by TLR-induced pathways. The association of WSX-1 with gp130 thus provides a mechanism by which STAT1 can be strongly activated but also becomes subject to inhibition by factors that activate p38.

Our results suggest differences between human monocytes that are strongly activated by IL-27 and murine BMDMs and peritoneal M ϕ s that have minimal responsiveness in our hands (Fig. 1), consistent with low WSX-1 expression in these M ϕ populations (Ref. 3 and C. Hunter, unpublished observations). IL-27 function is context dependent and it is possible that IL-27 activates STAT1 in murine myeloid populations more directly comparable (but difficult to access experimentally) to the human monocytes studied here. Other laboratories have actually detected modest direct suppressive effects of IL-27, accompanied by STAT3 activation, in activated murine M ϕ s and dendritic cells cultured under different conditions than those used in our study (8, 21). It is not yet clear whether these differences between the activation of human monocytes and the modest suppression of murine myeloid cells reflect differences related to cell differentiation and activation state or represent a qualitative species difference, possibly related to differential relative activation of STAT3 vs STAT1 by murine and human IL-27 receptors. Alternatively, these differences may be related to differences in WSX-1 expression, which is regulated by cytokines (58, 59) in different monocyte/M ϕ populations, or to differential targeting and modulation of gp130 signaling. To date

we have been unsuccessful in detecting activating responses to IL-27 in several murine M ϕ populations while finding that human cells maintain IL-27 responsiveness during differentiation into M ϕ s during culture with M-CSF (G. Kalliolias, unpublished observations). Future work comparing the expression and signaling of human vs murine WSX-1 will help resolve these issues.

Our results suggest a temporal regulation of monocyte/M ϕ responses to IL-27 during the course of an immune response. In this model, during the early phases of innate immune responses circulating monocytes or recent monocytic emigrants into inflammatory sites are strongly activated by systemic or paracrine IL-27, respectively. If monocytes encounter microbes or their products at sites of infection, they will start to produce IL-27 but at the same time become refractory to its effects. Thus the amplifying effects and potential toxicity of autocrine IL-27 are avoided, and IL-27 can act in a paracrine manner, eventually to suppress lymphocyte responses. This model postulates that the pleiotropic biological effects of IL-27 are in part mediated by induced changes in IL-27 signaling in monocytes. This mechanism of regulation is similar to the reprogramming of the pattern of STAT activation that occurs in T cells during their activation (16) and has been suggested to alter T cell responses to IL-27 in a context-dependent manner. Overall, our observations extend our understanding of the bidirectional and context-dependent role of IL-27 in the orchestration of immune responses.

Acknowledgments

We thank Jong Dae Ji and Kyung-Hyun Park-Min for critical reading of the manuscript. We thank Simi Ahmed and Zhimei Du for some of the IFN- γ experiments.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- Kastelein, R. A., C. A. Hunter, and D. J. Cua. 2007. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* 25: 221–242.
- Chen, Q., N. Ghilardi, H. Wang, T. Baker, M. H. Xie, A. Gurney, I. S. Grewal, and F. J. de Sauvage. 2000. Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR. *Nature* 407: 916–920.
- Yoshida, H., S. Hamano, G. Senaldi, T. Covey, R. Faggioni, S. Mu, M. Xia, A. C. Wakeham, H. Nishina, J. Potter, et al. 2001. WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to *L. major* infection. *Immunity* 15: 569–578.
- Pflanz, S., J. C. Timans, J. Cheung, R. Rosales, H. Kanzler, J. Gilbert, L. Hibbert, T. Churakova, M. Travis, E. Vaisberg, et al. 2002. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EB13 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4⁺ T cells. *Immunity* 16: 779–790.
- Hunter, C. A., A. Villarino, D. Artis, and P. Scott. 2004. The role of IL-27 in the development of T-cell responses during parasitic infections. *Immunol. Rev.* 202: 106–114.
- Villarino, A., L. Hibbert, L. Lieberman, E. Wilson, T. Mak, H. Yoshida, R. A. Kastelein, C. Saris, and C. A. Hunter. 2003. The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection. *Immunity* 19: 645–655.
- Hamano, S., K. Himeno, Y. Miyazaki, K. Ishii, A. Yamanaka, A. Takeda, M. Zhang, H. Hiseada, T. W. Mak, A. Yoshimura, and H. Yoshida. 2003. WSX-1 is required for resistance to *Trypanosoma cruzi* infection by regulation of proinflammatory cytokine production. *Immunity* 19: 657–667.
- Holscher, C., A. Holscher, D. Ruckerl, T. Yoshimoto, H. Yoshida, T. Mak, C. Saris, and S. Ehlers. 2005. The IL-27 receptor chain WSX-1 differentially regulates antibacterial immunity and survival during experimental tuberculosis. *J. Immunol.* 174: 3534–3544.
- Awasthi, A., Y. Carrier, J. P. Peron, E. Bettelli, M. Kamanaka, R. A. Flavell, V. K. Kuchroo, M. Oukka, and H. L. Weiner. 2007. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat. Immunol.* 8: 1380–1389.
- Fitzgerald, D. C., G. X. Zhang, M. El-Behi, Z. Fonseca-Kelly, H. Li, S. Yu, C. J. Saris, B. Gran, B. Ciric, and A. Rostami. 2007. Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells. *Nat. Immunol.* 8: 1372–1379.
- Stumhofer, J. S., J. S. Silver, A. Laurence, P. M. Porrett, T. H. Harris, L. A. Turka, M. Ernst, C. J. Saris, J. J. O'Shea, and C. A. Hunter. 2007. Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat. Immunol.* 8: 1363–1371.

12. Batten, M., and N. Ghilardi. 2007. The biology and therapeutic potential of interleukin 27. *J. Mol. Med.* 85: 661–672.
13. Pflanz, S., L. Hibbert, J. Mattson, R. Rosales, E. Vaisberg, J. F. Bazan, J. H. Phillips, T. K. McClanahan, R. de Waal Malefyt, and R. A. Kastelein. 2004. WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J. Immunol.* 172: 2225–2231.
14. Hibbert, L., S. Pflanz, R. De Waal Malefyt, and R. A. Kastelein. 2003. IL-27 and IFN- α signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12R β 2 in naive T cells. *J. Interferon Cytokine Res.* 23: 513–522.
15. Lucas, S., N. Ghilardi, J. Li, and F. J. de Sauvage. 2003. IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4⁺ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 15047–15052.
16. Yoshimura, T., A. Takeda, S. Hamano, Y. Miyazaki, I. Kinjyo, T. Ishibashi, A. Yoshimura, and H. Yoshida. 2006. Two-sided roles of IL-27: induction of Th1 differentiation on naive CD4⁺ T cells versus suppression of proinflammatory cytokine production including IL-23-induced IL-17 on activated CD4⁺ T cells partially through STAT3-dependent mechanism. *J. Immunol.* 177: 5377–5385.
17. Batten, M., J. Li, S. Yi, N. M. Kljavin, D. M. Danilenko, S. Lucas, J. Lee, F. J. de Sauvage, and N. Ghilardi. 2006. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat. Immunol.* 7: 929–936.
18. Stumhofer, J. S., A. Laurence, E. H. Wilson, E. Huang, C. M. Tato, L. M. Johnson, A. V. Villarino, Q. Huang, A. Yoshimura, D. Sehly, et al. 2006. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat. Immunol.* 7: 937–945.
19. Amadi-Obi, A., C. R. Yu, X. Liu, R. M. Mahdi, G. L. Clarke, R. B. Nussenblatt, I. Gery, Y. S. Lee, and C. E. Egwuagu. 2007. TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat. Med.* 13: 711–718.
20. Kamiya, S., C. Nakamura, T. Fukawa, K. Ono, T. Ohwaki, T. Yoshimoto, and S. Wada. 2007. Effects of IL-23 and IL-27 on osteoblasts and osteoclasts: inhibitory effects on osteoclast differentiation. *J. Bone Miner. Metab.* 25: 277–285.
21. Wang, S., Y. Miyazaki, Y. Shinozaki, and H. Yoshida. 2007. Augmentation of antigen-presenting and Th1-promoting functions of dendritic cells by WSX-1(IL-27R) deficiency. *J. Immunol.* 179: 6421–6428.
22. Lang, R. 2005. Tuning of macrophage responses by Stat3-inducing cytokines: molecular mechanisms and consequences in infection. *Immunobiology* 210: 63–76.
23. Ivashkiv, L. B., and X. Hu. 2004. Signaling by STATs. *Arthritis Res. Ther.* 6: 159–168.
24. Hu, X., C. Herrero, W. P. Li, T. T. Antoniv, E. Falck-Pedersen, A. E. Koch, J. M. Woods, G. K. Haines, and L. B. Ivashkiv. 2002. Sensitization of IFN- γ Jak-STAT signaling during macrophage activation. *Nat. Immunol.* 3: 859–866.
25. Tassioulas, I., X. Hu, H. Ho, Y. Kashyap, P. Paik, Y. Hu, C. A. Lowell, and L. B. Ivashkiv. 2004. Amplification of IFN- α -induced STAT1 activation and inflammatory function by Syk and ITAM-containing adaptors. *Nat. Immunol.* 5: 1181–1189.
26. Sharif, M. N., I. Tassioulas, Y. Hu, I. Mecklenbrauker, A. Tarakhovsky, and L. B. Ivashkiv. 2004. IFN- α priming results in a gain of proinflammatory function by IL-10: implications for systemic lupus erythematosus pathogenesis. *J. Immunol.* 172: 6476–6481.
27. Ho, H. H., and L. B. Ivashkiv. 2006. Role of STAT3 in type I interferon responses: negative regulation of STAT1-dependent inflammatory gene activation. *J. Biol. Chem.* 281: 14111–14118.
28. El Kasm, K. C., J. Holst, M. Coffre, L. Mielke, A. de Pauw, N. Lhocine, A. M. Smith, R. Rutschman, D. Kaushal, Y. Shen, et al. 2006. General nature of the STAT3-activated anti-inflammatory response. *J. Immunol.* 177: 7880–7888.
29. Qing, Y., and G. R. Stark. 2004. Alternative activation of STAT1 and STAT3 in response to interferon- γ . *J. Biol. Chem.* 279: 41679–41685.
30. Costa-Pereira, A. P., S. Tininini, B. Strobl, T. Alonzi, J. F. Schlaak, H. Is'harc, I. Gesualdo, S. J. Newman, I. M. Kerr, and V. Poli. 2002. Mutational switch of an IL-6 response to an interferon- γ -like response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 8043–8047.
31. Schroder, K., P. J. Hertzog, T. Ravasi, and D. A. Hume. 2004. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms, and functions. *J. Leukocyte Biol.* 75: 163–189.
32. Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman, and A. O'Garra. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 683–765.
33. Kamimura, D., K. Ishihara, and T. Hirano. 2003. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 149: 1–38.
34. van Boxel-Dezaire, A. H., M. R. Rani, and G. R. Stark. 2006. Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons. *Immunity* 25: 361–372.
35. Herrero, C., X. Hu, W. P. Li, S. Samuels, M. N. Sharif, S. Kosenko, and L. B. Ivashkiv. 2003. Reprogramming of IL-10 activity and signaling by IFN- γ . *J. Immunol.* 171: 5034–5041.
36. Artis, D., A. Villarino, M. Silverman, W. He, E. M. Thornton, S. Mu, S. Summer, T. M. Covey, E. Huang, H. Yoshida, et al. 2004. The IL-27 receptor (WSX-1) is an inhibitor of innate and adaptive elements of type 2 immunity. *J. Immunol.* 173: 5626–5634.
37. Murray, P. J. 2007. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J. Immunol.* 178: 2623–2629.
38. Yoshimura, A., T. Naka, and M. Kubo. 2007. SOCS proteins, cytokine signalling, and immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 454–465.
39. Hu, X., P. K. Paik, J. Chen, A. Yarinina, L. Kockeritz, T. T. Lu, J. R. Woodgett, and L. B. Ivashkiv. 2006. IFN- γ suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. *Immunity* 24: 563–574.
40. Antoniv, T. T., K. H. Park-Min, and L. B. Ivashkiv. 2005. Kinetics of IL-10-induced gene expression in human macrophages. *Immunobiology* 210: 87–95.
41. Saijo, S., N. Fujikado, T. Furuta, S. H. Chung, H. Kotaki, K. Seki, K. Sudo, S. Akira, Y. Adachi, N. Ohno, et al. 2007. Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat. Immunol.* 8: 39–46.
42. Yoshida, H., Y. Miyazaki, S. Wang, and S. Hamano. 2007. Regulation of defense responses against protozoan infection by interleukin-27 and related cytokines. *J. Biomed. Biotechnol.* 2007: 79401.
43. Owaki, T., M. Asakawa, N. Morishima, K. Hata, F. Fukai, M. Matsui, J. Mizuguchi, and T. Yoshimoto. 2005. A role for IL-27 in early regulation of Th1 differentiation. *J. Immunol.* 175: 2191–2200.
44. Owaki, T., M. Asakawa, F. Fukai, J. Mizuguchi, and T. Yoshimoto. 2006. IL-27 induces Th1 differentiation via p38 MAPK/T-bet- and intercellular adhesion molecule-1/LFA-1/ERK1/2-dependent pathways. *J. Immunol.* 177: 7579–7587.
45. Sengupta, T. K., E. S. Talbot, P. A. Scherle, and L. B. Ivashkiv. 1998. Rapid inhibition of interleukin-6 signaling and Stat3 activation mediated by mitogen-activated protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 11107–11112.
46. Ahmed, S. T., and L. B. Ivashkiv. 2000. Inhibition of IL-6 and IL-10 signaling and Stat activation by inflammatory and stress pathways. *J. Immunol.* 165: 5227–5237.
47. Niemand, C., A. Nimmesgern, S. Haan, P. Fischer, F. Schaper, R. Rossaint, P. C. Heinrich, and G. Muller-Newen. 2003. Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3. *J. Immunol.* 170: 3263–3272.
48. Fischer, P., U. Lehmann, R. M. Sobota, J. Schmitz, C. Niemand, S. Linnemann, S. Haan, I. Behrmann, A. Yoshimura, J. A. Johnston, et al. 2004. The role of the inhibitors of interleukin-6 signal transduction SHP2 and SOCS3 for desensitization of interleukin-6 signalling. *Biochem. J.* 378: 449–460.
49. Schaper, F., C. Gendo, M. Eck, J. Schmitz, C. Grimm, D. Anhu, I. M. Kerr, and P. C. Heinrich. 1998. Activation of the protein tyrosine phosphatase SHP2 via the interleukin-6 signal transducing receptor protein gp130 requires tyrosine kinase Jak1 and limits acute-phase protein expression. *Biochem. J.* 335: 557–565.
50. Kim, H., T. S. Hawley, R. G. Hawley, and H. Baumann. 1998. Protein tyrosine phosphatase 2 (SHP-2) moderates signaling by gp130 but is not required for the induction of acute-phase plasma protein genes in hepatic cells. *Mol. Cell. Biol.* 18: 1525–1533.
51. Kim, H., and H. Baumann. 1999. Dual signaling role of the protein tyrosine phosphatase SHP-2 in regulating expression of acute-phase plasma proteins by interleukin-6 cytokine receptors in hepatic cells. *Mol. Cell. Biol.* 19: 5326–5338.
52. VanDeusen, J. B., M. H. Shah, B. Becknell, B. W. Blaser, A. K. Ferketich, G. J. Nuovo, B. M. Ahmer, J. Durbin, and M. A. Caligiuri. 2006. STAT-1-mediated repression of monocyte interleukin-10 gene expression in vivo. *Eur. J. Immunol.* 36: 623–630.
53. Zhong, Z., Z. Wen, and J. E. Darnell, Jr. 1994. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* 264: 95–98.
54. Schmitz, J., H. Dahmen, C. Grimm, C. Gendo, G. Muller-Newen, P. C. Heinrich, and F. Schaper. 2000. The cytoplasmic tyrosine motifs in full-length glycoprotein 130 have different roles in IL-6 signal transduction. *J. Immunol.* 164: 848–854.
55. Lehmann, U., J. Schmitz, M. Weissenbach, R. M. Sobota, M. Hortner, K. Friederichs, I. Behrmann, W. Tsiaris, A. Sasaki, J. Schneider-Mergener, et al. 2003. SHP2 and SOCS3 contribute to Tyr-759-dependent attenuation of interleukin-6 signaling through gp130. *J. Biol. Chem.* 278: 661–671.
56. Schmitz, J., M. Weissenbach, S. Haan, P. C. Heinrich, and F. Schaper. 2000. SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J. Biol. Chem.* 275: 12848–12856.
57. Radtke, S., X. Yang, S. Wuller, B. Lippok, H. Schmitz-Van de Leur, B. Mutze, C. Stross, J. Bode, M. Gaestel, P. C. Heinrich, et al. 2007. Pro-inflammatory cytokines restrict IL-6 signalling through p38/MK2-mediated tyrosinization and degradation of gp130. In *Cytokines in Health and Disease: 15th Annual Meeting of the International Cytokine Society, October 26–30*. International Cytokine Society, Atlanta, Abstract 223.
58. Villarino, A. V., J. Larkin, III, C. J. Saris, A. J. Caton, S. Lucas, T. Wong, F. J. de Sauvage, and C. A. Hunter. 2005. Positive and negative regulation of the IL-27 receptor during lymphoid cell activation. *J. Immunol.* 174: 7684–7691.
59. Ruckerl, D., M. Hessmann, T. Yoshimoto, S. Ehlers, and C. Holscher. 2006. Alternatively activated macrophages express the IL-27 receptor α chain WSX-1. *Immunobiology* 211: 427–436.

IL-27 inhibits human osteoclastogenesis by abrogating RANKL-mediated induction of NFATc1 and suppressing proximal RANK signaling

Running title: **IL-27 inhibits human osteoclastogenesis**

George D. Kalliolias^{1*} MD, Baohong Zhao* PhD, Antigoni Triantafyllopoulou* MD, Kyung-Hyun Park-Min* PhD and Lionel B. Ivashkiv^{*†} MD.

¹ Corresponding Author and reprint request

Address: Hospital for Special Surgery, 535 East 70th Street, Research Building 4th floor, New York, NY 10021 USA

Telephone number: 212-606-1651

Fax number: 212-774-2560

e-mail: kallioliasg@hss.edu

*Arthritis and Tissue Degeneration Program and Department of Medicine, Hospital for Special Surgery, New York, NY 10021.

[†]Graduate Program in Immunology and Microbial Pathogenesis, Weill Cornell Graduate School of Medical Sciences New York, NY 10021.

This work was supported by grants from NIH (L.B.I), Niarchos Foundation (G.D.K) and Arthritis Foundation (K.H-P.M).

Keywords: Osteoclastogenesis, Cytokines, Interleukins, RANKL, Rheumatoid Arthritis

Abstract

Objective. IL-27 has stimulatory and regulatory immune functions and is expressed in rheumatoid arthritis synovium. We investigated the effects of IL-27 on human osteoclastogenesis to determine whether IL-27 can stimulate or attenuate osteoclast-mediated bone resorption that is a hallmark of rheumatoid arthritis.

Methods. Osteoclasts were generated from blood-derived human CD14⁺ cells. The effects of IL-27 on osteoclast formation were evaluated by counting the number of TRAP⁺ multinucleated cells and measuring expression of osteoclast-related genes. The induction of NFATc1 and the activation of signaling pathways downstream of RANK were measured by immunoblotting. The expression of key molecules implicated in osteoclastogenesis (NFATc1, RANK, costimulatory receptors, ITAM-harboring adaptors) was measured by real time RT-PCR. Murine osteoclast precursors were obtained from bone marrow. Responsiveness to IL-27 of synovial fluid macrophages derived from RA patients was also tested.

Results. IL-27 inhibited human osteoclastogenesis, suppressed the induction of NFATc1, downregulated expression of RANK and TREM-2, and inhibited RANKL-mediated activation of ERK, p38 and NF- κ B in osteoclast precursors. Synovial fluid macrophages derived from RA patients were refractory to the effects of IL-27. In contrast to humans, IL-27 only moderately suppressed murine osteoclastogenesis, likely due to low expression of the IL-27 receptor subunit WSX-1 on murine osteoclast precursors.

Conclusion. IL-27 inhibits human osteoclastogenesis by a direct mechanism suppressing responses of osteoclast precursors to RANKL. Our findings suggest that in addition to its well-known anti-inflammatory effects, IL-27 plays a homeostatic role in restraining bone erosion.

This homeostatic function is compromised under conditions of chronic inflammation such as RA synovitis.

IL-27 is a member of the IL-12 family of the heterodimeric cytokines that also includes IL-12, IL-23 and IL-35 (1-3). It is comprised of EBI3 (EBV-induced protein 3) and p28 subunits that share similarity with, respectively, the p40 and p35 subunits of IL-12 (4). The IL-27 receptor is a heterodimer composed of a WSX-1 subunit (also termed TCCR, T cell cytokine receptor), which confers ligand specificity, and the gp130 signaling subunit that is also utilized by the IL-6 family of cytokines (5). IL-27 activates the Jak-STAT signal transduction pathway in a context dependent manner, depending on cell type and activation state. In resting lymphocytes, IL-27 activates STAT1, STAT3, STAT5 and low amounts of STAT4 (6), whereas activation of STAT1 is decreased in fully activated CD4⁺ T cells relative to resting cells (7). In myeloid cells IL-27 induces phosphorylation of STAT1 and STAT3 (5, 8, 9) and we have recently reported that in human monocytes IL-27 has a STAT1-dominant effect (10). In contrast, we have found that murine BMDM are minimally responsive to IL-27.

IL-27 plays both activating and regulatory roles in immune responses (2). IL-27 is produced early during innate responses and augments the induction of Th1 responses (4, 6). In contrast, later in the evolution of an immune response IL-27 suppresses Th1 polarization and inhibits Th17 and Th2 differentiation (6, 11-14), in part by inducing IL-10 production (15-17). The role of IL-27 in arthritis and other inflammatory or infectious diseases has been explained on the basis of its effects on T cell differentiation (1-3). IL-27 can play either a pathogenic or a protective role in murine models of inflammatory arthritis, depending upon the model and underlying pathogenic mechanisms. In adjuvant-induced arthritis and proteoglycan-induced arthritis, both considered Th1-mediated diseases, IL-27 is pathogenic, consistent with its known Th1-inducing effects (18, 19). In contrast, in collagen-induced arthritis, which is Th17-mediated (and where Th1 responses can actually be protective), IL-27 was protective and proposed as a

potential treatment for arthritis (20). IL-27 is expressed in human rheumatoid arthritis (20), which has been considered a Th1-mediated disease, but recent evidence suggests a role for Th17 responses in disease pathogenesis (21). Thus, it is important to determine whether IL-27 plays a pathogenic or protective role in human RA.

Rheumatoid arthritis is characterized by chronic synovial inflammation and bone destruction and a hallmark of disease is bone erosions mediated by osteoclasts (22). In the last few years, significant breakthroughs have improved our understanding of mechanisms that control the activity of osteoclasts under physiologic and pathologic circumstances (23, 24). Osteoclasts are large multinucleated cells created by the differentiation and fusion of myeloid lineage precursor cells, which include cells in the blood monocyte pool (25). In the microenvironment of bone, myeloid-derived osteoclast precursors are exposed to stimuli that commit them to the osteoclast lineage (26). The driving force of this commitment-differentiation process is the interaction of RANKL (a cytokine member of the TNF super-family) with its receptor RANK that is expressed on the surface of osteoclast precursors (27, 28). Effective osteoclastogenesis requires co-stimulatory calcium-mediated signals by ITAM-coupled receptors that co-operate with RANK signaling to induce NFATc1 and the downstream osteoclast differentiation program (29-32). In humans, TREM-2 is a key costimulatory receptor, as loss of function mutations in TREM-2 compromise bone remodeling and lead to Nasu Hakola disease (33, 34).

The multi-step osteoclast differentiation program is tightly controlled by hormones, cytokines and other regulatory factors. Cytokines that activate the Jak-STAT signal transduction pathway have been implicated in the regulation of osteoclastogenesis bridging immune regulation with bone remodeling. IFNs (35, 36), IL-4 (37), IL-6 (38) and IL-10 (39) inhibit

osteoclast differentiation, while IL-23 promotes osteoclast formation by up-regulating RANK expression in precursor cells (40). IL-27, which belongs to the same cytokine family as IL-23, has been reported to modestly and indirectly regulate osteoclast differentiation in murine systems (40, 41), but mechanisms by which IL-27 regulates osteoclastogenesis and the role of IL-27 in human osteoclastogenesis have not been addressed.

We wished to explore the role of IL-27 in human osteoclastogenesis as this could yield insight into one facet of the potential pathogenic vs. protective roles of IL-27 in human RA. We found that IL-27 is a potent inhibitor of human osteoclastogenesis by a direct effect on osteoclast precursor cells. One mechanism that mediates the anti-osteoclastogenic function of IL-27 is abrogation of RANKL-induced c-Jun and NFATc1 expression by downregulation of the expression of RANK and inhibition of MAPK- and NF- κ B signaling pathways downstream of RANK. We also found that in osteoclast precursor cells IL-27 downregulates the expression of the TREM-2 costimulatory receptor. Surprisingly, we found that synovial fluid derived macrophages from joint effusions of patients with active RA were refractory to the effects of IL-27. Our findings, combined with the reported inhibitory effects of IL-27 on Th17-mediated inflammation, suggest that IL-27 has the capacity to regulate both chronic inflammation and associated bone erosion, but this regulatory function is attenuated within the inflammatory microenvironment of the joint.

Materials and Methods

Cell culture. PBMCs from healthy volunteers' blood, purchased from the NY Blood Center, were obtained by density gradient centrifugation. Mononuclear cells were isolated from synovial fluids derived from five patients with rheumatoid arthritis (diagnosis was based on ACR criteria). CD14⁺ cells were purified from PBMCs and from synovial fluid derived mononuclear cells using anti-CD14 magnetic beads (Miltenyi Biotec). Murine monocytes were obtained from C57BL/6J mice (The Jackson Laboratory) by density gradient centrifugation and positive selection using anti-CD11b magnetic beads (Miltenyi Biotec). Bone marrow cells and splenocytes were obtained from C57BL/6J mice and bone marrow-derived osteoclast precursors were generated by 4 days of culture on Petri dishes in DMEM supplemented with 20% FBS (HyClone) and recombinant murine M-CSF (20 ng/ml) (PeproTech). To measure cell viability, MTT assays were performed using an MTT assay kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Experiments with human cells were approved by the Hospital for Special Surgery IRB and with mouse cells by the Institutional Animal Care and Use Committee.

Osteoclast differentiation. Human CD14⁺ cells were incubated in α -MEM (Invitrogen) supplemented with 10% FBS (Defined, Hyclone) and 20ng/ml of hM-CSF (PeproTech) for 2 days to generate osteoclast precursors. Osteoclast precursors were incubated with 20ng/ml of M-CSF and 40ng/ml of sRANKL (PeproTech) for an additional 5 days. Cytokines were replenished every 3 days. On culture day 7, cells were fixed and stained for TRAP using the Acid Phosphatase Leukocyte diagnostic kit (Sigma, San Diego, CA). Multinucleated (> 3 nuclei) TRAP-positive osteoclasts were counted in triplicate wells of 96 well plates. Recombinant hIL-27 (R&D Systems) was added either from the beginning of the culture and

before RANKL (IL-27 pretreatment), simultaneously with RANKL on culture day 3, or after RANKL (on culture day 5). Murine bone marrow-derived osteoclast precursors were incubated with mMCSF (20ng/ml) and sRANKL (80ng/ml) for 5 days in α -MEM above.

Pit formation assay. Human preosteoclasts were re-plated on dentin slices (5×10^4 cells/slice) in 96-well culture plates and stimulated as indicated. Cells on dentin were removed, and the dentin slices were immersed in 1% toluidine blue O (Sigma-Aldrich) to stain resorption pits formed by mature osteoclasts.

Immunoblotting. Whole-cell extracts were prepared by lysis of cells in buffer containing 20 mM Hepes (pH 7.0), 300 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 0.1% Triton X-100, 0.5 mM DTT, 20% glycerol and $1 \times$ proteinase inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland).

Nuclear extracts were prepared by incubating cells for 15 min ($4^\circ C$) in buffer containing 10 mM Hepes (pH 7.9), 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, $1 \times$ proteinase inhibitor cocktail and 1mM DTT. NP-40 was added to a final concentration of 0.2% and the lysate was centrifuged at 10,000g for 30sec. Finally, the nuclear pellet was lysed in SDS-PAGE loading buffer.

For immunoblotting 5 or 10 μ g of whole-cell lysates were fractioned on polyacrylamide gels using SDS-PAGE, transferred to polyvinylidene fluoride membranes (Millipore) and incubated with specific Abs. ECL was used for detection. ERK, p-ERK, p-p38, p-I κ B α , I κ B α , c-Jun, pY-STAT1 and pY-STAT3 antibodies were from Cell Signaling Technology. TRAF6, TBP and p38 antibodies were from Santa Cruz Biotechnology while NFATc1, STAT1 and STAT3 antibodies were purchased from BD Transduction Laboratories.

RT-PCR and quantitative RT-PCR (qPCR). For RT-PCR and qPCR total RNA was extracted using an RNeasy mini kit (Qiagen) and 1µg of total RNA was reverse transcribed using a First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas). qPCR was performed using iQ SYBR Green Supermix and iCycler iQ thermal cycler (Bio-Rad). PCR (34 cycles: 95°C 30sec/60°C 30sec/72°C 1 min.) was utilized to quantify the mRNA levels of WSX-1 in human CD14+ or CD14- cells and murine osteoclast precursors or splenocytes.

Results

IL-27 inhibits human osteoclastogenesis in a dose- and time-dependent manner.

In the presence of M-CSF and RANKL myeloid-lineage precursors differentiate into osteoclasts (25), but STAT1 activation downstream of IFNs has been shown to inhibit osteoclastogenesis (42). Recently we reported that IL-27 strongly activates STAT1 in human monocytes and macrophages (10) and in this study we wished to investigate whether IL-27 has any regulatory function on human osteoclastogenesis. As expected (43), culture with M-CSF plus RANKL induced differentiation of large multinucleated TRAP⁺ cells that were readily apparent 5 days after RANKL addition (Figure 1A, second panel and Figure 1B). When IL-27 was added at the beginning of culture (Day 1), a dose dependent inhibition of osteoclastogenesis was observed (Figure 1A and 1B), with nearly complete inhibition of generation of multinucleated TRAP⁺ cells observed at doses ≥ 30 ng/ml of IL-27 ($p < 0.01$, Student's *t* test). When IL-27 (100 ng/ml) was added at later time points during the differentiation process, a substantial inhibition was observed when IL-27 was added on day 3 (simultaneously with addition of RANKL), while there was slight inhibition when IL-27 was added on day 5 (Figure 1A and 1B). A similar pattern of dose- and time-dependent inhibition of RANKL-induced expression of osteoclast-related genes Cathepsin K (Figure 1C) and integrin $\beta 3$ (data not shown) by IL-27 was observed. Cathepsin K and integrin $\beta 3$ were still expressed in the mostly mononuclear cells observed when 30 ng/ml of IL-27 was used, but were strongly downregulated by saturating concentrations of IL-27 that nearly completely suppressed osteoclastogenesis. The functional consequence of the observed IL-27-mediated inhibition of osteoclastogenesis was assessed by resorption pit formation assay using dentin slices. As expected, the observed inhibition of osteoclastogenesis by IL-27 was reflected also by the absence of resorption pits (Figure 1D, left). Interestingly, when IL-27 was

added late on day 5, the formed osteoclasts were capable of creating resorption pits (Figure 1D, left, fifth panel). The latter implies that IL-27 can not inhibit the late stages of osteoclast differentiation and function. Additionally, we found using the MTT assay that IL-27 mediates antiosteoclastogenic effects without affecting viability of osteoclast precursors (Figure 1D, right). Taken together, these observations suggest that IL-27 is a potent inhibitor of the early stages of human osteoclastogenesis by a direct effect on osteoclast precursors.

IL-27 abrogates RANKL-mediated induction of NFATc1.

We wished to investigate mechanisms by which IL-27 inhibits osteoclast differentiation. It is well established that NFATc1 is a master regulator of osteoclastogenesis, driving the expression of genes that are crucial for the commitment and differentiation of precursor cells to osteoclasts (44, 45). We tested the effects of IL-27 on NFATc1 expression. As expected, RANKL (40ng/ml) induced within 24h NFATc1 protein expression (Figure 2A, lane 4) and the levels of NFATc1 protein remained elevated for at least 72h following RANKL stimulation (Figure 2A, lanes 4-6). Addition of IL-27 resulted in the abrogation of RANKL-induced NFATc1 protein expression for the entire 72h period of RANKL stimulation (Figure 2A, lanes 7-9). We next investigated whether IL-27 inhibits NFATc1 gene expression. The levels of NFATc1 mRNA increased following 24 and 48h stimulation with RANKL (Figure 2B). Pretreatment with IL-27 resulted in substantial suppression of NFATc1 mRNA levels (Figure 2B). A similar striking abrogation of RANKL-induced NFATc1 protein expression was observed when IL-27 was added together with RANKL (on culture day 3) (Figure 2C, lanes 4-9). Simultaneous addition of IL-27 had a similar suppressive effect on NFATc1 mRNA expression (Figure 2D). These results

indicate that the abrogation of NFATc1 induction is a mechanism that mediates the inhibitory effects of IL-27 on human osteoclastogenesis.

IL-27 inhibits RANKL-induced activation of MAPK and NF- κ B pathways and suppresses RANK expression.

The induction of NFATc1 expression by RANK is dependent upon RANKL-induced activation of MAPK and NF- κ B pathways (23, 24), and thus we investigated whether IL-27 inhibited RANK signaling. In agreement with the literature, we found that stimulation of osteoclast precursors with RANKL (40ng/ml) induced rapid phosphorylation of ERK and p38 MAPKs (Figure 3A, first and third panels, lanes 2-4). We observed strong inhibition of RANKL-induced ERK and p38 phosphorylation by IL-27 (Figure 3A, first and third panels, lanes 6-8). In addition, RANKL induced the expected phosphorylation and rapid degradation of I κ B α (Figure 3B, top panels, lanes 2-4) indicating activation of the classical NF- κ B pathway, while IL-27 prevented RANKL-induced I κ B α phosphorylation and degradation (Figure 3B, top panels, lanes 6-8). IFN γ , the prototypic STAT1 activating cytokine, inhibits RANKL signaling in murine osteoclast precursors by inducing rapid degradation of the adapter TRAF6 that lies upstream of NF- κ B and MAPK activation (35). In our system IL-27 had no effect on the expression of TRAF6 protein (Figure 3B, bottom panel). RANKL-mediated induction of AP-1 proteins, including Fos and Jun, is important for osteoclastogenesis. Induction of Fos by RANKL was not consistently observed in our human osteoclastogenesis system (data not shown). However, RANKL consistently induced c-Jun protein and this induction was detectable in nuclear extracts for at least 3h following RANKL stimulation (Figure 3C, lanes 2-4). In the presence of IL-27 the RANKL-mediated induction of c-Jun was abrogated (Figure 3C, lanes 6-8). We then

investigated whether IL-27 inhibits expression of RANK, which could explain IL-27-mediated inhibition of several RANK signaling pathways. Culture with MCSF induced the expected increase in RANK mRNA that peaked at 24h and remained elevated at 48h of culture (Figure 3D, black bars). IL-27 partially suppressed M-CSF-mediated induction of RANK mRNA expression in all donors tested (>10) (Figure 3D, grey bars). When we tested the effects of IL-27 on the expression of the M-CSF receptor c-Fms, there was variability among donors in the effects of IL-27 on c-Fms mRNA levels and cell surface expression, while IL-27 strongly inhibited osteoclastogenesis in all donors tested (n >10). Because IL-27 inhibited osteoclastogenesis effectively even in donors where c-Fms expression was not affected, we conclude that an effect of IL-27 on c-Fms expression is not a major mechanism to explain the observed inhibition of osteoclastogenesis. In sum, the results demonstrate that IL-27 inhibits RANK-induced signaling that is required for NFATc1 expression, and suggest that this inhibition may be mediated in part by downregulation of RANK expression.

IL-27 suppresses TREM-2 mRNA expression

As the strong inhibition of osteoclastogenesis and NFATc1 expression by IL-27 could not be solely explained by inhibition of RANK expression, we investigated the effects of IL-27 on other pathways implicated in the induction of NFATc1 expression. The immunoreceptors TREM-2, OSCAR, SIRP β 1 and ILT7 (homolog of murine PIR-A) and integrin α V β 3 that signal via ITAM-containing adaptors DAP12 and FcR γ cooperate with RANK signaling pathways to induce NFATc1 expression and osteoclastogenesis (29-32). We investigated the effects of IL-27 on costimulatory receptors and DAP12/FcR γ expression. The expression of TREM-2 increased during the early differentiation of osteoclast precursors, and this increase in TREM-2 expression

was strongly suppressed by IL-27 (Figure 4A). In contrast, expression of OSCAR, SIRP β 1, DAP12 and FcR γ , did not substantially change during differentiation of osteoclast precursors, and was not suppressed by IL-27 (Figure 4B and 4C). ILT7 mRNA expression was moderately increased by IL-27 (Figure 4B). As costimulatory signaling is important for NFATc1 expression and TREM-2 plays a key role in costimulation of human osteoclastogenesis (33, 34), these observations suggest down-regulation of TREM-2 as a mechanism by which IL-27 suppresses NFATc1 induction and inhibits human osteoclastogenesis.

Synovial fluid macrophages derived from RA patients are refractory to IL-27.

Given the above described inhibitory effects of IL-27 in human osteoclastogenesis, we wondered whether IL-27 exerts these regulatory functions in CD14⁺ cells derived from synovial fluid (SF) of patients with active rheumatoid arthritis. SF-derived CD14⁺ cells from RA patients responded to IFN- γ stimulation with activation of STAT1 (Figure 5A, first panel, lane 2) and a robust induction of *CXCL10* gene expression (Figure 5B, white bar). Surprisingly, following stimulation with IL-27 we observed a very faint activation of STAT1 (Figure 5A, top panel, lane 3) that was inadequate to induce STAT1-target gene expression (including *CXCL10*, *CXCL9*, IRF-1 and STAT1, Figure 5B and data not shown; $p < 0.001$, Student's *t* test). These results were consistently observed in synovial macrophages from all five patients tested and suggest that cells derived from the joints of many patients with active RA are only minimally responsive to IL-27. The latter implies that, within the microenvironment of an inflamed joint, IL-27 may not exert its regulatory functions.

IL-27 moderately inhibits murine osteoclastogenesis due to low expression of WSX-1.

We have recently reported that murine macrophages are minimally responsive to IL-27 (10) and in this study we wished to test whether IL-27 has an effect on murine osteoclast differentiation. Because we wished to use murine monocytes as osteoclast precursors (to directly compare to human monocytes), we first tested the responsiveness of murine monocytes to IL-27. Following stimulation of murine monocytes with IFN- γ (that was used as a positive control) we observed the expected activation of STAT1 and STAT3 (Figure 6A, first and third panel, lanes 2-4) and induction of classical STAT1-target genes (including IP-10, MIG, IRF-1, data not shown). Similarly to murine macrophages (10), in murine monocytes following IL-27 stimulation there was no detectable activation of STAT1 and STAT3 (Figure 6A, first and third panel, lanes 5-7) and minimal induction of STAT1-target genes (data not shown). Because murine monocytes did not differentiate efficiently into osteoclasts in our system, we used bone marrow-derived osteoclast precursors, a standard approach to study murine osteoclastogenesis, to test the effects of IL-27. As expected, addition of RANKL to murine bone marrow-derived osteoclast precursors resulted in the formation of large multinucleated TRAP⁺ cells within 5 days (Figure 6B, upper panels). When IL-27 was added (prior to or simultaneously with RANKL) in doses ranging from 1-100ng/ml there was a minimal to moderate inhibition of osteoclast formation (Figure 6B, panels 3-5). Similarly, the number of TRAP⁺ multinucleated cells (Figure 6C) and expression of osteoclast marker genes (data not shown) were only moderately lower in the presence of IL-27. In stark contrast to the human system, IL-27 had minimal effect on RANKL-mediated induction of NFATc1 expression in murine osteoclast precursors (data not shown), further supporting the notion that murine osteoclast precursors are moderately responsive to IL-27. In our recent report (10), we have shown that IL-6 induces a substantial activation of STAT-3 in murine myeloid

cells, indicating that gp130, the shared receptor subunit for IL-6 and IL-27 receptors, is expressed on these cells. We next investigated the expression levels of the WSX-1 subunit of the IL-27 receptor in human and murine cells. We found that human lymphocytes and osteoclast precursors express WSX-1 mRNA at comparable levels (Figure 6D, lanes 1-2), while WSX-1 expression is low in murine osteoclast precursors compared to murine splenocytes (predominantly lymphocytes) (Figure 6D, lanes 3-4). The latter suggests that low expression of WSX-1 in murine osteoclast precursors is a potential explanation for the modest responsiveness of these cells to the effects of IL-27.

Discussion

In this study we have found that IL-27 is a potent inhibitor of human osteoclastogenesis. This effect is mediated by directly targeting the early stages of differentiation of precursor cells into osteoclasts. In the presence of IL-27 we observed down-regulation of RANK and TREM-2 expression, an inhibition of MAPK- and NF- κ B- pathways downstream of RANK and most importantly an abrogation of RANKL-induced c-Jun and NFATc1 expression. In stark contrast to blood-derived CD14⁺ cells from healthy donors, SF-derived CD14⁺ cells from RA patients were refractory to IL-27. Our observations, combined with the well-characterized anti-inflammatory functions of IL-27 (3), suggest that IL-27 has the potential to limit the extent of bone destruction in the setting of infection or inflammation, but that this homeostatic function of IL-27 can be compromised during chronic inflammation, such as occurs in rheumatoid arthritis.

NFATc1 is essential for osteoclast differentiation in vitro and in vivo (44, 45). We observed a remarkable suppression of NFATc1 mRNA and protein expression by IL-27 in our

system. Signaling pathways downstream of RANK and immunoreceptors (including TREM-2) co-operate leading to the activation of calcium signaling, the activation of NFATc1 and finally strong induction of NFATc1 itself through an auto-amplification loop (24). In our study, the attenuation of MAPK- and NF- κ B-signaling pathways downstream of RANK correspond to a mechanism that contributes to the suppression of NFATc1 expression by IL-27. IL-27 appears to regulate the levels of c-Jun protein that is induced downstream of MAPK pathways. c-Jun is the partner of c-Fos for the formation AP-1, a transcription factor essential for the induction of NFATc1 (46). A potential explanation for the inhibition of the MAPK and NF- κ B signaling pathways observed in our system is the down-regulation of RANK expression by IL-27 in human osteoclast progenitors. This downregulation of RANK was partial, suggesting that it contributes to diminished responses to RANKL only under conditions where osteoclast precursors are exposed to low concentrations of RANKL (as in the case of the inflamed synovium in rheumatoid arthritis). In contrast, TREM-2 expression was effectively inhibited by IL-27, indicating that IL-27 suppresses costimulation of RANK signaling.

We have previously reported that IL-27 has a STAT1-dominant, IFN γ -like effect on human monocytes (10). IFN γ is also a powerful suppressor of osteoclast differentiation by a STAT1-mediated mechanism (42). Similar to our observations with IL-27, IFN- γ inhibits the activation of MAPK and NF- κ B pathways downstream of RANK (35). IFN γ inhibits RANK signaling in murine osteoclast precursors by inducing rapid degradation of the signaling adapter TRAF6 that functions downstream of RANK (35). In our system the protein levels of TRAF6 were not reduced in IL-27 treated cells prior to or after RANKL stimulation, indicating that there was no overt degradation of TRAF6. This observation suggests that IL-27 and IFN γ inhibit osteoclastogenesis by different mechanisms, although it is possible that differences in TRAF6

protein regulation and stability between murine and human osteoclast precursors contributes to the observed differences.

In the current study we have found that SF macrophages derived from joint effusions of patients with active RA retain responsiveness to IFN- γ but are refractory to IL-27. We have recently reported that resistance to IL-27 can be induced by LPS by a p38-dependent mechanism (10). These findings suggest that inflammatory factors that activate p38 can induce a state of refractoriness to IL-27, and in this context we hypothesize that, within the inflammatory microenvironment of the joint, where p38 is known to be activated, SF macrophages are exposed to stimuli that render them refractory to the regulatory effects of IL-27. The level of refractoriness is likely to wax and wane with disease activity, but the data suggest that patients with active disease would be refractory to IL-27 therapy. However, greater understanding of mechanisms that render cells refractory to IL-27 could potentially lead to therapeutic manipulations to restore cell responsiveness to the regulatory functions of IL-27. Under such conditions, endogenous IL-27 would have a beneficial effect in suppressing bone resorption, and exogenous IL-27 might represent an effective therapy.

Recently, several differences have become apparent in the regulation of osteoclastogenesis and bone remodeling between humans and mice (47). For example, TREM-2 deficiency in humans is associated with impaired osteoclastogenesis, aberrant bone remodeling and Nasu-Hakola disease (also called polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy) (33, 34). In contrast, mice deficient in TREM-2 do not have a clear bone phenotype in vivo and have increased osteoclastogenesis in vitro (48). Our observations add to these species differences by showing substantially less effective inhibition of osteoclast differentiation by IL-27 with mouse relative to human osteoclast precursors. One potential

explanation of this difference is that murine osteoclast precursors are moderately responsive to IL-27 due to low expression of WSX-1. An additional explanation is likely related to differences in TREM-2 regulation and function in humans and mice, and the contribution of TREM-2 downregulation to the suppressive effects of IL-27 in human cells. In addition, we have shown that in human cells IL-27 is a powerful inhibitor of osteoclastogenesis directly targeting osteoclast progenitors, while our findings with murine bone marrow-derived osteoclast progenitors and evidence from other groups suggest that in murine systems IL-27 regulates osteoclast differentiation mainly indirectly by affecting cell populations other than the osteoclast precursors. It has been reported that IL-27 induces activation of STAT-1 and STAT-3 in murine osteoblasts, but no profound functional consequences were found (41). In the same study, IL-27 inhibited osteoclastogenesis indirectly possibly by regulating the functions of activated CD4⁺ T-cells. Along the same lines, another study identified murine Th17 cells as the exclusive osteoclastogenic subset among the known CD4⁺ T-cell lineages (49) and several reports suggest that IL-27 suppresses Th17 polarization (12, 13, 50).

The findings of our current study provide evidence that IL-27 is a powerful inhibitor of human osteoclastogenesis, but the perspective of using IL-27 as a potential treatment in human diseases including rheumatoid arthritis needs further investigation and careful evaluation.

References

1. Kastelein RA, Hunter CA, Cua DJ. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol* 2007;25:221-42.
2. Yoshida H, Yoshiyuki M. Regulation of immune responses by interleukin-27. *Immunol Rev* 2008;226:234-47.
3. Batten M, Ghilardi N. The biology and therapeutic potential of interleukin 27. *J Mol Med* 2007;85(7):661-72.
4. Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* 2002;16(6):779-90.
5. Pflanz S, Hibbert L, Mattson J, Rosales R, Vaisberg E, Bazan JF, et al. WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J Immunol* 2004;172(4):2225-31.
6. Lucas S, Ghilardi N, Li J, de Sauvage FJ. IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(25):15047-52.
7. Yoshimura T, Takeda A, Hamano S, Miyazaki Y, Kinjyo I, Ishibashi T, et al. Two-sided roles of IL-27: induction of Th1 differentiation on naive CD4+ T cells versus suppression of proinflammatory cytokine production including IL-23-induced IL-17 on activated CD4+ T cells partially through STAT3-dependent mechanism. *J Immunol* 2006;177(8):5377-85.
8. Lang R. Tuning of macrophage responses by Stat3-inducing cytokines: molecular mechanisms and consequences in infection. *Immunobiology* 2005;210(2-4):63-76.
9. Wang S, Miyazaki Y, Shinozaki Y, Yoshida H. Augmentation of antigen-presenting and Th1-promoting functions of dendritic cells by WSX-1(IL-27R) deficiency. *J Immunol* 2007;179(10):6421-8.
10. Kalliolias GD, Ivashkiv LB. IL-27 activates human monocytes via STAT1 and suppresses IL-10 production but the inflammatory functions of IL-27 are abrogated by TLRs and p38. *J Immunol* 2008;180(9):6325-33.
11. Villarino A, Hibbert L, Lieberman L, Wilson E, Mak T, Yoshida H, et al. The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection. *Immunity* 2003;19(5):645-55.
12. Batten M, Li J, Yi S, Kljavin NM, Danilenko DM, Lucas S, et al. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* 2006;7(9):929-36.
13. Amadi-Obi A, Yu CR, Liu X, Mahdi RM, Clarke GL, Nussenblatt RB, et al. TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat Med* 2007;13(6):711-8.
14. Artis D, Villarino A, Silverman M, He W, Thornton EM, Mu S, et al. The IL-27 receptor (WSX-1) is an inhibitor of innate and adaptive elements of type 2 immunity. *J Immunol* 2004;173(9):5626-34.
15. Fitzgerald DC, Zhang GX, El-Behi M, Fonseca-Kelly Z, Li H, Yu S, et al. Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells. *Nat Immunol* 2007;8(12):1372-9.

16. Awasthi A, Carrier Y, Peron JP, Bettelli E, Kamanaka M, Flavell RA, et al. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat Immunol* 2007;8(12):1380-9.
17. Stumhofer JS, Silver JS, Laurence A, Porrett PM, Harris TH, Turka LA, et al. Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol* 2007;8(12):1363-71.
18. Goldberg R, Wildbaum G, Zohar Y, Maor G, Karin N. Suppression of ongoing adjuvant-induced arthritis by neutralizing the function of the p28 subunit of IL-27. *J Immunol* 2004;173(2):1171-8.
19. Cao Y, Doodles PD, Glant TT, Finnegan A. IL-27 induces a Th1 immune response and susceptibility to experimental arthritis. *J Immunol* 2008;180(2):922-30.
20. Niedbala W, Cai B, Wei X, Patakas A, Leung BP, McInnes IB, et al. Interleukin 27 attenuates collagen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008;67(10):1474-9.
21. Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev* 2008;223:87-113.
22. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003;423(6937):356-61.
23. Tanaka S, Nakamura K, Takahashi N, Suda T. Role of RANKL in physiological and pathological bone resorption and therapeutics targeting the RANKL-RANK signaling system. *Immunol Rev* 2005;208:30-49.
24. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* 2007;7(4):292-304.
25. Xing L, Schwarz EM, Boyce BF. Osteoclast precursors, RANKL/RANK, and immunology. *Immunol Rev* 2005;208:19-29.
26. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423(6937):337-42.
27. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93(2):165-76.
28. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(7):3597-602.
29. Humphrey MB, Lanier LL, Nakamura MC. Role of ITAM-containing adapter proteins and their receptors in the immune system and bone. *Immunol Rev* 2005;208:50-65.
30. Koga T, Inui M, Inoue K, Kim S, Suematsu A, Kobayashi E, et al. Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature* 2004;428(6984):758-63.
31. Zou W, Kitaura H, Reeve J, Long F, Tybulewicz VL, Shattil SJ, et al. Syk, c-Src, the alphavbeta3 integrin, and ITAM immunoreceptors, in concert, regulate osteoclastic bone resorption. *J Cell Biol* 2007;176(6):877-88.
32. Mocsai A, Humphrey MB, Van Ziffle JA, Hu Y, Burghardt A, Spusta SC, et al. The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor gamma-chain (FcRgamma) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(16):6158-63.
33. Cella M, Buonsanti C, Strader C, Kondo T, Salmaggi A, Colonna M. Impaired differentiation of osteoclasts in TREM-2-deficient individuals. *J Exp Med* 2003;198(4):645-51.

34. Paloneva J, Mandelin J, Kiialainen A, Bohling T, Prudlo J, Hakola P, et al. DAP12/TREM2 deficiency results in impaired osteoclast differentiation and osteoporotic features. *J Exp Med* 2003;198(4):669-75.
35. Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, et al. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature* 2000;408(6812):600-5.
36. Takayanagi H, Kim S, Matsuo K, Suzuki H, Suzuki T, Sato K, et al. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta. *Nature* 2002;416(6882):744-9.
37. Shioi A, Teitelbaum SL, Ross FP, Welgus HG, Suzuki H, Ohara J, et al. Interleukin 4 inhibits murine osteoclast formation in vitro. *J Cell Biochem* 1991;47(3):272-7.
38. Duplomb L, Baud'huin M, Charrier C, Berreur M, Trichet V, Blanchard F, et al. Interleukin-6 inhibits receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-induced osteoclastogenesis by diverting cells into the macrophage lineage: key role of Serine727 phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3. *Endocrinology* 2008;149(7):3688-97.
39. Xu LX, Kukita T, Kukita A, Otsuka T, Niho Y, Iijima T. Interleukin-10 selectively inhibits osteoclastogenesis by inhibiting differentiation of osteoclast progenitors into preosteoclast-like cells in rat bone marrow culture system. *J Cell Physiol* 1995;165(3):624-9.
40. Chen L, Wei XQ, Evans B, Jiang W, Aeschlimann D. IL-23 promotes osteoclast formation by up-regulation of receptor activator of NF-kappaB (RANK) expression in myeloid precursor cells. *Eur J Immunol* 2008;38(10):2845-54.
41. Kamiya S, Nakamura C, Fukawa T, Ono K, Ohwaki T, Yoshimoto T, et al. Effects of IL-23 and IL-27 on osteoblasts and osteoclasts: inhibitory effects on osteoclast differentiation. *J Bone Miner Metab* 2007;25(5):277-85.
42. Takayanagi H, Sato K, Takaoka A, Taniguchi T. Interplay between interferon and other cytokine systems in bone metabolism. *Immunol Rev* 2005;208:181-93.
43. Sorensen MG, Henriksen K, Schaller S, Henriksen DB, Nielsen FC, Dziegiel MH, et al. Characterization of osteoclasts derived from CD14+ monocytes isolated from peripheral blood. *J Bone Miner Metab* 2007;25(1):36-45.
44. Takayanagi H. The role of NFAT in osteoclast formation. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1116:227-37.
45. Aliprantis AO, Ueki Y, Sulyanto R, Park A, Sigrist KS, Sharma SM, et al. NFATc1 in mice represses osteoprotegerin during osteoclastogenesis and dissociates systemic osteopenia from inflammation in cherubism. *J Clin Invest* 2008;118(11):3775-89.
46. Wagner EF, Eferl R. Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. *Immunol Rev* 2005;208:126-40.
47. Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J Mol Med* 2005;83(3):170-9.
48. Colonna M, Turnbull I, Klesney-Tait J. The enigmatic function of TREM-2 in osteoclastogenesis. *Adv Exp Med Biol* 2007;602:97-105.
49. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 2006;203(12):2673-82.

50. Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, Huang E, Tato CM, Johnson LM, et al. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol* 2006;7(9):937-45.

Figure Legends

Figure 1

IL-27 inhibits human osteoclastogenesis in a dose- and time-dependent manner.

Freshly isolated human CD14⁺ cells were cultured with MCSF (20ng/ml) for 48h and RANKL (40ng/ml) was added on Day 3 as described in Materials and Methods. IL-27 (3, 10, 30 and 100ng/ml) was added at the initiation of cultures (Day1) or later (Day 3 or Day 5). (A and B), TRAP positive multinucleated (> 3 nuclei) cells were counted 5 days after RANKL addition and representative data of one out of three independent experiments are shown as mean $\pm$ SD from triplicate wells of 96 well plates (* = $p > 0.05$, ** = $p < 0.05$ and *** = $p < 0.01$. p values were calculated by Student's t test). C, Cathepsin K mRNA was measured by using real-time PCR and normalized relative to GAPDH expression. The means $\pm$ SD of triplicate determinants in a representative experiment of three independent experiments are shown; small SDs are not readily apparent because of large inductions. D (left panels), freshly isolated human monocytes were cultured as in A and osteoclast function was measured by a resorption pit formation assay. D (right panel), Human CD14⁺ monocytes were cultured with MCSF (20ng/ml) in the presence or absence of IL-27 (100ng/ml) for 2days. Cell viability was measured by MTT assay. Representative results of at least three independent experiments are shown.

Figure 2

IL-27 abrogates RANKL-mediated induction of NFATc1.

A and B, Freshly isolated human CD14⁺ cells were cultured with MCSF (20ng/ml) in the presence or absence of IL-27 (100ng/ml) for 48h and then were stimulated with RANKL. C and D, Freshly isolated human CD14⁺ cells were cultured with MCSF (20ng/ml) for 48h and then

were stimulated with RANKL (40ng/ml) in the presence or absence of IL-27 (100ng/ml). NFATc1 protein expression 24, 48 and 72h following RANKL stimulation was measured by immunoblotting (A and C). NFATc1 mRNA was measured using real-time PCR and normalized relative to GAPDH expression (B and D). Representative results of at least three independent experiments are shown.

Figure 3

IL-27 inhibits RANKL-mediated activation of MAPK and NF- κ B pathways and induction of c-Jun.

Freshly isolated human CD14⁺ cells were cultured with MCSF (20ng/ml) in the presence or absence of IL-27 (100ng/ml) for 48h. Control and IL27-treated cells were stimulated with RANKL (40ng/ml) for 5, 10 and 15 minutes (A and B) or for 0.5, 1 and 3h (C). Immunoblotting was used to measure threonine 202/tyrosine 204 phosphorylation of Erk1/Erk2 and threonine 180/tyrosine 182 phosphorylation of p38 (A), serine 32 phosphorylation of I κ B α and total I κ B α (B), total TRAF6 (B), and nuclear c-Jun and TBP proteins (C). Representative results of at least five independent experiments are shown. D, RANK mRNA was measured in control and IL-27-treated cells using real-time PCR and normalized relative to GAPDH expression. The means $\pm$ SD of triplicate determinants in a representative experiment of three independent experiments are shown; small SDs are not readily apparent because of large inductions.

Figure 4

IL-27 inhibits TREM-2 expression.

Freshly isolated human CD14⁺ cells were cultured with MCSF (20ng/ml) in the presence or absence of IL-27 (100ng/ml) for 24 and 48h. TREM-2 mRNA (A), OSCAR mRNA, SIRP β 1 mRNA and ILT7 mRNA (B) and DAP12 and FcR γ mRNA (C) was measured using real-time PCR and normalized relative to GAPDH expression. Representative results of at least four independent experiments are shown.

Figure 5

Synovial fluid macrophages derived from Rheumatoid Arthritis patients are refractory to IL-27. Freshly isolated CD14⁺ cells derived from synovial fluid of five RA patients were stimulated for 15min (A) or 3h (B) with hIFN- γ (100U/ml) or hIL-27 (100ng/ml). A, tyrosine 701 phosphorylation of STAT1 was measured by immunoblotting. Representative results of one out of five independent experiments are shown. B, CXCL10 mRNA expression was measured using real-time PCR and normalized relative to GAPDH expression ($p < 0.001$ by paired Student's t test, $n=5$).

Figure 6

IL-27 is a moderate inhibitor of in vitro osteoclastogenesis in murine systems.

A, Murine monocytes were stimulated for 5, 10 and 20min with mIFN- γ (100U/ml) or mIL-27 (100ng/ml). Immunoblotting was used to measure tyrosine 701 phosphorylation of STAT1 and tyrosine 705 phosphorylation of STAT3. (B-C) Bone marrow-derived osteoclast precursors obtained from C57BL/6J mice were cultured in the presence of MCSF (20ng/ml) and RANKL (80ng/ml) was added as described in Materials and Methods. IL-27 (1, 10 and 100ng/ml) was

added 1 day before RANKL (Pretreatment) or simultaneously with RANKL. (B and C), TRAP positive multinucleated (> 3 nuclei) cells were counted 5 days after RANKL addition and representative data of one out of three independent experiments are shown as mean $\pm$ SD from triplicate wells of 96 well plates (* = $p>0.05$ and ** = $p<0.05$. p values were calculated by Student's t test). D, The expression of WSX-1 m-RNA was measured by PCR in freshly isolated human CD14⁺ and CD14⁻ cells and in murine BMDM and splenocytes.

Figure 1. IL-27 inhibits human osteoclastogenesis in a dose- and time-dependent manner. Freshly isolated human CD14⁺ cells were cultured with MCSF (20ng/ml) for 48h and RANKL (40ng/ml) was added on Day 3 as described in Materials and Methods. IL-27 (3, 10, 30 and 100ng/ml) was added at the initiation of cultures (Day1) or later (Day 3 or Day 5). (A and B), TRAP positive multinucleated (> 3 nuclei) cells were counted 5 days after RANKL addition and representative data of one out of three independent experiments are shown as mean $\pm$ SD from triplicate wells of 96 well plates (* = $p > 0.05$, ** = $p < 0.05$ and *** = $p < 0.01$. p values were calculated by Student's t test). C, Cathepsin K mRNA was measured by using real-time PCR and normalized relative to GAPDH expression. The means $\pm$ SD of triplicate determinants in a representative experiment of three independent experiments are shown; small SDs are not readily apparent because of large inductions. D (left panels), freshly isolated human monocytes were cultured as in A and osteoclast function was measured by a resorption pit formation assay. D (right panel), Human CD14⁺ monocytes were cultured with MCSF (20ng/ml) in the presence or absence of IL-27 (100ng/ml) for 2days. Cell viability was measured by MTT assay. Representative results of at least three independent experiments are shown.

Figure 2. IL-27 abrogates RANKL-mediated induction of NFATc1. A and B, Freshly isolated human CD14⁺ cells were cultured with MCSF (20ng/ml) in the presence or absence of IL-27 (100ng/ml) for 48h and then were stimulated with RANKL. C and D, Freshly isolated human CD14⁺ cells were cultured with MCSF (20ng/ml) for 48h and then were stimulated with RANKL (40ng/ml) in the presence or absence of IL-27 (100ng/ml). NFATc1 protein expression 24, 48 and 72h following RANKL stimulation was measured by immunoblotting (A and C). NFATc1 mRNA was measured using real-time PCR and normalized relative to GAPDH expression (B and D). Representative results of at least three independent experiments are shown.

Figure 3. IL-27 inhibits RANKL-mediated activation of MAPK and NF- κ B pathways and induction of c-Jun. Freshly isolated human CD14⁺ cells were cultured with MCSF (20ng/ml) in the presence or absence of IL-27 (100ng/ml) for 48h. Control and IL27-treated cells were stimulated with RANKL (40ng/ml) for 5, 10 and 15 minutes (A and B) or for 0.5, 1 and 3h (C). Immunoblotting was used to measure threonine 202/tyrosine 204 phosphorylation of Erk1/Erk2 and threonine 180/tyrosine 182 phosphorylation of p38 (A), serine 32 phosphorylation of I κ B α and total I κ B α (B), total TRAF6 (B), and nuclear c-Jun and TBP proteins (C). Representative results of at least five independent experiments are shown. D, RANK mRNA was measured in control and IL-27-treated cells using real-time PCR and normalized relative to GAPDH expression. The means $\pm$ SD of triplicate determinants in a representative experiment of three independent experiments are shown; small SDs are not readily apparent because of large inductions.

Figure 4. IL-27 inhibits TREM-2 expression. Freshly isolated human CD14⁺ cells were cultured with MCSF (20ng/ml) in the presence or absence of IL-27 (100ng/ml) for 24 and 48h. TREM-2 mRNA (A), OSCAR mRNA, SIRPβ1 mRNA and ILT7 mRNA (B) and DAP12 and FcRγ mRNA (C) was measured using real-time PCR and normalized relative to GAPDH expression. Representative results of at least four independent experiments are shown.

Figure 5. Synovial fluid macrophages derived from Rheumatoid Arthritis patients are refractory to IL-27. Freshly isolated CD14⁺ cells derived from synovial fluid of five RA patients were stimulated for 15min (A) or 3h (B) with hIFN- γ (100U/ml) or hIL-27 (100ng/ml). A, tyrosine 701 phosphorylation of STAT1 was measured by immunoblotting. Representative results of one out of five independent experiments are shown. B, CXCL10 mRNA expression was measured using real-time PCR and normalized relative to GAPDH expression (p<0.001 by paired Student's *t* test, n=5).

Figure 6. IL-27 is a moderate inhibitor of in vitro osteoclastogenesis in murine systems. A, Murine monocytes were stimulated for 5, 10 and 20min with mIFN- γ (100U/ml) or mIL-27 (100ng/ml). Immunoblotting was used to measure tyrosine 701 phosphorylation of STAT1 and tyrosine 705 phosphorylation of STAT3. (B-C) Bone marrow-derived osteoclast precursors obtained from C57BL/6J mice were cultured in the presence of MCSF (20ng/ml) and RANKL (80ng/ml) was added as described in Materials and Methods. IL-27 (1, 10 and 100ng/ml) was added 1 day before RANKL (Pretreatment) or simultaneously with RANKL. (B and C), TRAP positive multinucleated (> 3 nuclei) cells were counted 5 days after RANKL addition and representative data of one out of three independent experiments are shown as mean $\pm$ SD from triplicate wells of 96 well plates (* = $p > 0.05$ and ** = $p < 0.05$, p values were calculated by Student's t test). D, The expression of WSX-1 m-RNA was measured by PCR in freshly isolated human CD14+ and CD14- cells and in murine BMDM and splenocytes.