

## LAVORO ORIGINALE

# Determinazione all'immunoblotting degli anticorpi sierici anti-B/B' UsnRNP nei pazienti con connettiviti\*

## *Detection of serum anti-B/B' UsnRNP antibodies in patients with connective tissue diseases by immunoblotting*

A. Ghirardello, A. Doria, S. Zampieri, D. Villalta<sup>1</sup>, R. Tozzoli<sup>2</sup>, L. Iaccarino, R. Bendo, P.F. Gambari

Cattedra e Divisione di Reumatologia, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università degli Studi di Padova

<sup>1</sup>Servizio di Immunologia e Microbiologia, Azienda Ospedaliera "S. Maria degli Angeli" Pordenone;

<sup>2</sup>Laboratorio di Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia, Ospedale Civile, Latisana (UD)

### SUMMARY

**Objective:** To investigate the reliability of the immunoblot method in the detection of serum immunoreactivity towards the B/B' polypeptides of U small nuclear ribonucleoproteins (UsnRNP) and to assess the significance of these antibodies in connective tissue disease (CTD) patients.

**Methods:** We tested the sera of 348 patients with CTD (101 SLE, 51 systemic sclerosis, 53 primary Sjogren's syndrome, 27 poly/dermatomyositis, 15 rheumatoid arthritis and 101 overlap CTD), of 31 matched healthy subjects and 13 patients with primary Epstein-Barr virus (EBV) infection with high titre IgG anti-EBV antibodies. IgG anti-UsnRNP antibodies were determined by immunoblotting on nuclear extract from Raji cells (an EBV-immortalised human B lymphoid cell line) and Jurkat cells (a human T lymphoid cell line). Anti-dsDNA antibodies were detected by indirect immunofluorescence on *Crithidia luciliae* and anti-ENA by counterimmunoelectrophoresis. Anti-dsDNA activity and avidity were measured in SLE sera by ELISA with Scatchard analysis. Results were statistically analysed by chi-square and Mann-Whitney tests.

**Results:** A high frequency of anti-B/B' antibodies was found in the sera of CTD patients, confined to SLE (54.4%) and overlap CTD with SLE features (55.2%). Anti-B/B' immune reactivity was closely associated with other anti-UsnRNP specificities, gel precipitating anti-nRNP and anti-P antibodies. Nine out of 15 (60%) anti-B/B' positive/anti-ENA negative lupus sera on Raji blots were confirmed to be positive also on Jurkat blots. The sera from patients with EBV infection provided, on Raji blots, completely different band patterns from those obtained with auto-immune sera.

**Conclusions.** The Sm B/B' proteins are the predominant or, at least, the most frequently targeted antigens of the UsnRNP auto-immune response in SLE and "lupus-like" overlap CTD. Moreover, anti-B/B' is diagnostically specific for CTD with SLE features. Immunoblotting on human B lymphoid cells is a reliable method, in terms of sensitivity and specificity, for the detection of anti-Sm B/B' antibodies.

Reumatismo, 2002; 54(4):324-330

### INTRODUZIONE

Le connettiviti (CTD) sono malattie reumatiche sistemiche autoimmuni. Una delle più tipiche alterazioni immunologiche a sostegno della patogenesi autoimmunitaria del danno d'organo è la presenza nei pazienti di autoanticorpi sierici non-organo specifici diretti contro antigeni "self" intracellulari, di superficie, o circolanti. Gli antigeni

intracellulari bersaglio in vivo della risposta autoimmune sistemica sono generalmente complessi proteici o ribonucleoproteici (DNA/RNA e proteine) (1). Tra questi, i cosiddetti antigeni Sm e U1RNP appartengono alla categoria delle piccole ribonucleoproteine nucleari (U small nuclear ribonucleoproteins, UsnRNP) e compongono lo "spliceosome" cioè quel complesso di particelle ribonucleoproteiche subnucleari che regola lo "splicing" dell'RNA pre-messaggero. I componenti Sm e U1RNP sono autoantigeni specifici e immunogeni nel LES e in connettiviti con quadro patologico simile al LES o "lupus-like" (2). Le UsnRNP sono complessi costituiti da una molecola di RNA nucleare a basso peso molecolare ricca in uridina (UsnRNA) associata ad un numero variabile di pro-

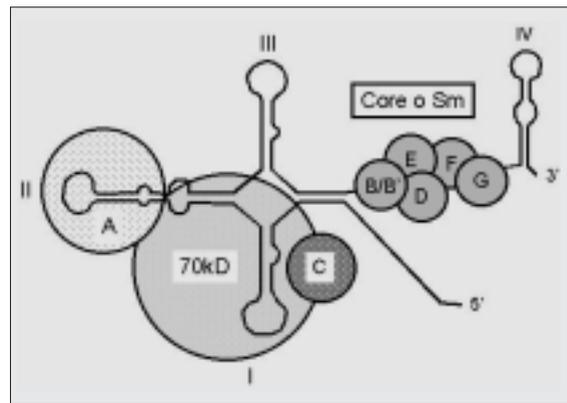
\*Lavoro premiato al XXXVIII Congresso SIR di Padova, 2001

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott. Andrea Doria, Cattedra e Divisione di Reumatologia  
Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche,  
Policlinico Universitario, Via Giustiniani 2, 35128 Padova, Italy  
e-mail: adoria@unipd.it

teine, alcune comuni a tutte le UsnRNP ("proteine core o Sm") e identificate come B (28kDa), B' (29kDa), D (16kDa), E (13kDa), F (11 kDa), G (9kDa), altre presenti solo in alcune UsnRNP ("proteine specifiche"). La particella U1RNP, la più abbondante e funzionalmente essenziale nella cellula eucariotica, è costituita da una molecola di U1RNA, dalle proteine core e da tre proteine U1RNP specifiche, U1-70kDa (68-70kDa), U1-A (34kDa) e U1-C (22kDa) (Fig. 1) (3, 4).

Tra le metodiche utilizzate per la determinazione degli anticorpi anti-Sm/RNP, l'immunoblotting è una tecnica qualitativa che consente di identificare la fine specificità anticorpale, cioè di caratterizzare il siero del paziente sulla base del pattern di reattività verso i vari peptidi dei complessi UsnRNP (5, 6). Un recente studio (7) eseguito con l'immunoblotting sulla caratterizzazione dello sviluppo nell'uomo della risposta autoimmune verso i vari peptidi del complesso U1RNP, ha dimostrato che l'immunità anti-U1RNP esordisce ed evolve secondo un pattern ben definito che vede nei peptidi B/B' e 70kDa i primi target immunogenici. Le altre specificità antigeniche (U1-A, U1-C, Sm-D) compaiono più tardivamente per fenomeni di "spreading". In particolare, la risposta Sm-D compare solo nel contesto di una estensione massiva dell'immunoreattività anti-U1RNP, a conferma della sua associazione con un quadro di malattia immunologicamente più complesso e clinicamente più severo (8). Lo stesso studio ha dimostrato anche una elevata prevalenza della reattività anti-B/B' nella risposta immune anti-U1RNP, che può avere una duplice spiegazione: il maggiore potere immunogenico della doppietta B/B' rispetto agli altri peptidi U1RNP, oppure una preferenziale tendenza in soggetti predisposti a sviluppare una reazione immunitaria verso epitopi "non-self" o cross-reagenti simili a quelli espressi dai peptidi B/B' ("B/B' molecular mimics"). Uno degli epitopi immunodominanti nello sviluppo degli anticorpi umani anti-Sm è il peptide ricco di residui prolinici PPPGMRPP (9), molto simile al peptide PPPGRRP presente nella sequenza aminoacidica dell'antigene nucleare-1 del virus di Epstein-Barr (EBNA-1) (10). Sia il peptide B/B' che il peptide simile EBNA-1 specifico sono immunostimolanti ed inducono nell'animale una risposta autoimmune e una sindrome lupus-like (9, 10). La sieropositività EBV specifica è significativamente più frequente nel LES (11) e correlata alla risposta autoimmune Sm B/B' e D per molti aspetti (10, 12, 13). Per cui l'infezione da EBV e la sieropositività EBV sembrano chia-



**Figura 1** - Struttura secondaria dell'autoantigene U1RNP. Sono illustrate le reciproche interazioni dell'U1RNA e delle proteine Sm e U1RNP-specifiche.

mate in causa come possibile fattore eziologico dell'autoimmunità Sm nel LES e, più in generale, nell'eziopatogenesi del LES (14).

Scopo del nostro studio è stato quello di determinare la prevalenza e il significato clinico degli anticorpi anti-B/B' nelle connettiviti, ricercati su siero con la metodica dell'immunoblotting, usando come fonte antigenica lisato proteico da cellule B-linfoblastoidi umane trasformate da EBV (Raji). Inoltre, abbiamo verificato la qualità analitica dei risultati per valutare se la trasformazione con EBV e conseguentemente l'espressione dei prodotti genici EBV-correlati nella linea cellulare utilizzata potesse influenzare la sensibilità e specificità del metodo.

## MATERIALI E METODI

Abbiamo testato i sieri di 348 pazienti affetti da CTD, di cui 101 LES, 51 sclerosi sistemica, 53 sindrome di Sjögren primitiva, 27 poli/dermatomiosite, 15 artrite reumatoide e 101 con CTD overlap. Tutti i pazienti soddisfacevano ai criteri di classificazione per le suddette connettiviti (15-20). Per controllo sono stati analizzati i sieri di 31 soggetti sani e di 13 pazienti affetti da infezione primaria da EBV ed alto titolo di anticorpi IgG circolanti diretti contro gli antigeni EBV specifici (10 pazienti in fase clinicamente attiva e 3 con infezione pregressa).

Gli anticorpi IgG diretti contro le subunità proteiche delle UsnRNP sono stati determinati con l'immunoblotting su estratto nucleare ottenuto da cellule Raji (linea continua umana B linfoide trasfor-

mata da EBV e isolata da linfoma di Burkitt) e cellule Jurkat (linea umana T linfoide), come precedentemente descritto (6, 21). Le cellule sono state coltivate in terreno RPMI 1640 completo, addizionato con siero fetale di vitello scomplementato, penicillina e streptomina. I tamponi usati per l'estrazione proteica contenevano una miscela di inibitori delle proteasi (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Dopo due lavaggi con tampone fosfato (PBS; Na fosfato 10mM, NaCl 150 mM, pH 7,4), le cellule sono state risospese in tampone fosfato ipotonico (Na fosfato 10mM, NaCl 10mM, pH 7,4) contenente 0,5% Triton X-100 ( $100 \times 10^6$  cellule/ml), per 30-40 minuti in ghiaccio. Dopo circa 20 minuti, le cellule sono state passate attraverso un ago di 0,2 mm di diametro per facilitare la rottura della membrana citoplasmatica. Quindi i nuclei sono stati pellettati per centrifugazione (5000 rpm, 15 min., 4°C) e il supernatante raccolto e stoccato come frazione proteica citoplasmatica. I nuclei isolati ( $10^8$  nuclei/ml) sono stati risospesi in tampone ipertonico freddo (Na fosfato 10mM, NaCl 350mM, pH 7,4), agitati in ghiaccio per 10 min e quindi sottoposti a sonicazione almeno 5 volte per 10-20 sec. Il materiale nucleare insolubile è stato pellettato per centrifugazione (5000 rpm, 15 min., 4°C) e il supernatante, corrispondente alla frazione nucleare, raccolto e utilizzato fresco o conservato a -20°C.

L'estratto proteico nucleare e citoplasmatico sono stati risolti mediante elettroforesi denaturante su gel di poliacrilamide (SDS-PAGE) rispettivamente al 12,5% e 15% ( $2 \times 10^6$  equivalenti cellulari/cm di lunghezza del gel) e, dopo separazione, le proteine sono state elettrotrasferite su nitrocellulosa mediante Western blotting overnight a corrente costante. A trasferimento avvenuto, la nitrocellulosa è stata tagliata in strip lungo il senso di migrazione proteica e queste saturate con soluzione proteica bloccante (2% caseina in tampone Tris, Tris/HCl 10mM, NaCl 500mM, pH 7,5) per almeno 1 ora a T amb. Dopo il blocking, ciascuna strip è stata incubata con il siero del paziente diluito 1/100 in Tris/0,2% caseina (3 ore a T amb.), sottoposta quindi a 3 lavaggi da 5 min. ciascuno con Tris/0,2% caseina e a successivi 3 lavaggi con PBS, e quindi incubata (1 ora, T amb.) con antisiero anti-IgG umane coniugato con perossidasi (Sigma Chemical Company, Sigma-Aldrich, Milano) diluito 1/1000 in PBS/0,2% caseina. Dopo altri 3 lavaggi con PBS, il legame anticorpale è stato visualizzato mediante  $H_2O_2/4$ choloro-1naftolo in PBS quale substrato cromogeno.

Gli anticorpi precipitanti anti-Sm/RNP e altri anti-

ENA sono stati determinati mediante la controimmuno-elettroforesi, gli anticorpi anti-P con immunoblotting su estratto citoplasmatico di cellule Raji (21), gli anti-DNA nativo (DNAn) con l'immunofluorescenza indiretta su *Crithidia luciliae*. Nei pazienti affetti da LES è stata determinata la concentrazione sierica dell'anti-DNAn con metodica ELISA commerciale (Shield, Dundee, UK) e l'avidità dell'anti-DNAn con un test ELISA e l'analisi semplificata di Scatchard a due punti (metodo "in house") per il calcolo della costante di affinità apparente dei complessi IgG-DNA.

La ricerca degli anticorpi diretti contro gli antigeni EBV specifici (IgG/IgM anti-VCA, IgG anti-EA, IgG anti-EBNA) è stata eseguita con metodica di immunofluorescenza indiretta (MRL Diagnostics, CA, USA).

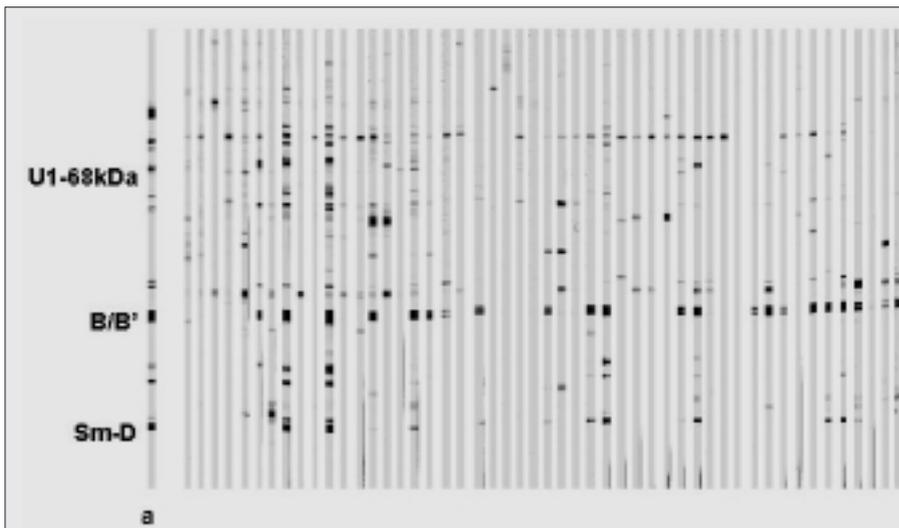
I dati sono stati analizzati statisticamente mediante i test chi quadrato e Mann-Whitney. Valori di  $p < 0,05$  sono stati considerati significativi.

## RISULTATI

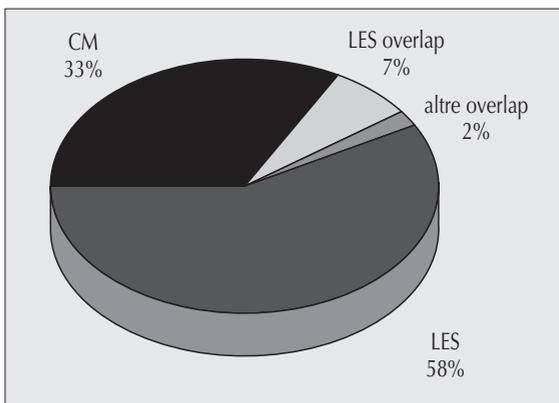
Con l'immunoblotting su lisato proteico da cellule B-linfoidi umane, gli anticorpi sierici anti-B/B' sono stati trovati in 93/348 pazienti (26,7%), gli anticorpi anti-U1-70 kDa in 37 (11%), gli anti-U1-A in 70 (20%), gli anti U1-C in 56 (16,1%) e gli anti-SmD in 26 (7,5%). Erano anti-B/B' positivi il 54,4% dei pazienti con LES, il 55,2% dei pazienti con overlap CTD e manifestazioni lupiche e il 4% dei pazienti con overlap CTD senza manifestazioni lupiche. L'immunoblot rappresentativo di 50/101 sieri di LES è visualizzato in figura 2 e dimostra l'elevata frequenza della reattività anti-B/B'. Nei pazienti con sclerosi sistemica, sindrome di Sjögren primitiva, poli/dermatomiosite, artrite reumatoide e nei soggetti sani non è stata osservata reattività anticorpale anti-B/B'. Anticorpi anti-Sm/nRNP precipitanti su gel sono stati rilevati con la controimmuno-elettroforesi in 82/348 pazienti (23,6): nel 26,7% dei pazienti con LES, nel 79,1% dei pazienti con overlap CTD e manifestazioni lupiche e nel 4% dei pazienti con sindrome di Sjögren.

Il significato clinico della risposta autoimmune anti-B/B' è rappresentato in figura 3: dei 93 pazienti anti-B/B' positivi, il 58% aveva diagnosi di LES, il 33% di connettivite mista secondo i criteri Giapponesi (20, 22), il 7% di connettivite LES-overlap e il 2% di connettivite overlap senza manifestazioni lupiche.

Nei pazienti affetti da LES gli anticorpi anti-B/B'



**Figura 2** - Immunoblot di 50/101 sieri di pazienti con LES su lisato di cellule Raji. Strip a: siero anti-Sm/RNP positivo.



**Figura 3** - Significato clinico della risposta autoimmune anti-B/B' nei 93 pazienti positivi per tale anticorpo.

erano strettamente associati agli anticorpi diretti verso le altre proteine UsnRNP ( $p < 0,0001$ ), agli anticorpi precipitanti anti-nRNP ( $p < 0,0001$ ) e agli anti-P ( $0 < 0,0014$ ) (Tab. I). Inoltre l'immunoreattività anti-B/B' era più frequente nei sieri anti-DNA negativi o debolmente positivi (titolo 20) rispetto ai sieri con anti-DNA ad alto titolo ( $< 20$ ), anche se non in modo significativo. Non è stata osservata alcuna relazione tra positività anti-B/B' e concentrazione sierica o avidità dell'anticorpo anti-DNA. Al fine di valutare la specificità analitica della determinazione dell'anti-B/B' su blot da cellule Raji, sono stati testati i sieri di pazienti con infezione primaria da EBV ed alto titolo di IgG anti-EBV. Tali sieri hanno dato un pattern di bande nettamente diverso e distinguibile da quello ottenuto con i sieri autoimmuni. Si segnala che 9/10 pa-

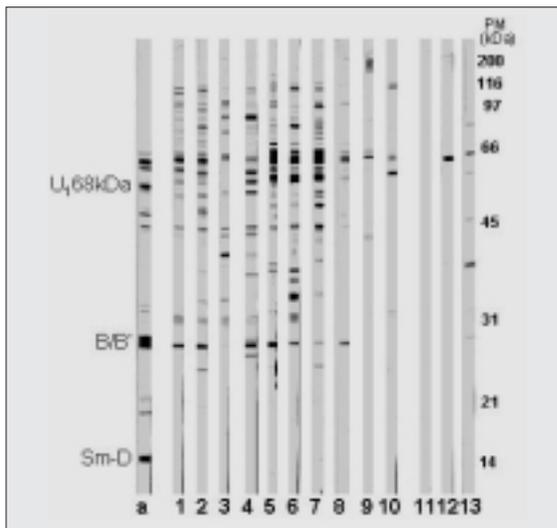
**Tabella I** - Prevalenza (%) dei principali autoanticorpi in 101 pazienti affetti da LES e loro associazione con l'immunità anti-B/B'.

	Tot pts (n=101)	Anti-B/B' positivi (n=55)	Anti-B/B' negativi (n=46)	p
anti-dsDNA	58	56	61	ns
anti-Sm	16	22	9	ns
anti-SmD	23	42	0	<0.0001
anti-nRNP	27	45	4	<0.0001
anti-U1-70kDa	7	18	0	0.015
anti-U1-A	29	53	0	<0.0001
anti-U1-C	18	33	0	<0.0001
anti-P rib.	18	29	4	0.0013
anti-Ro/SSA	32	31	33	ns
anti-La/SSB	3	2	4	ns

zienti con infezione in atto ma nessuno dei pazienti con infezione pregressa, hanno dimostrato reattività anticorpale contro un peptide di peso molecolare apparente corrispondente a quello del peptide B (28kDa) (Fig. 4). Inoltre, dei 15 sieri di LES anti-B/B' positivi/anti-ENA negativi testati anche all'immunoblotting su lisato di cellule Jurkat, il 60% (9/15) si è confermato anti-B/B' positivo, sebbene con intensità di segnale inferiore a quella ottenuta su blot di Raji (Fig. 5).

**DISCUSSIONE**

I nostri risultati dimostrano che la risposta autoimmune U1RNP-indotta nelle connettiviti è prevalentemente diretta contro la doppietta peptidica



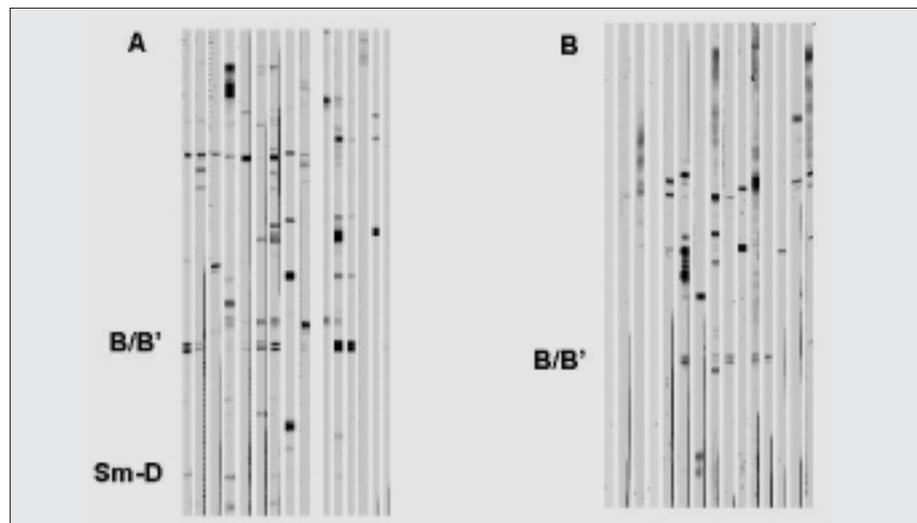
**Figura 4** - Immunoblot su cellule Raji dei sieri di pazienti con infezione primaria da EBV e alto titolo di IgG anti-EBV (strip 1-10: sieri di infezione attiva; strip 11-13 sieri di infezione pregressa). Strip a: siero anti-Sm/RNP positivo.

B/B', in particolare contro un epitopo/i condiviso dai due peptidi B e B', aventi una sequenza aminoacidica quasi identica. La doppietta B/B' è risultata target antigenico specifico per la diagnosi di LES o di CTD con quadro immunopatologico simile al LES. Ancora una volta l'immunoblotting ha dimostrato di essere più sensibile della controimmunolettroforesi nella determinazione degli anticorpi anti-Sm/RNP (23), soprattutto nell'identificazione degli anticorpi non precipitanti che, secondo i nostri dati, sembrano essere più frequenti

nel LES piuttosto che nelle CTD overlap. Bisogna però precisare che, nella nostra casistica, 46/101 (45,5%) dei pazienti con CTD overlap soddisfacevano ai criteri Giapponesi di classificazione della connettivite mista (20) secondo i quali la positività anti-nRNP è criterio necessario.

Le ragioni per cui la nostra procedura di immunoblotting ha dimostrato una buona attendibilità clinica sono in parte riconducibili alle variabili analitiche del metodo, in parte legate alle caratteristiche intrinseche del sistema antigene/anticorpo Sm/RNP. La scelta della fonte antigenica è cruciale per l'accuratezza di una metodica di immunoblotting: nel nostro caso abbiamo utilizzato le cellule Raji, linea cellulare che si è rivelata ottimale per la determinazione dell'anticorpo anti-P, marker sierologico specifico di LES (24). Le Raji sono cellule B linfoidi umane immortalizzate da EBV. La trasformazione in senso neoplastico consegue all'inserzione nel genoma della cellula ospite di un numero variabile tra 5 e 50 copie del genoma virale e all'espressione di prodotti genici tipici della fase non litica o latente del virus, tra cui gli antigeni nucleari EBNA 1-6 (25). Tutte le cellule EBV positive a livello genomico esprimono EBNA-1, indipendentemente dai fattori di regolazione cellulare; la sintesi di EBNA 2-6 dipende invece dai meccanismi regolatori e dai cicli di replicazione della cellula ospite (25). Quindi le cellule Raji possono esprimere EBNA 1-6 e, usate in un test immunoblot, rilevare anticorpi anti-EBNA, come dimostrato dai nostri dati sulla reattività all'immunoblotting dei sieri di pazienti con infezione da EBV. La risposta primaria anti-EBV induce anti-

**Figura 5** - Immunoblot di 15 sieri di LES anti-B/B' positivi/anti-ENA negativi su cellule Raji (pannello A) e cellule Jurkat (pannello B). Non tutti i segnali B/B' sono visualizzati per scarsa sensibilità della scansione.



corpi IgG cross-reagenti con il peptide B del complesso Sm; viceversa, i sieri autoimmuni riconoscono, con la medesima intensità di legame, uno o più epitopi condivisi dai peptidi B e B'. Queste osservazioni, se da un lato suggeriscono indirettamente un legame tra risposta immunitaria EBV e la risposta autoimmune B/B', dall'altro assicurano soprattutto che il dato di laboratorio è specifico dal punto di vista analitico, non essendo falsamente influenzato dall'espressione di antigeni EBV da parte della linea cellulare antigenica. L'immunoblotting con cellule Jurkat conferma ulteriormente tale conclusione. La minore sensibilità analitica dell'estratto ottenuto da Jurkat può dipendere dal grado di espressione cellulare e/o di estrazione dei peptidi B/B'.

L'alta frequenza e predominanza dell'autoreattività B/B' nel LES e in forme simil-lupiche origina sia dal forte potere autoantigenico e immunostimolante della doppietta B/B' (7, 9) che da fenomeni di mutua cross-reattività con i vari polipepti-

di U1RNP autoreattivi (U1-A, U1-C) (26), con i complessi DNA-proteine (27), con le proteine P ribosomiali (28) oltre che con sequenze simili su antigeni "non self" (9, 10). L'associazione che abbiamo riscontrato tra anticorpi anti-B/B' e anti-U1RNP, -Sm/nRNP, -anti-P testimonia la polireattività/polispecificità sierologica nel LES e le strette relazioni immunologiche tra i target autoantigenici LES-specifici (29). Tuttavia, l'elevata prevalenza dell'immunità anti-B/B', seppure originata da varie interazioni immunologiche, è un'ulteriore conferma del ruolo di B/B' come target antigenico predittivo di induzione e sviluppo della risposta autoimmune nel LES.

In conclusione, la caratterizzazione all'immunoblotting del pattern sierologico Sm/RNP è un approccio metodologico analiticamente valido e utile per l'inquadramento diagnostico di pazienti con sospetta connettivite, data l'elevata sensibilità e specificità per la diagnosi di LES o di connettivite con quadro immunopatologico simile.

## RIASSUNTO

Obiettivo dello studio è di valutare sensibilità e specificità della determinazione all'immunoblotting degli anticorpi anti-B/B' UsnRNP nelle connettiviti (CTD). I sieri di 348 pazienti affetti da varie CTD, 31 soggetti sani e 13 pazienti con infezione primaria da EBV ed alto titolo di anticorpi IgG anti-EBV sono stati testati con l'immunoblotting su estratto proteico di cellule Raji (linea umana B-linfoide trasformata da EBV) e cellule Jurkat (linea umana T linfoide). Gli anticorpi anti-B/B' sono stati trovati nel LES (54,4%), nelle CTD overlap con manifestazioni lupiche (55,2%) e in CTD overlap senza manifestazioni lupiche (4%). L'immunoblotting su estratto di cellule Raji è un metodo altamente sensibile e specifico per la determinazione dell'immunoreattività B/B' nelle connettiviti. Tale specificità anticorpale ha dimostrato una utilità diagnostica per l'elevata frequenza nel LES e per la specificità nella diagnosi di LES o connettivite overlap con manifestazioni clinico-sierologiche di LES.

**Parole chiave** - UsnRNP, autoanticorpi, immunoblotting, connettivite, lupus eritematoso sistemico.

**Key words** - *U small nuclear ribonucleoprotein, autoantibodies, immunoblotting, connective tissue disease, systemic lupus erythematosus.*

## BIBLIOGRAFIA

- Ghirardello A, Doria A, Villalta D, Zampieri S, Tozzoli R, Gambari P.F. Gli anticorpi antinucleosomi: nuovo marker sierologico di lupus eritematoso sistemico. *Reumatismo* 2000; 52: 242-8.
- Hassfeld W, Steiner G, Studnicka-Benke A, Skriner K, Graninger W, Fischer I, et al. Autoimmune response to the spliceosome. An immunologic link between rheumatoid arthritis, mixed connective tissue disease and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 777-85.
- Reichlin M. Antibodies to ribonuclear-proteins. *Rheum Dis Clin North Am* 1994; 20: 29-43.
- Gunnewiek JMTK, Van Venrooij WJ. Autoantigens contained in the U1 small nuclear ribonucleoprotein complex. In: *Manual of biological markers of disease*, Netherlands, Kluwer 1994; B3. 1/1-20.
- Ghirardello A, Doria A, Gambari P.F. Autoanticorpi ed autoantigeni nel lupus eritematoso sistemico. Studio mediante l'immunoblotting. *Reumatismo* 1994; 46: 208-15.
- Ghirardello A, Doria A, Vesco P, Vaccaro E, Bernardi C, Catani C, et al. Blotting patterns of IgG anti-(U1)RNP antibodies in mixed connective tissue disease. *Rheumatol Int* 1996; 16: 145-50.
- Greidinger EL, Hoffman RW. The appearance of U1RNP antibody specificities in sequential autoimmune human antisera follows a characteristic order that implicates the U1-70kd and B/B' proteins as predominant U1RNP immunogens. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 368-75.

8. Homma M, Mimori T, Takeda Y, Akama H, Yoshida T, Ogasawara T, et al. Autoantibodies to the Sm antigen: immunological approach to clinical aspects of systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1987; 14 Suppl 13: 188-93.
9. James JA, Gross T, Scofield RH, Harley JB. PPPGMRPP immunization generates anti-Sm humoral autoimmunity and induces systemic lupus erythematosus in rabbits. *J Exp Med* 1995; 181: 453-61.
10. James JA, Scofield RH, Harley JB. Lupus humoral autoimmunity after short peptide immunization. *Ann NY Acad* 1997; 815: 124-7.
11. James JA, Kaufman KM, Farris AD, Taylor-Albert E, Lehman TJA, Harley JB. An increased prevalence of Epstein-Barr virus infection in young patients suggests a possible etiology for systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1995; 100: 3019-26.
12. Sabbatini AS, Bombardieri S, Migliorini P. Autoantibodies from patients with systemic lupus erythematosus bind a shared sequence of Sm D and Epstein-Barr nuclear antigen-1. *Eur J Immunol* 1993; 23: 1146-52.
13. Incaprera M, Rindi L, Bazzichi A, Garzelli C. Potential role of the Epstein-Barr virus in systemic lupus erythematosus autoimmunity. *Clin Exp Rheumatol* 1998; 16: 289-94.
14. Harley JB, James JA. Is there a role for Epstein-Barr virus in lupus. *The immunologist* 1998; 6: 79-93.
15. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1271-7.
16. Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association diagnostic and therapeutic criteria committee (1980). *Arthritis Rheum* 1980; 23: 581-90.
17. Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, Balestrieri G, Bencivelli W, Bernstein RN et al. Preliminary criteria for the classification of Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 340-7.
18. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis. *N Eng J Med* 1975; 13: 344-407.
19. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-24.
20. Kasukawa R, Tojo T, Miyawaki S, Yishida H, Tanimoto K, Nobunaga M, et al. Preliminary diagnostic criteria for classification of mixed connective tissue disease. In: Kasukawa R, Sharp GC. *Mixed connective tissue disease and anti-nuclear antibodies*. Amsterdam, Elsevier, 1987: 41-7.
21. Ghirardello A, Doria A, Zampieri S, Gerli R, Rapizzi E, Gambari P.F. Anti-ribosomal P protein antibodies detected by immunoblotting in patients with connective tissue diseases: their specificity for SLE and association with IgG anticardiolipin antibodies. *Ann Rheum Dis* 2000; 59: 875-81.
22. Doria A, Ghirardello A, de Zambiasi P, Ruffatti A, Gambari P.F. Japanese diagnostic criteria for mixed connective tissue disease in Caucasian patients. *J Rheumatol* 1992; 19: 259-64.
23. Zampieri S, Ghirardello A, Doria A, Tonello M, Bendo R, Rossini K, Gambari P.F. The use of Tween 20 in immunoblotting assays for the detection of autoantibodies in connective tissue diseases. *J Immunol Methods* 2000; 239: 1-11.
24. Ghirardello A, Caroni L, Franceschini F, Zampieri S, Gambari PF, Doria A. Diagnostic tests for anti ribosomal P protein antibodies: a comparative evaluation of immunoblotting and Elisa Assays. *J Autoimmunity* 2002; 19: 71-78.
25. Leser U, Wolf H. The Epstein-Barr virus: related diseases and molecular biology. *Biotest Bulletin* 1990; 4: 131-40.
26. Habets WJ, Sillekens PTG, Hoet MH, Mcallister G, Lerner MR, Van Venrooij WJ. Small nuclear RNA-associated proteins are immunologically related as revealed by mapping of autoimmune reactive-B cell epitopes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 4674-8.
27. Pisetsky DS, Hoch SO, Klott CL, O'Donnell MA, Keene JD. Specificity and idiotypic analysis of a monoclonal anti-Sm antibody with anti-DNA activity. *J Immunol* 1985; 135: 4080-5.
28. Elkon KB, Bonfa E, Llovet R, Eisenberg RA. Association between anti-Sm and anti-ribosomal P protein autoantibodies in human systemic lupus erythematosus and MRL/lpr mice. *J Immunol* 1989; 143: 1549-54.
29. Caponi L. The cross-reactivity of autoantibodies in connective tissue diseases. *Clin Exp Rheumatol* 1996; 14: 425-31.