

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000200288



A

495

[illegible]

THE MEMORANDUM FOR THE RECORD

CONFIDENTIAL - RUTH
b6
b7C

АКАТОРИН ДАИР БИ

1980-1981





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ
ΡΕΥΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
Διευθυντής: Καθηγητής Αλέξανδρος Α. Δρόσος

**Αντισώματα anti-Ro(SSA) στη ρευματοειδή
αρθρίτιδα. Ανοσολογική απόκριση κατά μη
διατηρημένων επιτόπων**

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Γ. ΚΙΣΤΗΣ
Ιατρός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2006



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμών του συγγραφέα (νόμος 5343, άρθρο 202, §2).



Αίτηση εκπόνησης της Διδακτορικής Διατριβής: 13-07-1990

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Αριθμ. Συνεδρ. 192^α / 22-1-1991

Χαράλαμπος Μ. Μουτσόπουλος	Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Επιβλέπων
Φωτεινή Σκοπούλη	Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Μέλος
Αλέξανδρος Δρόσος	Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Μέλος

Ορισμός θέματος: 6 Φεβρουαρίου 1991

Ανασύσταση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Αριθμ Συνεδρ. 216^α / 31-3-1992

Χαράλαμπος Μ. Μουτσόπουλος	Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Επιβλέπων
Φωτεινή Σκοπούλη	Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Μέλος
Γεώργιος Παπαδόπουλος	Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Μέλος

Διορισμός πενταμελούς εξεταστικής επιτροπής : Αριθμ. Συνεδρ. 218^α/19-5-1992

Χαράλαμπος . Μ. Μουτσόπουλος	Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Επιβλέπων
Φωτεινή Σκοπούλη	Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Μέλος
Γεώργιος Παπαδόπουλος	Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Μέλος
Ορέστης Τσόλας	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Μέλος
Κωνσταντίνος Σέκερης	Καθηγητής Βιολογίας Παν/μίου Αθηνών, Μέλος

Διορισμός Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: Αρ. Συν. 291^α / 20-2-1996

Χαράλαμπος Μ. Μουτσόπουλος	Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Δημήτριος Σιδερής	Καθηγητής Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ορέστης Τσόλας	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κωνσταντίνος Σέκερης	Καθηγητής Βιολογίας Παν/μίου Αθηνών



Αλέξανδρος Δρόσος

Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Επαμεινώνδας Β. Τσιάνος,

Αναπληρωτής Καθηγητής Γαστρεντερολογίας
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Φωτεινή Σκοπούλη

Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογίας Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ανασυγκρότηση Επαμελούς Εξεταστικής Επιτροπής Αρ. Συν. 588^α / 25-7-2006

Χαράλαμπος Μ. Μουτσόπουλος

Καθηγητής Παθοφυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Αθηνών

Αλέξανδρος Δρόσος

Καθηγητής Παθολογίας-Ρευματολογίας Ιατρικής
Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ανέστης Μαυρίδης

Καθηγητής Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Αντιγόνη Σιαμοπούλου-Μαυρίδου

Καθηγήτρια Παιδιατρικής Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Επαμεινώνδας Β. Τσιάνος

Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μαρία Μπάη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής
Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων

Φωτεινή Σκοπούλη

Καθηγήτρια Ανοσολογίας Χαροκοπείου
Πανεπιστημίου Αθηνών

Βαθμός Διδακτορικής Διατριβής: ΛΙΑΝ ΚΑΛΩΣ

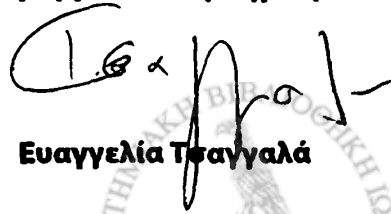
Ημερομηνία κατάθεσης Διδακτορικής Διατριβής: 15-9-2006

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Επαμεινώνδας Β. Τσιάνος,

Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Η Γραμματέας της Σχολής



Ευαγγελία Τσαγγαλά



Αφιερώνεται με πολύ αγάπη
στους γονείς μου
τη σύζυγό μου Δώρα
και τα παιδιά μου Γιώργο και Ράνια



Περιεχόμενα

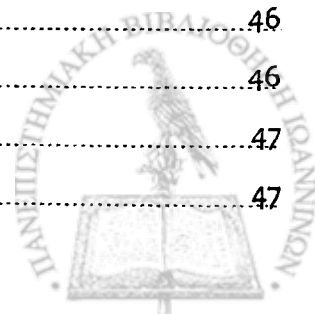
Σελ.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή.....	1
Μοριακή δομή και λειτουργία των αντιγόνων Ro και La.....	4
I. Δομή των La RNPs συμπλόκων.....	4
II. Λειτουργία των La RNP συμπλόκων.....	9
III. Δομή των Ro RNPs συμπλόκων.....	10
α. Δομή της πρωτεΐνης Ro 60.....	14
β. Δομή της πρωτεΐνης Ro 52.....	16
IV. Λειτουργία των Ro RNPs συμπλόκων.....	16
Αυτοεπίτοποι των πρωτεϊνών Ro και La.....	18
I. Αυτοεπίτοποι της Ro60 πρωτεΐνης.....	19
II. Αυτοεπίτοποι της Ro52 πρωτεΐνης.....	20
III. Αυτοεπίτοποι της La48 πρωτεΐνης.....	21
Κλινική σημασία και παθογενετικός ρόλος των αντι-Ro και αντι-La αντισωμάτων.....	23
Ισότυποι και παραγωγή αντισωμάτων.....	32
Μέθοδοι ανίχνευσης των αντι-Ro και αντι-La αντισωμάτων.....	34
1. Ανοσοφθορισμός (Immunofluorescence).....	34
2. Διπλή ανοσοδιάχυση (Double immunodiffusion).....	35
3. Αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση (Counterimmunoelectrophoresis).....	37
4. Ανοσοαποτύπωση (Immunoblotting).....	37
5. Ενζυμικός ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός (ELISA).....	39
6. Ανοσοκατακρήμνιση RNA (RNA precipitation).....	40
Σκοπός της μελέτης.....	42

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	45
Ασθενείς.....	45
Μέθοδοι.....	46
Αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση (CIE).....	46
Ανοσοκατακρήμνιση RNA.....	46
Μέθοδος ενζυμικού ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού (ELISA).....	47
Ανοσοαποτύπωση.....	47



Στατιστική ανάλυση.....	48
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	49
Σύγκριση των διαθέσιμων μεθόδων για ανίχνευση αντι-Ro αντισωμάτων.....	49
Συζήτηση.....	57
Ανθρωποειδικά αντι-La αντισώματα σε επιλεγμένους ορούς ασθενών με ΡΑ.....	60
Συζήτηση.....	65
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	69
SUMMARY AND CONCLUSIONS.....	71
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	73

Πρόλογος

Η εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής με θέμα: «Αντισώματα αντι-Ro(SSA) στη Ρευματοειδή Αρθρίτιδα. Ανοσολογική απόκριση κατά μη διατηρημένων επιτόπων» ήταν για μένα μια εξαιρετικά ενδιαφέρουσα και πολύτιμη εμπειρία.

Την ευκαιρία μου έδωσε ο Καθηγητής κ. Χ.Μ. Μουτσόπουλος, όταν με δέχθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας της Πανεπιστημιακής Παθολογικής Κλινικής. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την ανάθεση της διατριβής, την εμπιστοσύνη και την αμέριστη συμπαράστασή του κατά τη διάρκεια της εκπόνησής της και τον ευγνωμονώ διότι με δίδαξε όχι μόνο ιατρική έρευνα αλλά επίσης κλινική ιατρική και ιατρικό ήθος.

Τον Καθηγητή Παθολογίας-Ρευματολογίας κ. Αλέξανδρο Δρόσο ευχαριστώ επίσης θερμά, διότι με τη συνεχή προτροπή του ολοκλήρωσα τη διατριβή αυτή.

Την Καθηγήτρια Κα Φωτεινή Σκοπούλη ευχαριστώ επίσης θερμά που από τα πρώτα βήματά μου στο Ανοσολογικό Εργαστήριο μου συμπαραστάθηκε και με καθοδηγούσε.

Τους Καθηγητές κ.κ. Ανέστη Μαυρίδη, Αντιγόνη Σιαμοπούλου, Μαίρη Μπάη και κυρίως τον δάσκαλό μου κ. Επαμεινώνδα Τσιάνο ευχαριστώ θερμά για τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον Επίκουρο Καθηγητή Ρευματολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Μενέλαο Μανουσάκη για το αμέριστο ενδιαφέρον του



και τις πολύτιμες συμβουλές του στο σχεδιασμό και την πραγματοποίηση της μελέτης.

Σημαντική επίσης ήταν η βοήθεια του προσωπικού του Ανοσολογικού Εργαστηρίου και ιδιαίτερα της Κλεοπάτρας Γκαραλέα, την οποία θερμά ευχαριστώ, όπως και τους λοιπούς συνεργάτες και συναδέλφους του Εργαστηρίου κ.κ. Αθανάσιο Τζιούφα, Γεώργιο Γερμανίδη, Άννα Γούσια και Γεώργιο Νταλέκο.

Τέλος, ευχαριστώ τον κ. Γιώργο Παπανικολάου που επιμελήθηκε άψογα την εμφάνιση του κειμένου.



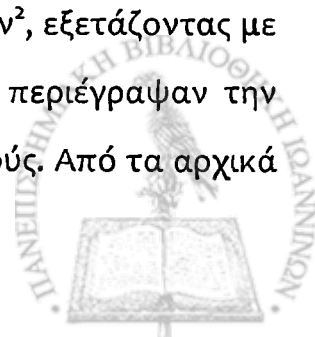
Γενικό Μέρος



Εισαγωγή

Η παρουσία αυτοαντισωμάτων έναντι των ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων Ro και La αποτελεί συχνό εύρημα σε ορούς αρρώστων με αυτοάνοσα νοσήματα, κυρίως όμως στο σύνδρομο Sjögren (σS) και στο συστηματικό ερυθρεματώδη λύκο (ΣΕΛ). Η ύπαρξη αυτοαντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών αυτών βοήθησε τη μελέτη της δομής και της λειτουργίας των ριβονουκλεοπρωτεϊνικών αυτών συμπλόκων· από την άλλη μεριά, η ανάλυση των συμπλόκων αυτών και η κλωνοποίηση των αντιγόνων βοήθησαν σημαντικά στην κατανόηση της ανοσολογικής βάσης της αυτοανοσίας.

Η ιστορία ανίχνευσης των δύο αυτών αυτοαντισωμάτων και της απομόνωσης των αντίστοιχων αντιγόνων τους παρουσιάζει κάποια ιδιαιτερότητα, καθώς για αρκετά χρόνια, ερευνητές που δούλευαν ανεξάρτητα, ανακοίνωναν την ανίχνευσή τους με διαφορετική κάθε φορά ονομασία, ώστε τελικά να δημιουργηθεί σύγχυση. Συγκεκριμένα, το 1958, ο Jones¹ περιέγραψε την ύπαρξη αντισωμάτων σε ορούς ασθενών με σS που αντιδρούσαν με άγνωστα αντιγόνα εκχυλισμάτων δακρυικών και σιελογόνων αδένων. Ακολουθώντας, οι Anderson και συν², εξετάζοντας με τη μέθοδο της διπλής ανοσοδιάχυσης, 29 ορούς ασθενών με σS, περιέγραψαν την ύπαρξη δύο συστημάτων αντιγόνου-αντισώματος στους 9 από αυτούς. Από τα αρχικά



της ασθένειας και των ονομάτων των ασθενών, ονόμασαν αυτές τις ιζηματίνες SjD και SjT.

Το αντιγόνο SjT βρέθηκε σε μια ποικιλία ιστών ανθρώπινης και άλλης ζωικής προέλευσης αλλά το αντιγόνο SjD δεν ανιχνεύθηκε στο εκχύλισμα εγκεφάλου, επινεφριδίων και ήπατος (πιθανά για τεχνικούς λόγους). Μελετώντας τις ιδιότητες του αντιγόνου SjT, οι Anderson και συν. συμπέραναν ότι η φύση του είναι πρωτεϊνική.

Μερικά χρόνια αργότερα, οι Clark και συν³, απομόνωσαν από ορούς ασθενών με συστηματικό ερυθματώδη λύκο ένα αντιγόνο, που χαρακτήρισαν σαν κυτταροπλασματικό όξινο μακρομόριο και που ονόμασαν Ro, από τα αρχικά του αρρώστου στον ορό του οποίου ανιχνεύθηκε το αντίσωμα κατά του αντιγόνου αυτού. Το αντιγόνο Ro ανιχνεύθηκε σε ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων ιστών αλλά δεν βρέθηκε σε ιστούς τρωκτικών. Επίσης, η εξέταση των αντιπυρηνικών αντισωμάτων (ANA) με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού και με διάφορα υποστρώματα ήταν αρνητική. Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι το αντιγόνο Ro βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση στους ιστούς. Τέλος, επειδή οι οροί με αντι-Ro ειδικότητα ήταν σχεδόν αποκλειστικά οροί ασθενών με ΣΕΛ, το αντίσωμα θεωρήθηκε χαρακτηριστικό της νόσου. Με παρόμοιο τρόπο, οι Mattioli και Reichlin⁴, το 1974, ανακάλυψαν το αντιγόνο La, του οποίου η αντιγονικότητα καταστρεφόταν με τη δράση της θρυψίνης και της ριβονουκλεάσης, πράγμα που υποδήλωνε ότι πιθανά επρόκειτο για σύμπλεγμα ριβονουκλεϊκού οξέος και πρωτεΐνης. Τα αντισώματα κατά του La αντιγόνου χαρακτηρίστηκαν σαν αυτοαντισώματα που ανιχνεύονται αποκλειστικά σε ορούς ασθενών με ΣΕΛ. Επίσης, το γεγονός ότι όλοι σχεδόν οι οροί με αντι-La ειδικότητα είχαν και αντι-Ro ειδικότητα, οδήγησε στην υπόθεση κάποιας μοριακής σχέσης μεταξύ των δύο αντιγόνων.

Το 1975 και 1976, οι Alsraugh και συν^{5,6} κατέδειξαν 2 νέα ιζηματικά συστήματα, που τα ονόμασαν SS-A και SS-B' η συνύπαρξη των δύο αυτοαντισωμάτων στο ίδιο δείγμα ορού αίματος ήταν συχνή. Αρχικά αναφέρθηκαν ότι ανιχνεύονται αποκλειστικά σε ορούς ασθενών με σύνδρομο Sjögren, σύντομα όμως αποδείχθηκε ότι



το SS-B τουλάχιστον δεν ήταν ειδικό για το σS αφού ανιχνεύθηκε και σε ασθενείς με ΣΕΛ⁷.

Τέλος, το 1977⁸, ανιχνεύθηκε ένα ακόμη αυτοαντιγόνο, το Ha σε ορούς ασθενών με πρωτοπαθές σS και ασθενών με ΣΕΛ και δευτεροπαθές σS⁹.

Η σύγχυση λύθηκε το 1979 όταν οι Alsbaugh και Maddison¹⁰ σε μια μελέτη με δεδομένα δύο διαφορετικών εργαστηρίων κατέδειξαν την ομοιότητα μεταξύ του Ro με την SS-A και του La με την SS-B και Ha. Η σχέση των Ro(SSA) και La(SSB) με τα SjD και SjT δεν έγινε δυνατόν να διερευνηθεί γιατί οι οροί που αρχικά αναγνώρισαν αυτά τα αντιγόνα είχαν χαθεί.

Οι προαναφερθείσες εργασίες μελέτησαν τα αντι-Ro και αντι-La αντισώματα και τα αντίστοιχα αντιγόνα με απλές μεθόδους, όπου οι οροί των ασθενών έγιναν τα πρώτα "εργαλεία" (probes) για τη διερεύνηση της φύσης των αντιγόνων και κατέληξαν σε ορισμένες παρατηρήσεις, οι οποίες στην πορεία επιβεβαιώθηκαν πλήρως: (1) Τα αντι-La αντισώματα ανιχνεύονται σε δείγματα ορού αίματος πάντοτε μαζί με αντι-Ro αντισώματα χωρίς όμως να ισχύει και το αντίθετο. (2) Τα αντισώματα αυτά παρατηρούνται κυρίως σε ασθενείς με σS ή ΣΕΛ. (3) Το Ro αντιγόνο χαρακτηρίζεται από χαμηλή ιστική συγκέντρωση. (4) Το La αντιγόνο έχει κυρίως πυρηνική εντόπιση ενώ το Ro ανιχνεύεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα. Οι παρατηρήσεις αυτές άνοιξαν το δρόμο για την καλύτερη ανάλυση της δομής και του ρόλου των πρωτεϊνών αυτών.

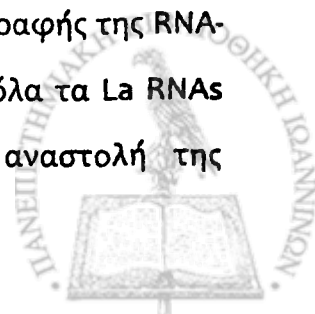


Μοριακή Δομή και Λειτουργία των Αντιγόνων Ro και La

Το 1979, οι Lerner και Steitz¹¹, χρησιμοποιώντας αυτοαντισώματα ασθενών με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο και με την βοήθεια μοριακών τεχνικών βρήκαν ότι αντι-Ro(SSA) αντισώματα σχηματίζουν ιζήματα με μικρές ριβονουκλεοπρωτεΐνες (sRNPs, small ribonucleoproteins). Οι μικρές ριβονουκλεοπρωτεΐνες ορίζονται ως συμπλέγματα μιας ή περισσοτέρων πρωτεϊνών με ένα μικρό μόριο RNA, με μήκος μικρότερο από 300 νουκλεοτίδια. Στο πρωτεϊνικό τους τμήμα βρίσκονται οι αντιγονικοί επίτοποι που αναγνωρίζουν τα αυτοαντισώματα. Ανάλογα με την εντόπισή τους διακρίνονται σε μικρές πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες (snRNPs) και σε μικρές κυτταροπλασματικές (scrRNPs). Υπάρχουν τρεις μείζονες τάξεις sRNPs, οι Sm ριβονουκλεοπρωτεΐνες, οι La και οι Ro· η λειτουργία τους σχετίζεται με τις διαδικασίες έκφρασης των γονιδίων.

I. Δομή των La RNPs συμπλόκων.

Τα La RNPs αποτελούνται από μια πρωτεΐνη 46.7 kDa (η οποία θα αναφέρεται ως La) συνδεδεμένη με μόριο RNA που είναι προϊόν μεταγραφής της RNA-πολυμεράσης III. Οι παρατηρήσεις που οδήγησαν στην υπόθεση ότι όλα τα La RNAs είναι προϊόντα μεταγραφής της RNA-πολυμεράσης III ήταν: η αναστολή της



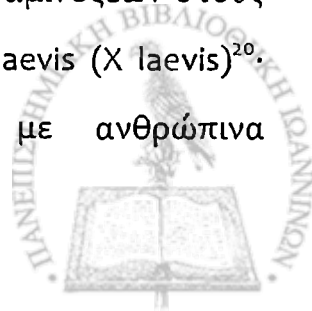
βιοσύνθεσής τους από την α-αμανταδίνη¹², η μικρή ημιπερίοδος ζωής τους¹³, η μη συντήρηση της αλληλουχίας τους μεταξύ ανθρώπινων και άλλης ζωικής προέλευσης κυττάρων¹⁴ και επίσης η εκλεκτική πυρηνισκική εντόπιση του La αντιγόνου στην G1 και πρώιμη S φάση του κυτταρικού κύκλου¹⁵.

Το φάσμα των La RNAs περιλαμβάνει τις πρόδρομες μορφές των 7SRNA, 5SRNA, tRNA, U6RNA και τα Y(Ro) RNAs.

Επίσης, ανήκουν RNAs που κωδικοποιούνται από ιικό γονιδίωμα, όπως το VA I και VAII RNAs (VA: virus associated), EBER1 και EBER2 RNAs (του ιού Epstein-Barr) (όλα τα ανωτέρω είναι προϊόντα μεταγραφής της RNA πολυμεράσης III). Τέλος, RNAs των ιών της λύσσας και του ιού της φουσαλιδώδους στοματίτιδας (vesicular stomatitis virus) (που μεταγράφονται από ειδικές ιικές RNA πολυμεράσες) καθώς και U1RNA (προϊόν μεταγραφής της RNA πολυμεράσης II) έχειδειχθεί ότι συνδέονται με την πρωτεΐνη La¹⁶.

Η θέση σύνδεσης της πρωτεΐνης La με τα RNA φαίνεται να είναι μια μικρή αλληλουχία αμινοξέων ουριδυλικού οξέος (uridyate residues) στο 3' άκρο· πρόκειται για κοινή αλληλουχία, που υπάρχει σε όλα τα RNA-προϊόντα μεταγραφής της RNA πολυμεράσης III^{17,18}. Η αλληλουχία όμως αυτή "χάνεται" κατά την ωρίμανση των προϊόντων της μεταγραφής και έτσι η πρωτεΐνη La συνδέεται με τα πρόδρομα RNAs μόνο παροδικά. Ωστόσο, τα Ro RNAs και τα VA και EBER RNAs περιέχουν την περιοχή σύνδεσης με την πρωτεΐνη La και στην "ώριμη" μορφή τους και έτσι η πρωτεΐνη La θεωρείται ότι συνδέεται με αυτά τα RNA πιο σταθερά.

Αρκετές ομάδες ερευνητών απομόνωσαν και κλωνοποίησαν την αλληλουχία συμπληρωματικού DNA (complementary DNA, cDNA) της πρωτεΐνης La^{18,19}. Το ανθρώπινο La cDNA κωδικοποιεί ένα πολυπεπτίδιο που αποτελείται από 408 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 46.7 kDa (Εικόνα 1). Η πρωτεΐνη La διατηρείται εξελικτικά, όπως φαίνεται από την διατήρηση της αλληλουχίας των αμινοξέων στους La cDNA κλώνους στον άνθρωπο, στο μωσχάρι και στο *Xenopus laevis* (X laevis)²⁰. επίσης, πρωτεΐνες La από διαφορετικά είδη αντιδρούν με ανθρώπινα αυτοαντισώματα²¹.



10 20 30 40 50 60 70 80 90
 GCGCTTTAGGCTGGCGGGCGGCTGGCAGGTGGAGTGGTTGCTGTTGCTGTTGTGAGCCTGTGCGGCGGCTTCTGTGGGCGGGAACCT
 100 110 120 130 140 150 160 170 180
 TAAAGATAGCCGCAATGGCTGAAAATGGTGATAATGAAAAGATGGCTGCCCTGGAGGCCAAAATCTGTCAATGAAATTGAGTATTATTTG
 M A E N G D N E K M A A L E A K I C N Q I E Y Y F 25
 190 200 210 220 230 240 250 260 270
 GCGACTTCAATTTGCCACGGGACAAGTTTCTAAAGGAACAGATAAAAAGTGGATGAAGGCTGGGTACCTTTGGAGATAATGATAAAATTC
 G D F N L P R D K F L K E Q I K L D E G W V P L E I M I K F 55
 280 290 300 310 320 330 340 350 360
 ACAGGTTGAACCGTCTAACACAGACTTTAATGTAATTGTGGAAGCATTGAGCAATCCAAGGCAGAACTCATGGAATCAGTGAAGATA
 M R L N R L T T D F N V I V E A L S K S K A E L M E I S E D 85
 370 380 390 400 410 420 430 440 450
 AAATAAAATCAGAAGGTCTCCAAGCAACCCCTACCTGAAGTGAAGTATGAGTATAAAAATGATGAAAAACAGATCTGTTTATATTA
 K T K I R R S P S K P L P E V T D E Y K N D V K N R S V Y I 115
 460 470 480 490 500 510 520 530 540
 AAGGCTTCCCACTGATGCAACTCTTGATGACATAAAGAATGGTTAGAAGATAAAGGTCAAGTACTAAATATTCAGATGAGAAGACAT
 K G F P T D A T L D D I K E W L E D K G Q V L N I O M R R T 145
 550 560 570 580 590 600 610 620 630
 TGCATAAAGCATTTAAGGGATCAATTTTGTGTGTTTGTATGACATTGAATCTGCTAAGAAATTTGTAGAGACCCCTGGCCAGAAGTACA
 L N K A F K G S I F V V F D S I E S A K K F V E T P G Q K Y 175
 640 650 660 670 680 690 700 710 720
 AAGAAACAGACCTGCTAATCTTTCAAGGACGATTACTTTGCCAAAAAATGAAGAAAGAAAAAATAAAGTGGAGCTAAATTA
 K E T D L L I L F K D D Y F A K K N E E R K Q N K V E A K L 205
 730 740 750 760 770 780 790 800 810
 GAGCTAAACAGGAGCAAGCAAGCAAAAGTTAGAAAGATGCTGAAATGAAATCTCTAGAAGAAAGATTGGATGCTTGGCTGAAAT
 R A K Q E Q E A K Q K L E E D A E M K S L E E K I G C L L K 235
 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 TTTGGGTGATTTAGATGATCAGACCTGTAGAGAAGATTTACACATCTTTCTCAATCATGGTGAATAAATGGATAGACTTCGTCA
 F S G O L D D Q T C R E D L N I L F S M H G E I K W I D F V 265
 910 920 930 940 950 960 970 980 990
 GAGGAGCAAAAGAGGGGATAATTCTATTAAAGAAAAAGCCAAGGAAGCATTGGGTAAAGCCAAGATGCAATAATGGTAACTACAAT
 R G A K E G I I L F K E K A K E A L G K A K D A M H G N L Q 295
 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 TAAGGAACAAAGAGTGACTTGGGAAGTACTAGAGGAGAGGTGGAAAAAGAGCACTGAAGAAAAATAAGAACCAACGAATCCC
 L R M K E V T W E V L E G E Y E K E A L K K I I E D Q Q E S 325
 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170
 TAAACAAATGGAAGTCAAAAGGTCTGATGATTTAAAGGAAAGGAAAGGGTAATAAAGCTGCCAGCCTGGGTCTGGTAAAGGAAAGTAC
 L N K W K S K G R R F K G K G K G M K A A Q P G S G K G K V 355
 1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 AGTTTCAGGGCAAGAAACGAAATTTGCTAGTGATGATGAACATGATGAACATGATGAAAAATGGTGAACCTGGACCTGTGAAAAAGAGCAA
 Q F Q G K K T K F A S D D E H D E M D E N G A T G P V K R A 385
 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350
 GAGAAGAAACAGACAAAGAAACCTGCATCCAAACAACAGAAACAGAAATGGTGGTGGAGACCAGTAGTTTAGTAAACCAATTTTT
 R E E T O K E E P A S K Q Q K T E N G A G D Q 408
 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 ATTCATTTTAAATAGGTTTAAACGACTTTTGTGTTGCGGGGCTTTTAAAGGAAAAACCAATTAGGTCCACTTCAATGTCCACCTGTGAG
 1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530
 AAAGGAAAAATTTTTTGTGTTTAACTTGTCTTTTGTATGCAATGAGATTCTTTGAATGTATTGTCTGTTTGTGTTATTTCAGA
 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610 1620
 TGATTCAATATCAAAAGGAAGATTCTTCCATTAAATTCCTTTGTATATGAGAATGTATTAGTACAACTAACTAATAAATATATAC
 1630 1640 1650
 TATATGAAGAGCAAAAAAAAAAAAAA

Εικόνα 1. Συμπληρωματική αλληλουχία DNA και αλληλουχία αμινοξέων της ανθρώπινης πρωτεΐνης La.

Αργότερα, απομονώθηκαν La cDNA κλώνοι από ποντίκια, αρουραίους,



κουνέλια και *Drosophila melanogaster*²² (Εικόνα 2). Ειδικότερα σε επίπεδο αμινοξέων η ομολογία με την ανθρώπινη πρωτεΐνη La κυμαίνεται από 60% (*X laevis*) μέχρι περίπου 95% (βόεια). Οι δύο παραλλαγές της πρωτεΐνης La που παρατηρούνται στο *X. laevis* πιθανά κωδικοποιούνται από ένα γονίδιο²³ (Εικόνα 2).

hLa	1	MAENGDNEXM	AALAKICHQ	IEYYPGDFNL	PRDKPLKEQI	KLDEGWVPLE	IMIKFNRLNR
bLa	1	MAENGDNEXM	AALAKICHQ	IEYYPGDFNL	PRDKPLKEQI	KLDEGWVPLE	IMIKFNRLNR
mLa	1	MAENGDNEXM	TALEAKICHQ	IEYYPGDFNL	PRDKPLKEQI	KLDEGWVPLE	THIKFNRLNR
rLa	1	MAENGDNEXM	AALAKICHQ	IEYYPGDFNL	PRDKPLKEQI	KLDEGWVPLE	THIKFNRLNR
xLaA	1	MAENGDKQK	LDSDTKICEQ	IEYYPGDHNL	PRDKPLKQOI	LLDDGWVPLE	THIKFNRLSK
xLaB	1	MAENGDKQK	LDLDTKICEQ	IEYYPGDHNL	PRDKPLKQOV	LLDNGWVPLE	THIKFNRLSK

hLa	LTTFDNVIVE	ALSKSKAELM	EISEDKTKIR	RSPSKPLPEV	TDEYKNDVKN	REYIKGFPT
bLa	LTTFDNVIVE	ALSKSEAELM	EISEDKTKIR	RSPSKPLPEV	TDEYKNDVKN	REYIKGFPT
mLa	LTTFDNVIVQ	ALSKSKAKLM	EVSADKTKIR	RSPSRPLPEV	TDEYKNDVKN	REYIKGFPT
rLa	LTTFDNVIVQ	ALSKSKANLM	EVSADKTKIR	RSPSRPLPEV	TDEYKNDVKN	REYIKGFPT
xLaA	LTTFDNFIIQ	ALKSKSTELL	EINEEKCKIR	RSPAKPLPEL	NDEYKNSLKH	KSVYIKGFPT
xLaB	LTTFDNFIIQ	ALKSKSTELL	EINEEKCKIR	RSPAKPLPEL	NEDYKNSFKH	REYIKGFPT

hLa	DATLDDIKEW	LDDEGQVLNI	QMRRTLHKAF	KGSIFAVFDS	IESAKKPVET	PGQYKFTDL
bLa	DATLDDIKEW	LDDEGQVLNI	QMRRTLHKAF	KGSIFAVFDS	IESAKKPVET	PGQYKFTDL
mLa	DATLDDIKEW	LDDEGQVLNI	QMRRTLHKAF	KGSIFAVFDS	IESAKKPVET	PGQYKFTDL
rLa	DATLDDIKEW	LDDEGQVLNI	QMRRTLHKAF	KGSIFAVFDS	IESAKKPVET	PGQYKFTDL
xLaA	SATLDDIKEW	LDDEGQVLNI	QMRRTLHKAF	KGSIFAVFDS	IESAKKPVET	PGQYKFTDL
xLaB	SATLDDIKEW	LDDEGQVLNI	QMRRTLHKAF	KGSIFAVFDS	IESAKKPVET	PGQYKFTDL

hLa	LILPKEDYFA	KKNEERKQNK	VEAKLRAKQE	QEAKQKLEED	AEMKSLEEKI	GCLLKFSGDL
bLa	LILPKEDYFT	KKNEERKQNK	HEAKLRAKQE	QEAKQKLEED	AEMKSLEEKI	GCLLKFSGDL
mLa	LILPKEDYFA	KKNEERKQSK	VEAKLRAKQE	HEGRHK-PGS	TETRALEGKM	GCLLKFSGDL
rLa	LILPKEDYFA	KKNEERKQSK	VEAKLRAKQE	HEGRHK-PGS	TETRALEGKM	GCLLKFSGDL
xLaA	LILPKEDYFA	KKNEERKQSK	VEAKLRAKQE	HEGRHK-PGS	TETRALEGKM	GCLLKFSGDL
xLaB	LILPKEDYFA	KKNEERKQSK	VEAKLRAKQE	HEGRHK-PGS	TETRALEGKM	GCLLKFSGDL

hLa	DDQTCREDLH	FLPSNHGEIK	WIDFVRGAKK	GIILFKEKAK	EALGKAKDAN	NGNLQLRNKE
bLa	DDQTCREDLH	FLPSNHGEIK	WIDFVRGAKK	GIILFKEKAK	EALGKAKDAN	NGNLQLRNKE
mLa	DDQTCREDLH	FLPSNHGEIK	WIDFVRGAKK	GIILFKEKAK	EALGKAKDAN	NGNLQLRNKE
rLa	DDQTCREDLH	FLPSNHGEIK	WIDFVRGAKK	GIILFKEKAK	EALGKAKDAN	NGNLQLRNKE
xLaA	DNMTSREDLH	ALPQTHGEIK	WIDFVRGAKK	GIILFKEKAK	EALGKAKDAN	NGNLQLRNKE
xLaB	DNMTSREDLH	ALPQTHGEIK	WIDFVRGAKK	GIILFKEKAK	EALGKAKDAN	NGNLQLRNKE

hLa	VTWEVLEGEV	EKEALKKIIE	DQQESLNKWK	SKG-----	-----R	RFKGKGRGK
bLa	VTWEVLEGEV	EKEALKKIIE	DQQESLNKWK	SKG-----	-----R	RFKGKGRGK
mLa	VTWKVLEGEV	EKEALKKIIE	DQQESLNKWK	SKGHAAGRRF	KGSHVFTAAR	RFKGKGRGK
rLa	VTWKVLEGEV	EKEALKKIIE	DQQESLNKWK	SKGHAAGRRF	KGSHVFTAAR	RFKGKGRGK
xLaA	VKWEVLEGEV	EKEALKKIIE	DQQESLNKWK	SKGHAAGRRF	KGSHVFTAAR	RFKGKGRGK
xLaB	VKWEVLEGEV	EKEALKKIIE	DQQESLNKWK	SKGHAAGRRF	KGSHVFTAAR	RFKGKGRGK

hLa	ASDDEHDEHD	EN-----	-----	-----	-----	GATGPV
bLa	ASDDEHDEHD	EN-----	-----	-----	-----	GATGPV
mLa	ASDDEHDEHD	EN-----	-----	-----	-----	GATGPV
rLa	ASDDEHDEHD	EN-----	-----	-----	-----	GATGPV
rabLa	ASDDEHDEHD	EN-----	-----	-----	-----	GATGPV
xLaA	ASDDEHDEHD	EN-----	-----	-----	-----	GATGPV
xLaB	ASDDEHDEHD	EN-----	-----	-----	-----	GATGPV

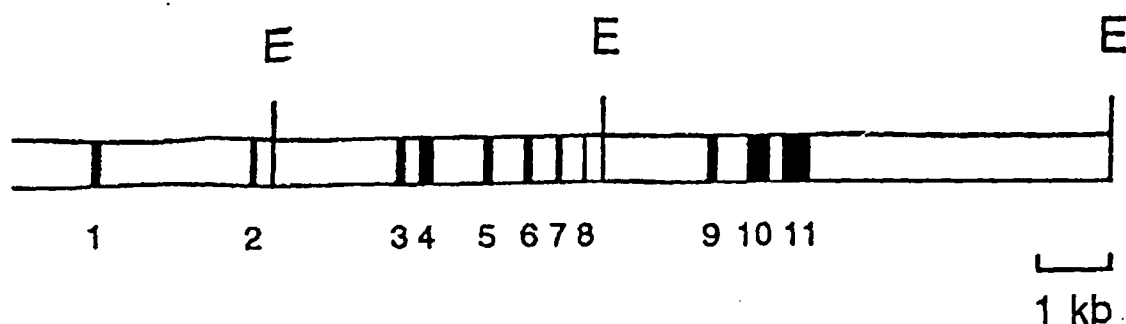
hLa	NGAGDQ	406
bLa	NGAGDQ	404
mLa	NGARDK	415
rLa	NGARDK	415
rabLa	NGAGDQ	?
xLaA	VG--DQ	424
xLaB	VG--DQ	427

Εικόνα 2. Αλληλουχία αμινοξέων της πρωτεΐνης La στα διάφορα είδη, hLa: ανθρώπινη, bLa: μοσχारीού mLa: ποντικού, rLa: αρουραίου, rabLa: κουνελιού (μόνο το καρβοξυτελικό μέρος είναι γνωστό), xLaA: παραλλαγή A του *X. laevis*, xLaB: παραλλαγή B του *X. laevis*. Τα δομικά στοιχεία της πρωτεΐνης La φαίνονται ως εξής:

RNP motif: σκιασμένο μεταξύ διπλών μπαρών άνω και κάτω,
PEST περιοχές: διακεκομμένες διπλές άνω-κάτω μπάρες,
Θέση σύνδεσης ATP: αστερίσκοι.

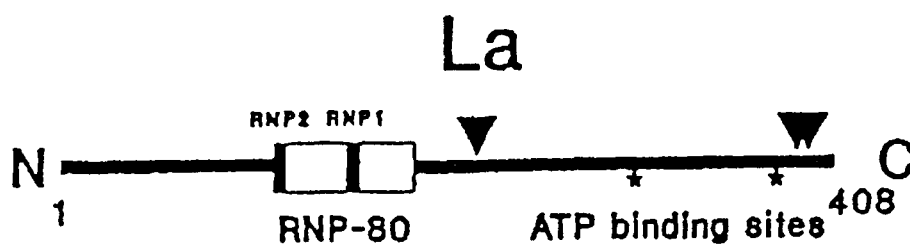
Η ανάλυση των γενομικών κλώνων απεκάλυψε ότι το ανθρώπινο γονίδιο της πρωτεΐνης La αποτελείται από 11 εξόνια (exons) και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 2.

Η δομή του υποκινητή (promoter) και ειδικότερα η απουσία του κουτιού TATA (TATA box) και η παρουσία μιας περιοχής πλούσιας σε βάσεις G και C είναι χαρακτηριστική ενός δομικού γονιδίου (housekeeping gene) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Σχηματική δομή του ανθρώπινου γονιδίου La. Τα εξόνια αριθμούνται από 1 έως 11. Οι θέσεις αναγνώρισης από το περιοριστικό ένζυμο EcoRI σημειώνονται ως E.

Τα δομικά στοιχεία της πρωτεΐνης La είναι τα παρακάτω (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Δομή της πρωτεΐνης La. Οι αριθμοί αναφέρονται στα αμινοξέα.

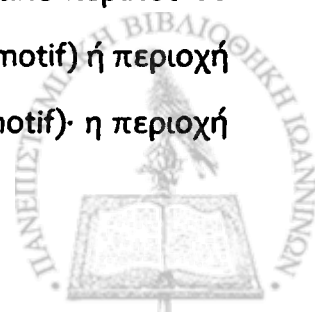
RNP-80: RNP-80 motif

▼: PEST περιοχές

N: αμινοτελικό άκρο

C: καρβοξυτελικό άκρο

Πρώτον, μια χαρακτηριστική περιοχή η οποία αποτελείται από περίπου 80 αμινοξέα και ονομάζεται περιοχή αναγνώρισης RNA (RNA-recognition motif) ή περιοχή σύνδεσης του RNA (RNA-binding domain) ή RNP-80 περιοχή (RNP-80 motif)· η περιοχή



αυτή βρίσκεται συχνά σε πρωτεΐνες που συνδέονται με RNA και φαίνεται ότι είναι απαραίτητη για την σύνδεση του RNA. Για τη σύνδεση αυτή είναι επίσης απαραίτητη η συμμετοχή αλληλουχιών από το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης La²⁴⁻²⁶.

Δεύτερον, δύο εν δυνάμει (putative) θέσεις πρόσδεσης ATP²². Ωστόσο, μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν επαρκή πειραματικά δεδομένα για το αν οι θέσεις αυτές είναι λειτουργικά ενεργείς.

Τρίτον, τρεις περιοχές που ονομάζονται PEST (PEST: αλληλουχία πλούσια στα αμινοξέα P, E, S και T)^{1*}. Είναι πλέον γνωστό ότι οι περιοχές αυτές είναι ευαίσθητες στη δράση πρωτεολυτικών ενζύμων²⁷, και έτσι εξηγείται η παρατηρούμενη ευαισθησία της πρωτεΐνης La στη δράση ενδογενών πρωτεασών κυτταρικών εκχυλισμάτων, που οδηγεί τελικά στα προϊόντα αποδόμησης μοριακού βάρους 43, 29 και 23 kDa²⁸.

Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάστηκαν X των 29kDa και Y των 23kDa²⁹. Η περιοχή X είναι πλούσια σε μεθειονίνη και αντιστοιχεί στο αμινοτελικό μέρος της πρωτεΐνης La, περιέχει δε την RNP περιοχή (RNP motif). Η περιοχή Y, πλούσια στα αμινοξέα σερίνη και θρεονίνη αντιστοιχεί στο καρβοξυτελικό μέρος. Οι δύο αυτές πρωτεΐνες συνδέονται με μια α-έλικα, αποτελούμενη από 130 περίπου αμινοξέα, η οποία περιλαμβάνει τις ανωτέρω αναφερόμενες PEST περιοχές. Έχουν επίσης περιγραφεί στο καρβοξυτελικό ήμισυ της πρωτεΐνης La, δύο αλληλουχίες αμινοξέων οι οποίες είναι ομόλογες με περιοχές της πρωτεϊνικής κινάσης PKR³⁰.

II. Λειτουργία των La RNPs συμπλόκων

Ήδη από την προηγούμενη δεκαετία διάφοροι ερευνητές χρησιμοποιώντας το απλό^{13,31} και το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο³², έδειξαν ότι η πρωτεΐνη La βρίσκεται κυρίως στον πυρήνα. Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας κλασσικές τεχνικές κυτταρικής κλασμάτωσης (cell-fractionation) βρέθηκε ότι το 20-50% της πρωτεΐνης La βρίσκεται στο κυτταροπλασματικό κλάσμα²⁸. Η πυρηνική κυρίως εντόπιση της πρωτεΐνης La καθώς και η σύνδεσή της με RNA-προϊόντα μεταγραφής της RNA πολυμεράσης-III

* P= προλίνη

S= σερίνη

E= γλουταμινικό οξύ

T= θρεονίνη



οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη La συμμετέχει στη διαδικασία της μεταγραφής. Πράγματι, οι Gottlieb και Steitz^{33,34} έδειξαν ότι η εν λόγω πρωτεΐνη απαιτείται για τον αποτελεσματικό και ακριβή τερματισμό της μεταγραφής της RNA πολυμεράσης-III.

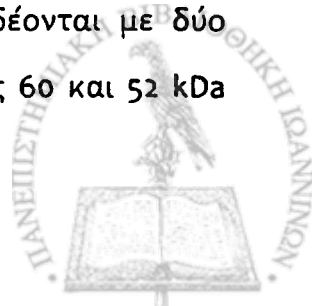
Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι κεκαθαρμένη πρωτεΐνη La μπορεί να δράσει σαν μια ελικάση εξαρτώμενη από ATP ικανή να προκαλέσει την τήξη (melt) υβριδίων RNA-DNA³⁵ προσομοιάζοντας έτσι στον προκαρυωτικό παράγοντα τερματισμού της μεταγραφής rho. Η ιδιότητα αυτή μπορεί να σχετίζεται με το ρόλο της στη διαδικασία μεταγραφής της RNA πολυμεράσης III. Επίσης, αν και ακόμη δεν έχει αποδειχθεί, φαίνεται ότι συμμετέχει και σε διάφορες άλλες διαδικασίες όπως η ωρίμανση και η μεταφορά από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα των προϊόντων μεταγραφής της RNA πολυμεράσης III και τέλος σε μερικές φάσεις της μετάφρασης^{36,37}. Ωστόσο, οι Guddat και συν³⁸, έδειξαν ότι στα ωκύτταρα του *X. laevis* η πρωτεΐνη La δεν συμμετέχει στη μεταφορά της πρόδρομης μορφής του 5S rRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα.

Όπως ήδη αναφέρθηκε η κυτταρική εντόπιση της πρωτεΐνης La είναι κυρίως πυρηνική και κάθε κύτταρο θηλαστικού περιέχει $\approx 2 \times 10^7$ αντίγραφα της πρωτεΐνης. Περιγράφηκε ωστόσο από μερικούς ερευνητές η ανακατανομή της πρωτεΐνης La (κυτταροπλασματική συγκέντρωση όπως δείχθηκε με ανοσοφθορισμό) σε κύτταρα τα οποία υφίστανται stress με ποικίλες μεθόδους (λοίμωξη με ιό, UV ακτινοβολία)^{36,39-43}.

III. Δομή των Ro RNPs συμπλόκων

Τα Ro RNPs αποτελούνται από αρκετές πρωτεΐνες Ro, οι οποίες συνδέονται με μια ομάδα των La RNAs που ονομάζονται YRNAs (Y= cYtoplasmic) (Πίνακας 1).

Τα YRNAs είναι προϊόντα μεταγραφής της RNA πολυμεράσης III και στα ανθρώπινα κύτταρα έχουν αναγνωρισθεί 4 διαφορετικά Ro RNA. Ονομάζονται hY1, hY3, hY4, hY5, και έχουν μήκος 83-112 νουκλεοτιδίων¹³. Αυτά συνδέονται με δύο αντιγονικές πρωτεΐνες Ro, την Ro60 και την Ro52 με μοριακό βάρος 60 και 52 kDa αντίστοιχα.



Πίνακας 1. Συστατικά των Ro RNPs

Ro RNAs

hY1, hY3, hY4, hY5 (άνθρωπο)

bY1, bY2, bY3, bY4 (βόδι)

cY1, cY3, cY4, cY5 (guinea pig)

lY1, lY2, lY3 (κουνέλι)

rY1A, rY1B, rY2 (αρουραίος)

mY1, mY2 (ποντίκι)

dY1, dY2 (πάπια)

Πρωτεΐνες Ro

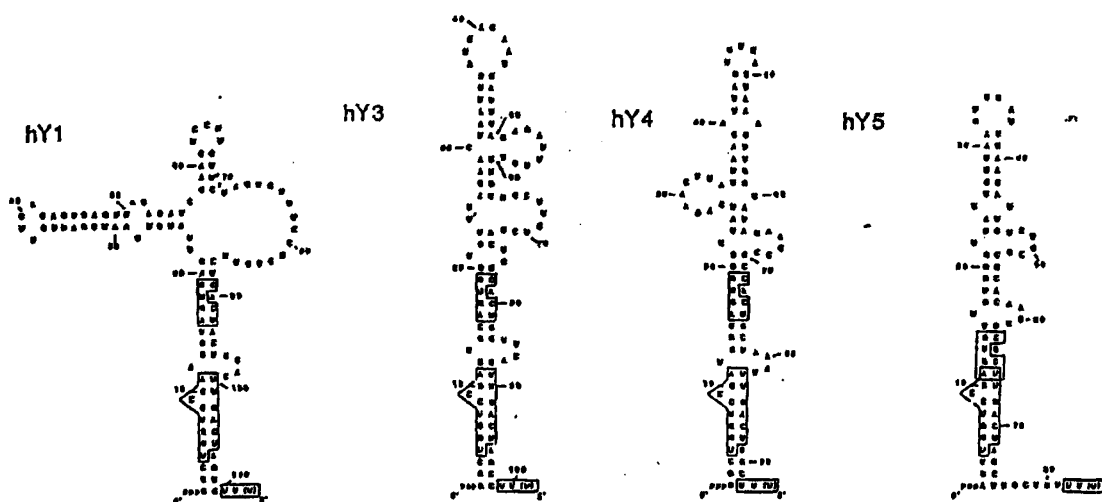
60 kDa (=Ro 60), 52 kDa (=Ro 52) (απαντώσα σε όλα τα είδη των κυττάρων)

60 kDa, 54 kDa (ερυθροκύτταρα)

60 kDa (Wil-2) πρωτεΐνη σύνδεσης με ασβέστιο (καλρετικουλίνη)

La

Οι αλληλουχίες των hYRNAs έχουν βρεθεί και οι προτεινόμενες δευτεροταγείς δομές τους⁴⁴⁻⁴⁶ φαίνονται στην Εικόνα 5.



Εικόνα 5. Δευτεροταγής δομή των Ro RNAs στον άνθρωπο. Οι περιοχές που περικλείονται είναι οι καλύτερα εξελικτικά διατηρημένες περιοχές.



Τα YRNAs έχουν στο 3' και 5' άκρο τους ζεύγη βάσεων σχηματίζοντας έτσι μια αγκύλη. Το χαμηλότερο μέρος της αγκύλης όλων των YRNAs περιλαμβάνει μια καλά διατηρημένη περιοχή, η οποία δεν αποδομείται με RNAση⁴⁶, πιθανά επειδή συνδέεται με πρωτεΐνη(ες) και έτσι προστατεύεται.

Πάντως, εν αντιθέσει με τα La RNPs, τα Ro RNPs παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια. Συγκεκριμένα, πρώτον, ο συνολικός αριθμός των κυτταρικών Ro RNAs διαφέρει ανάμεσα σε διάφορα είδη και ποικίλλει από 2 (κύτταρα ποντικού, πάπιας) έως 4 (κύτταρα ανθρώπου, μοσχαριού και guinea pig)^{47,48} (Πίνακας 1). Ωστόσο, χρησιμοποιώντας την τεχνική της ανοσοκατακρήμνισης RNA με αντι-Ro θετικούς ορούς, βρέθηκε ένα RNA ίδιου μεγέθους με το hY1RNA σε όλα τα είδη που μελετήθηκαν.

Δεύτερον, παρατηρήθηκαν διαφορές στην σύσταση των Ro RNAs μεταξύ κυττάρων του ίδιου είδους και συγκεκριμένα μεταξύ ανθρώπινων λεμφοκυττάρων, ερυθροκυττάρων και θρομβοκυττάρων. Ειδικότερα, οι πρωτεΐνες Ro στα ερυθροκύτταρα και αιμοπετάλια συνδέονται με δύο YRNA (hY1 και hY4 RNA)^{45,49}, εν αντιθέσει με τα τέσσερα RNA (hY1, hY3, hY4, hY5 RNA) με τα οποία συνδέονται σε άλλα ανθρώπινα κύτταρα.

Επιπρόσθετα, στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα βρέθηκαν δύο αντιγονικές πρωτεΐνες Ro μοριακού βάρους 60 kDa και 54 kDa⁴⁹, ενώ σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα, αιμοπετάλια και άλλα κύτταρα βρέθηκαν δύο άλλες αντιγονικές πρωτεΐνες, η πρωτεΐνη Ro μοριακού βάρους 60 kDa (αντιγονικά διακριτή από την πρωτεΐνη Ro 60 kDa των ερυθροκυττάρων) και η πρωτεΐνη Ro 52 kDa (Ro52)^{50,51}. Τέλος, μια τρίτη πρωτεΐνη 60 kDa απομονώθηκε από κύτταρα Wil-2 (μετασχηματισμένα (transformed) από EBV ανθρώπινα κύτταρα Β-λεμφοβλαστοειδούς σειράς)⁵².

Το 1990, περιγράφηκε η αλληλουχία του cDNA της πρωτεΐνης αυτής^{53,54} και φάνηκε ότι μοιάζει ως προς την αλληλουχία της με μια ανθρώπινη πρωτεΐνη που συνδέεται με ασβέστιο, την καλρετικουλίνη. Ωστόσο, αποδείχθηκε^{55,56} ότι η καλρετικουλίνη δεν είναι Ro αντιγόνο, αν και αντισώματα κατά καλρετικουλίνης βρέθηκαν σε ορούς ασθενών με ΣΕΛ⁵⁵.

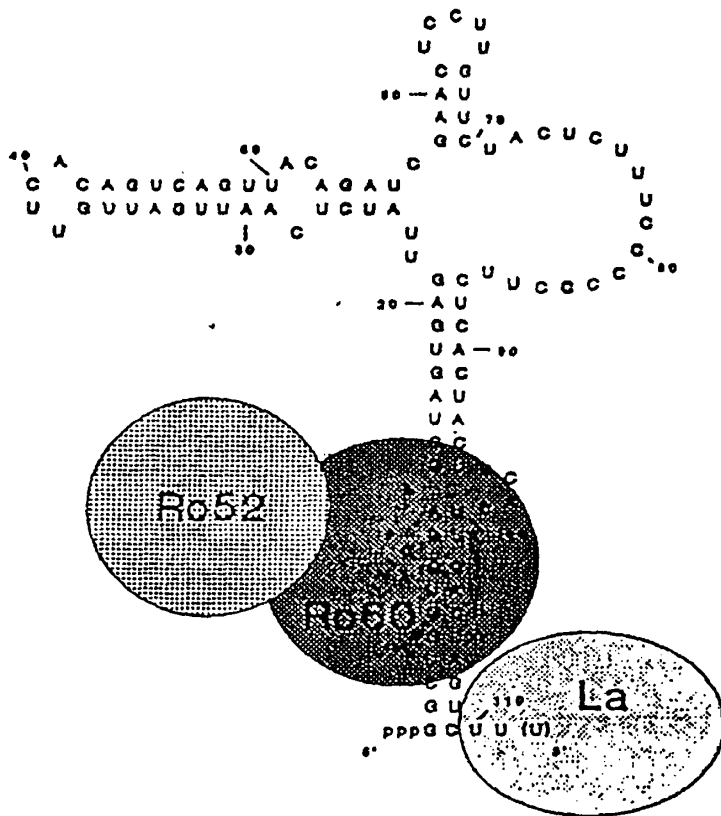


Τρίτον, μέσα σε ένα κύτταρο μπορούν να διακριθούν διαφορετικά Ro RNP σύμπλοκα, όπως φαίνεται από τις διαφορετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Κατά την διαδικασία κυτταρικής κλασμάτωσης κυττάρων HeLa τα Ro RNPs χωρίζονται σε διαφορετικές υποκατηγορίες⁵⁷. Υπολογίζοντας τα μοριακά βάρη των Ro συμπλόκων, βρέθηκε ότι αυτά είναι τελείως ετερογενή. Έτσι, βρέθηκαν Ro RNP σύμπλοκα με μοριακό βάρος 230 kDa (περιλάμβαναν μόνο hY4 RNA) και με μοριακά βάρη μεταξύ 300 και 350 kDa (μια κατηγορία Ro RNP συμπλόκων περιλάμβανε hY1, hY3, hY4 RNA και μία μόνο hY5 RNA).

Τα υψηλά μοριακά βάρη των Ro RNP συμπλόκων μπορούν να εξηγηθούν από την ύπαρξη περισσότερων του ενός πολυπεπτιδίων που συνδέονται με το μόριό τους. Μια άλλη απόδειξη της ετερογένειας των συμπλόκων αυτών μέσα στο κύτταρο αποτελεί η ανίχνευση ανθρώπινου αντιορού που καθιζάνει μόνο hY5RNA· αυτό υποδηλώνει ότι το hY5RNA έχει ειδικό επίτοπο⁵⁸.

Τα hYRNP σύμπλοκα περιλαμβάνουν το RNA και τρία πολυπεπτίδια, La, Ro60 και Ro52. Ειδικότερα, το ώριμο RNA των Ro RNAs περιέχει μια περιοχή πρόσδεσης της πρωτεΐνης La· έτσι φαίνεται ότι η πρωτεΐνη αυτή συνδέεται με το RNA πιο σταθερά και όχι παροδικά. Επίσης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 6, η σύνδεση των Ro και La αντιγόνων με το hYRNA είναι ανεξάρτητη. Ωστόσο η σύνδεση της Ro52 πρωτεΐνης στο hYRNA εξαρτάται από την παρουσία της πρωτεΐνης Ro60. Συγκεκριμένα, μια περιοχή της Ro60 μεταξύ των αμινοξέων από 276-318 απαιτείται για την σύνδεση της Ro52. Επιπρόσθετα, αποδείχθηκε ότι οι πιθανολογούμενες περιοχές σύνδεσης στο hYRNA της πρωτεΐνης Ro (διατηρημένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων κοντά στο κατώτερο άκρο του RNA) και της πρωτεΐνης La (κοντά στο 3' άκρο) είναι ουσιαστικά οι περιοχές σύνδεσης με τις πρωτεΐνες αυτές^{59,60}.





Εικόνα 6. Δευτεροταγής δομή του hY1RNA. Οι πρωτεΐνες δείχνονται με κύκλους.

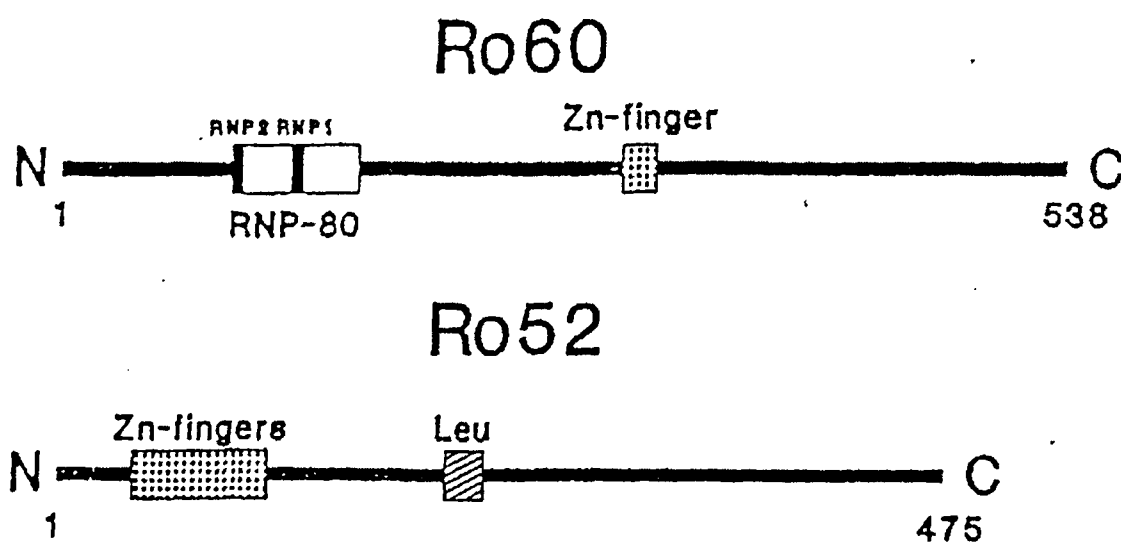
Πρόσφατες μελέτες έδειξαν επίσης ότι τόσο η καλρετικουλίνη, όσο και η νουκλεολίνη αποτελούν επιπρόσθετα στοιχεία αυτού του συμπλόκου^{61,62}.

α. Δομή της πρωτεΐνης Ro60

Δύο ομάδες ερευνητών έχουν απομονώσει και χαρακτηρίσει δύο αλληλουχίες συμπληρωματικού DNA (cDNA) που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη Ro 60^{63,64}. Εκτός από το 3' άκρο, τα δύο cDNA είναι σχεδόν ίδια και κωδικοποιούν δύο πρωτεΐνες που αποτελούνται από 538 και 525 αμινοξέα· τα μοριακά τους βάρη αντίστοιχα είναι 60.6 και 59.2 kDa. Η διαφορά τους βρίσκεται στο καρβοξυλικό τους άκρο όπου τα 24 αμινοξέα της προκύπτουσας αλληλουχίας πρωτεΐνης από τους Deutcher και συν⁶³ αντικαθίσταται από 11 διαφορετικά αμινοξέα στην πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το cDNA που ανακοινώθηκε από τους Ben-Chetrit και συν.⁶⁴ Δεδομένου ότι οι αλληλουχίες συμπληρωματικού DNA ελήφθησαν από ανθρώπινα κύτταρα διαφορετικών όμως ιστών, δεν είναι ακόμη ξεκάθαρο αν οι προαναφερόμενες διαφορές οφείλονται σε εναλλακτική διασύνδεση (alternative

splicing) RNA του παράγωγου ενός γονιδίου ή σε διαφορετική έκφραση πιθανά 2 γονιδίων που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη Ro.

Οι Ro πρωτεΐνες παρουσιάζουν χαρακτηριστικές περιοχές με αυξημένη αλληλουχία αμινοξέων. Αυτές οι περιοχές των πρωτεϊνών Ro όπως προκύπτει από ευρεθείσες αλληλουχίες cDNA περιλαμβάνουν μια RNP περιοχή (RNP-80 motif) και μια περιοχή εν είδει δακτύλου ψευδαργύρου (zinc finger) (Εικόνα 7). Η RNP περιοχή (RNP-80 motif) παίζει καθοριστικό ρόλο στη σύνδεση RNA-Ro60. Ωστόσο, φαίνεται ότι η διαμόρφωση της πρωτεΐνης Ro60 είναι εξαιρετικά σημαντική τόσο για τη σύνδεση με τα YRNAs⁵⁹, όσο και για την αντιγονικότητά της⁶⁵. Η περιοχή εν είδει δακτύλου ψευδαργύρου χαρακτηρίζεται από αυξημένο αριθμό αμινοξέων κυστεΐνης και ιστιδίνης που όπως έχει περιγραφεί χαρακτηρίζει πρωτεΐνες ικανές να συνδέονται με νουκλεϊκά οξέα (DNA ή RNA) ή ακόμα και με άλλες πρωτεΐνες^{66,67}.



Εικόνα 7. Δομή των Ro 60 και Ro 52 πολυπεπτιδίων.

Οι αριθμοί αναφέρονται στα αμινοξέα.

RNP80: RNP περιοχή.

RNP1, RNP2: οι καλύτερα διατηρούμενες αλληλουχίες της RNP περιοχής.

Leu: εν είδει φερμουάρ (zipper) λευκίνης.

Zn finger: περιοχή δακτύλου ψευδαργύρου

N: αμινοτελικό άκρο

C: καρβοξυτελικό άκρο



β. Δομή της πρωτεΐνης Ro52

Μέχρι πρόσφατα, η πρωτεΐνη Ro52 δεν μπορούσε να ανιχνευθεί με την τεχνική Western blot και αυτό γιατί στην ηλεκτροφόρηση γέλης πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκυλοθειϊκού νατρίου (SDS) η πρωτεΐνη αυτή μετακινείται με την πρωτεΐνη La. Ωστόσο, αλλάζοντας την σχέση ακρυλαμιδίου-διακρυλαμιδίου κατέστη δυνατός ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών Ro52 και La και επομένως η ανίχνευσή τους με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης^{60,68}.

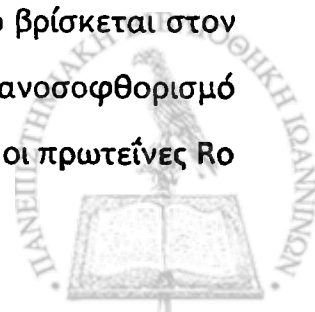
Έως τώρα δύο αλληλουχίες συμπληρωματικού DNA του Ro52 έχουν απομονωθεί και χαρακτηρισθεί^{69,70}. Εκτός από πολύ μικρές διαφορές και τα δύο cDNA κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη με MB 54.1 kDa. Δεν βρέθηκε ομολογία με την πρωτεΐνη Ro60.

Η δευτεροταγής δομή της πρωτεΐνης Ro52 παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον (Εικόνα 7). Βρέθηκε ότι στο αμινοτελικό της άκρο υπάρχουν αρκετές περιοχές εν είδει δακτύλου ψευδαργύρου ενώ στο κέντρο της πρωτεΐνης υπάρχει μια περιοχή εν είδει φερμουάρ λευκίνης (leukine zipper motif)^{69,70}. Αυτές οι περιοχές περιγράφησαν σε πρωτεΐνες που συνδέονται με DNA, είναι όμως πλέον γνωστό ότι συμμετέχουν ακόμη στη σύνδεση πρωτεΐνης με πρωτεΐνη καθώς επίσης και στο σχηματισμό διμερών⁷¹⁻⁷⁴.

Τέλος, αξιοσημείωτο είναι ότι η πρωτεΐνη Ro52 δεν περιέχει την RNP περιοχή (RNP motif), γεγονός που δικαιολογεί τη μη ανευρισκόμενη σύνδεση του Ro52 με τα Ro RNAs.

IV. Λειτουργία των Ro RNPs συμπλόκων.

Η ενδοκυττάρια εντόπιση των Ro RNPs συμπλόκων, δεν έχει πλήρως ξεκαθαριστεί. Βρέθηκε ωστόσο ότι το 30% περίπου της πρωτεΐνης Ro βρίσκεται στον πυρήνα⁷⁵, πράγμα που δικαιολογεί την πυρηνική εντόπιση κατά τον ανοσοφθορισμό των αντι-Ro αντισωμάτων. Επίσης, το YRNAs με τα οποία συνδέονται οι πρωτεΐνες Ro



και La για να σχηματίσουν τα Ro RNP σύμπλοκα είναι κυρίως κυτταροπλασματικά. Φαίνεται λοιπόν, ότι οι πρωτεΐνες Ro και La συνδέονται με τα YRNAs που συντίθενται στον πυρήνα και στη συνέχεια μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα.

Επίσης, λόγω των δομικών χαρακτηριστικών των Ro RNPs και της σχέσης τους με την πρωτεΐνη La πιστεύεται ότι συμμετέχουν στη μεταγραφή, επεξεργασία και μεταφορά των RNA. Επιπρόσθετα, τα κυτταροπλασματικά Ro RNPs σύμπλοκα πιστεύεται ότι συμμετέχουν στη μετάφραση και αποθήκευση του ώριμου mRNA⁷⁶.

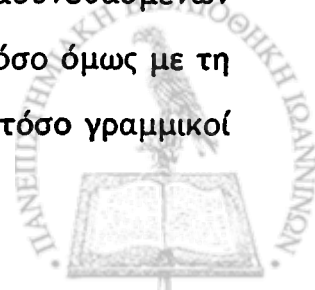


Αυτοεπίτοποι των Πρωτεϊνών Ro και La

Το τελευταία χρόνια πολλές μελέτες έγιναν για να καθοριστούν οι αντιγονικοί επίτοποι των αυτοαντισωμάτων (Β-κυτταρικοί επίτοποι)^{77,78}. Οι επίτοποι αυτοί μπορεί να είναι είτε γραμμικοί είτε ασυνεχείς. Οι γραμμικοί επίτοποι σχηματίζονται από γειτονικά αμινοξέα στην πρωτογενή δομή μιας πρωτεΐνης, ενώ οι ασυνεχείς από αμινοξέα απομακρυσμένων περιοχών στην αλληλουχία μιας πρωτεΐνης που βρίσκονται όμως κοντά στην τριτοταγή τους διαμόρφωση.

Για τον καθορισμό των επιτόπων, έχουν μέχρι τώρα χρησιμοποιηθεί διάφορες τεχνικές. Πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι η πρωτεολυτική πέψη κεκαθαρμένου αντιγόνου και ο έλεγχος των τμημάτων που προκύπτουν με αυτοαντισώματα. Στη μέθοδο αυτή, τα τμήματα του αντιγόνου που προκύπτουν μετά την πρωτεολυτική πέψη είναι συνήθως μεγάλα (15-35 kDa) και ο καθορισμός επακριβούς αντιγονικού επίτοπου δύσκολος.

Η δεύτερη μέθοδος περιλαμβάνει τη δημιουργία ανασυνδυασμένων τμημάτων του αντιγόνου και ελέγχου αυτών με αυτοαντισώματα. Τόσο όμως με τη μέθοδο αυτή, όσο και με την προηγούμενη, αν και αναγνωρίζονται τόσο γραμμικοί



όσο και ασυνεχείς επίτοποι, δεν μπορεί να καθορισθεί επακριβώς η θέση και το μήκος του επίτοπου. Επιπρόσθετα, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη μπορεί να διαφέρει από το φυσικό μόριο, το οποίο μετα-μεταγραφικά υφίσταται γλυκοζυλιώσεις ή/και φωσφορυλιώσεις που διαμορφώνουν την τελική τριτοταγή δομή του⁷⁹.

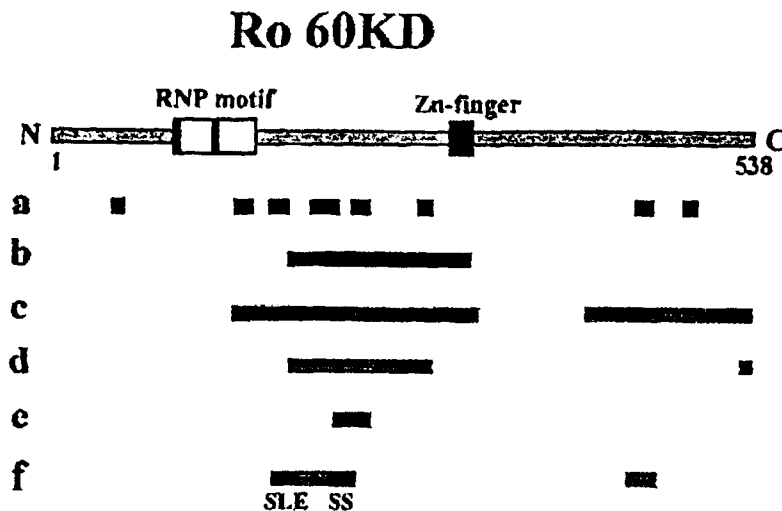
Τέλος, μια τρίτη μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον καθορισμό των επιτόπων είναι η σύνθεση πολλαπλών αλληλοεπικαλυπτόμενων πεπτιδίων, που καλύπτουν όλη την αλληλουχία της πρωτεΐνης. Αν και η μέθοδος αυτή αναγνωρίζει κυρίως γραμμικούς επίτοπους, όταν το πεπτίδιο είναι αρκετά μεγάλο (μεγαλύτερο από 10-12 αμινοξέα) μπορούν να αναγνωρισθούν και ασυνεχείς επίτοποι⁸⁰.

1. Αυτοεπίτοποι της Ro60 πρωτεΐνης

Οι Itoh και Reichlin⁸¹ έδειξαν ότι το 23% των αντι-Ro θετικών ορών συνδέεται μόνο με το φυσικό μόριο. Σε άλλη μελέτη⁸² χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένα τμήματα της Ro60 πρωτεΐνης, βρέθηκε ότι ένα ποσοστό ορών που ήταν θετικοί με ανοσοδιάχυση, δεν αναγνώριζαν την Ro60 πρωτεΐνη με την τεχνική Western Blot, γεγονός που υποδεικνύει την σημασία του φυσικού μορίου. Ωστόσο, οι οροί αυτοί, ήταν οροί ασθενών με σ.Sjögren ενώ οροί ασθενών με ΣΕΛ αναγνώριζαν και την αποδομημένη (denatured) μορφή του αντιγόνου⁸³. Χρησιμοποιώντας σε άλλη μελέτη⁸⁴ ανασυνδυασμένα τμήματα της Ro60 πρωτεΐνης καθορίστηκε ένας μείζον αντιγονικός επίτοπος στο μεσαίο τμήμα της πρωτεΐνης (181-320), που αναγνωρίζονταν από το 86% των ορών και δύο ελάσσονα, στο καρβοξυ- και στο αμινο-τελικό άκρο, που αναγνωρίζονταν από το 20% των ορών. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και από άλλους ερευνητές^{82,86,87}.

Η ακριβής θέση των αντιγονικών επιτόπων προσδιορίστηκε με τη χρήση συνθετικών πεπτιδίων (Εικόνα 8). Οι Wahgen και συν.⁸⁸ περιέγραψαν ένα μείζονα αντιγονικό επίτοπο στο πεπτίδιο 216-245. Σε πιο εκτενή μελέτη⁸⁹, βρέθηκε μείζον αντιγονικός επίτοπος στο πεπτίδιο 216-232, ο οποίος αναγνωρίζεται κυρίως από ορούς ασθενών με σ. Sjögren, ενώ οι οροί ασθενών με ΣΕΛ αναγνωρίζουν ένα μείζονα

αντιγονικό επίτοπο στο πεπτίδιο 175-184. Ωστόσο, άλλοι ερευνητές, χρησιμοποιώντας συνθετικά οκταπεπτίδια περιέγραψαν την ύπαρξη αντιγονικών επιτόπων σε όλο το μήκος της πρωτεΐνης Ro60⁹⁰⁻⁹⁴.



Εικόνα 8. Αυτοεπίτοποι της πρωτεΐνης Ro60 kD όπως περιγράφησαν στις παρακάτω παραπομπές: a. Scofield και συν.⁹⁰⁻⁹⁴, b. Wahren κ.ά.⁹⁴, c. McCauliffe κ.ά.⁸², d. Veldhoven κ.ά.⁸⁷, e. Wahren κ.ά.⁸⁸ and f. Routsias κ.ά.⁸⁹.

Τέλος, στο καρβοξυλικό άκρο βρέθηκε ένας επίτοπος (αμινοξέα 485-492) ο οποίος παρουσιάζει ομόλογη αλληλουχία με τον ιό της φυμαλλιδώδους στοματίτιδας⁹⁴. Ωστόσο, η περιοχή αυτή αναγνωρίζεται από τη μειονότητα των αντι-Ro αντισωμάτων⁹⁵.

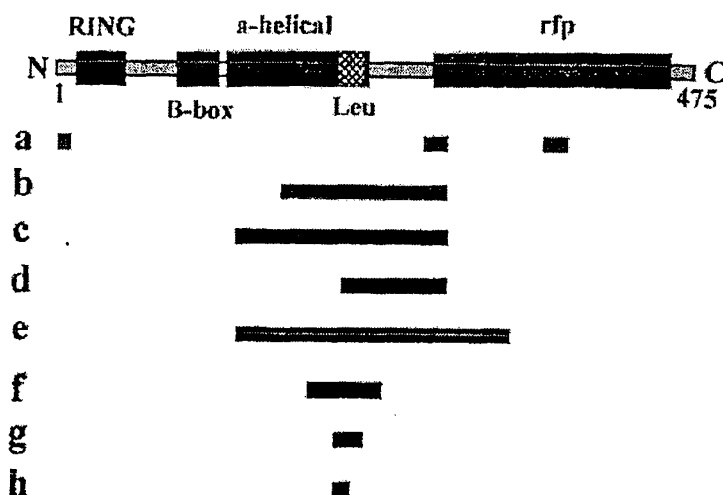
II. Αυτοεπίτοποι της Ro52 πρωτεΐνης

Αρκετές μελέτες, χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένα τμήματα της πρωτεΐνης ή συνθετικά ολιγοπεπτίδια⁹⁶⁻¹⁰², καθόρισαν ένα κύριο επίτοπο στην περιοχή εν είδει φερμουάρ λευκίνης (αμινοξέα 183-232, Εικόνα 9). Ωστόσο, σε άλλη μελέτη¹⁰³, όπου χρησιμοποιήθηκαν αλληλοεπικαλυπτόμενα ολιγοπεπτίδια (αποτελούμενα από 3 αμινοξέα), δεν αναγνωρίσθηκαν επίτοποι στην περιοχή αυτή, χρησιμοποιώντας όμως



ανασυνδυασμένα τμήματα της πρωτεΐνης Ro52, έχουν περιγραφεί δύο ασυνεχείς επίτοποι στην περιοχή εν είδει δακτύλου ψευδαργύρου¹⁰⁴.

Ro 52KD



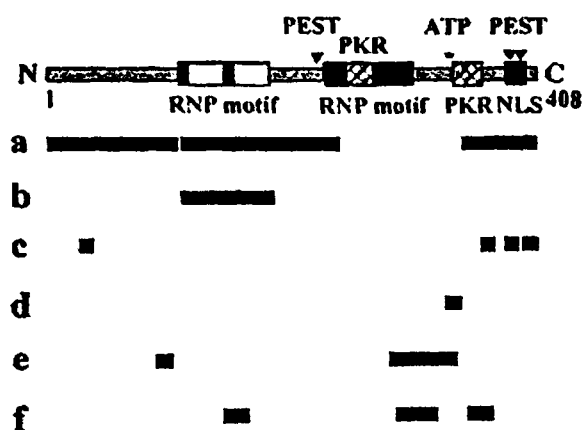
Εικόνα 9. Αυτοεπίτοποι της πρωτεΐνης Ro52 kD όπως περιγράφησαν στις παρακάτω παραπομπές: a. Ricchiuti κ.ά.¹⁰³, b. Byuon κ.ά.⁹⁷, c. Blange κ.ά.⁹⁸, d. Bozic κ.ά.⁹⁶, e. Dorner κ.ά.⁹⁹, f. Dorner κ.ά.¹⁰⁰, g. Kato κ.ά.¹⁰¹ and h. Frank κ.ά.¹⁰².

III. Αυτοεπίτοποι της La 48 πρωτεΐνης.

Αρχικά, χρησιμοποιώντας ενζυματική πέψη της φυσικής πρωτεΐνης αναγνωρίστηκαν τρεις επίτοποι. Ένας επίτοπος βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης La (ονομάστηκε A: αμινοξέα 1-107), ένας βρίσκεται στο κέντρο της πρωτεΐνης (ονομάστηκε C: αμινοξέα 111-242) και τέλος, ένας άλλος επίτοπος στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης La (ονομάστηκε D: αμινοξέα 243-408)¹⁰⁵. Ακολούθησαν άλλες μελέτες οι οποίες υποδείκνυαν αντιγονικούς επίτοπους σε διάφορες θέσεις της πρωτεΐνης La (Εικόνα 10)¹⁰⁶⁻¹¹¹. Οι θέσεις αυτές αντιστοιχούν σε λειτουργικά τμήματα της πρωτεΐνης (RNP περιοχή και θέση σύνδεσης με ATP).



La 48KD



Εικόνα 10. Αυτοεπίτοποι της πρωτεΐνης La 48kD όπως περιγράφησαν στις παρακάτω παραπομπές: a. McNeillage κ.ά.^{105,106}, b. Rischmueller κ.ά.¹⁰⁷, c. Haaheim κ.ά.¹⁰⁸, d. Troster κ.ά.¹⁰⁹, e. Kohsaka κ.ά.¹¹⁰ and F. Tzioufas κ.ά.¹¹¹.

Συντομεύσεις: NLS (nuclear localization signal): σινιάλο πυρηνικού εντοπισμού

PEST: αλληλουχία πλούσια στα αμινοξέα P, E, S και T.

PKR: περιοχή ομόλογη με την RNA εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση.

Κλινική Σημασία και Παθογενετικός ρόλος των αντι-Ro και αντι-La Αντισωμάτων

Αυτοαντισώματα έναντι των αντιγόνων Ro και La βρίσκονται σε ορούς ασθενών με διάφορα αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα (Πίνακας 2).

Παρατηρώντας τον Πίνακα 2 βλέπουμε ότι τα ποσοστά ανίχνευσης των αντι-Ro και αντι-La αντισωμάτων ποικίλλουν και αυτό οφείλεται κατά ένα μέρος στην χρησιμοποίηση διαφορετικών μεθόδων για την ανίχνευσή τους. Έχει αναφερθεί ότι η ανίχνευση των αντι-Ro αντισωμάτων με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης είναι περισσότερο ευαίσθητη από την αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση· το αντίθετο συμβαίνει με την ανίχνευση των αντι-La αντισωμάτων¹¹²⁻¹¹⁵. Επιπρόσθετα, πρόσφατα αναπτύχθηκε μια πολύ ευαίσθητη και ειδική μέθοδος, η ανοσοκατακρήμνιση RNA, με την οποία κατέστη δυνατόν να ανιχνευθούν αντι-La αντισώματα ακόμη και σε πολύ χαμηλούς τίτλους¹¹⁶. Τέλος, σε ορούς υγιών μαρτύρων αναφέρθηκαν χαμηλοί τίτλοι αντι-Ro και αντι-La αντισωμάτων¹¹⁷. Αυτό ενισχύεται και από την παρατήρηση ότι λεμφοκύτταρα από φυσιολογικούς δότες όταν διεγερθούν *in vitro* με μιτογόνο συνθέτουν IgG τάξης αντι-La αντισώματα¹¹⁸.



Πίνακας 2. Συχνότητα αντι-Ro και αντι-La αντισωμάτων σε ορούς ασθενών με διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα.

Νόσος	Μέθοδος ανίχνευσης	Αντι-Ro (%)	Αντι-La (%)	Παραπομπές
ΣΕΛ	ELISA	55	24	229
	ID	51	6	230
	ID	63	12	85
	CIE, ID	35	15	224
	CIE	12-28	18-45	194
	IB	17	10	226
	RNA	ΔΜ	35	116
σS	ELISA	96	87	188
	CIE, ID	60	40	224
	CIE, ID	63	40	187
	ID	83	25	230
	IB	38	77	226
	RNA	ΔΜ	58	116
ΡΑ	ELISA	28	22	229
	ID	15	0	230
	RNA	ΔΜ	16	116
	CIE	13	1	130
Πολυμυοσίτιδα	ELISA	18	18	229
	ID	9	0	230
Υγιείς μάρτυρες	ELISA	17.5	7.5	117
	ELISA	5	0	229
	ID	2	0	230
	RNA	ΔΜ	0	116

ΣΕΛ: Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, σS: Σύνδρομο Sjögren, ΡΑ: Ρευματοειδής αρθρίτιδα,
 ELISA: ανοσοπροσροφητική μέθοδος ενζυμικού προσδιορισμού,
 ID: Ανοσοδιάχυση, CIE: αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση, IB: ανοσοαποτύπωση,
 RNA: ανοσοκατακρήμνιση RNA, ΔΜ: δεν μελετήθηκαν



Αντι-La αντισώματα ανιχνεύονται κυρίως σε ασθενείς με σS και ΣΕΛ. Φαίνεται ότι σε ασθενείς με ΣΕΛ η παρουσία αντι-La αντισωμάτων αποτελεί δείκτη συνύπαρξης με σS (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Συχνότητα αντι-Ro και αντι-La αντισωμάτων σε ασθενείς με ΣΕΛ και φυσιολογική βιοψία μικρών λεμφαδένων του χείλους ή βιοψία συμβατή με σS (αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση)*.

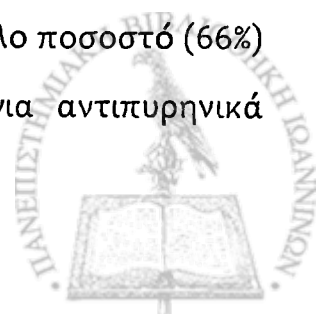
Ασθενείς με ΣΕΛ	Αντι-Ro	Αντι-La
	% θετικοί	
Φυσιολογική βιοψία χείλους (N=54)	40	7
Βιοψία χείλους συμβατή με σS (N=18)	72	33

* ευρήματα του εργαστηρίου μας

Αντι-Ro αντισώματα βρίσκονται σε ορούς ασθενών με διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα όπως ΣΕΛ¹¹⁹, ομόζυγο ανεπάρκεια C₂ και C₄^{120,121}, συνύπαρξη σS και ΣΕΛ (S.S./SLE overlap syndrome)¹²², πρωτοπαθή χολική κίρρωση και πολυμυοσίτιδα¹²³.

Στους ασθενείς με ΣΕΛ, η παρουσία του αντι-Ro αντισώματος συνδέεται με τρία κλινικά σύνδρομα, τον ANA αρνητικό λύκο, τον υποξύ δερματικό λύκο¹²⁴ και το σύνδρομο του νεογνικού λύκου¹²⁵.

Οι ασθενείς με ΣΕΛ που απαρτίζουν την ομάδα του ANA αρνητικού λύκου χαρακτηρίζονται κλινικά από την παρουσία φωτοευαισθησίας και διάχυτου ερυθηματώδους εξανθήματος και απουσία άλλων συστηματικών εκδηλώσεων. Η εξέταση για αντιπυρηνικά αντισώματα με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα Hep 2 κύτταρα είναι αρνητική· ωστόσο, αν χρησιμοποιηθούν ως υπόστρωμα άλλες κυτταρικές σειρές, ένα μεγάλο ποσοστό (66%) των προηγούμενα ANA αρνητικών λύκων βρίσκονται θετικοί για αντιπυρηνικά αντισώματα¹²⁶.



Οι ασθενείς με υποξύ δερματικό λύκο χαρακτηρίζονται κλινικά από ήπια κλινική εικόνα, με εκδηλώσεις κυρίως από το δέρμα, όπως φωτοευαισθησία και πολυκυκλικό δακτυλιοειδές ή ψωριασιόμορφο εξάνθημα. Η συχνότητα προσβολής των νεφρών και του κεντρικού νευρικού συστήματος είναι χαμηλή. Εργαστηριακά το ποσοστό των θετικών ως προς τα αντιπυρηνικά αντισώματα ορών είναι υψηλό (90%), όπως επίσης και η εμφάνιση του αντι-Ro αντισώματος (70%) που στο 50% συνοδεύεται από το αντι-La αντίσωμα¹²⁴.

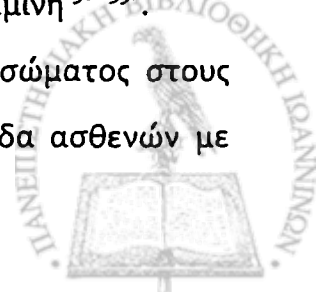
Ασθενείς με ανεπάρκεια C₂ και C₄ τείνουν να έχουν αντι-Ro αντισώματα χωρίς αντι-La αντισώματα, δερματικές εκδηλώσεις όπως ο υποξύς δερματικός λύκος και πολυαρθρίτιδα. Δεν περιγράφεται νεφρική προσβολή ή συμμετοχή του κεντρικού νευρικού συστήματος (Κ.Ν.Σ.)^{120,121,127}

Το σύνδρομο επικάλυψης σS/ΣΕΛ χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση κλινικών εκδηλώσεων ΣΕΛ σε ασθενή που πάσχει από σS. Ως ομάδα ασθενών χαρακτηρίζονται από την παρουσία HLA-DR3, αντι-Ro και αντι-La αντισωμάτων και κλινικές εκδηλώσεις όπως, μη θρομβοπενική πορφύρα, πολυαρθρίτιδα και σε μικρό ποσοστό προσβολή του ΚΝΣ¹²².

Οι ίδιες κλινικές εκδηλώσεις (υποξύς δερματικός λύκος, πορφύρα, υπεργαμμοσφαιριναιμία) και παρουσία αντι-Ro αντισωμάτων, παρατηρούνται και σε άλλα αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα όπως ρευματοειδής αρθρίτις (ΡΑ) και συστηματική σκλήρυνση (ΣΣ).

Τα αντι-Ro αντισώματα ανιχνεύονται σε ποσοστό 3-15% στον ορό αρρώστων με ΡΑ¹²⁸⁻¹²⁹ και η παρουσία τους συνδέεται με τη συνύπαρξη σS. Με αρκετές εργασίες καταδεικνύεται ότι οι περισσότεροι ασθενείς με ΡΑ και αντι-Ro αντισώματα στον ορό τους παρουσιάζουν εξωαρθρικές εκδηλώσεις όπως ξηροστομία, φωτοευαισθησία, πορφύρα, λευκοπενία και ελάττωση παραγόντων του συμπληρώματος^{128, 130-134}. Επίσης, έχει περιγραφεί ισχυρή συσχέτιση της παρουσίας αντι-Ro αντισωμάτων και ανάπτυξη παρενεργειών σε θεραπεία με άλατα χρυσού και D-πενικιλλαμίνη¹³⁰⁻¹³³.

Συγκεκριμένα, περιγράφηκε ότι η παρουσία αντι-Ro αντισώματος στους Έλληνες ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα καθορίζει μια υποομάδα ασθενών με



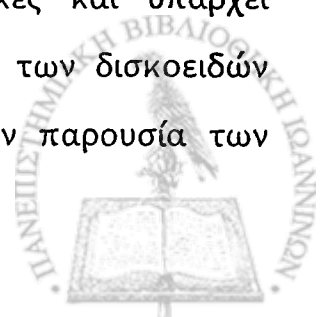
ιδιαίτερα χαρακτηριστικά¹²⁸. Οι ασθενείς αυτοί δεν εμφανίζουν διαφορετικές κλινικές εκδηλώσεις RA από εκείνους που είναι αρνητικοί ως προς την παρουσία του αντι-Ro αντισώματος, είναι όμως σχεδόν αποκλειστικά γυναίκες, 50% έχουν βιοψία μικρών σιελογόνων αδένων συμβατή με σS και πολύ συχνά παρουσιάζουν ανεπιθύμητες ενέργειες στη θεραπεία με D-πενικιλλαμίνη.

Αντι-Ro αντισώματα ανευρίσκονται επίσης σε ποσοστό 3-11% στον ορό ασθενών με συστηματική σκλήρυνση¹³⁵⁻¹³⁷ και συσχετίζονται με την παρουσία συνδρόμου ξηροστομίας-ξηροφθαλμίας^{135,136,138}, φωτοευαισθησία¹³⁸ και σοβαρής πνευμονικής προσβολής^{135,139}.

Επίσης, αντι-Ro αντισώματα ανευρίσκονται σε ποσοστό 5-15% σε ασθενείς με δερματομυοσίτιδα/πολυμυοσίτιδα (ΔΜ/ΠΜ), μαζί με αντι-Jo1 αντισώματα¹⁴⁰⁻¹⁴². Στους ασθενείς αυτούς ανιχνεύονται κυρίως αντι-Ro52 αντισώματα και όχι αντι-Ro60 αντισώματα¹⁴²⁻¹⁴⁴.

Στους ασθενείς με ΣΕΛ, η παρουσία αντι-Ro αντισωμάτων έχει συσχετισθεί με μη διαβρωτική καταστροφική (erosive deforming) αρθροπάθεια που ονομάζεται Jaccoud αρθροπάθεια, λόγω φλεγμονής των μαλακών μορίων^{145,146}. Μερικοί συγγραφείς περιγράφουν ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας αντι-Ro αντισωμάτων και εμφάνισης συμπτωμάτων ΣΕΛ μετά την ηλικία των 50 ετών. Η υποομάδα αυτή ασθενών με ΣΕΛ χαρακτηρίζεται από αυξημένη εμφάνιση νευρολογικών διαταραχών, διάμεση πνευμονική νόσο, παρουσία αντι-Ro και αντι-La αντισωμάτων, χαμηλά όμως ποσοστά νεφρικής προσβολής¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Η διάμεση πνευμονίτιδα σε ασθενείς με ΣΕΛ έχει συσχετισθεί με παρουσία αντι-Ro αντισωμάτων^{148,150,151}, δεν υπάρχουν όμως δεδομένα για συμμετοχή των αντισωμάτων αυτών στην παθογένεση της πνευμονικής νόσου.

Άλλη πρόσφατη μελέτη¹⁵² σε Έλληνες ασθενείς με ΣΕΛ έδειξε ότι αντι-Ro και αντι-La αντισώματα ανευρίσκονται συχνότερα σε νέες γυναίκες και υπάρχει στατιστικά σημαντική συχνότητα του εξανθήματος στις παρειές, των δισκοειδών βλαβών, της ορογονίτιδας και του φαινομένου Raynaud με την παρουσία των αντισωμάτων αυτών.



Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι σε μελέτη ασθενών με ΣΕΛ η εμφάνιση αντι-La αντισωμάτων προηγείται της εμφάνισης της νόσου μέχρι και 9 χρόνια πριν (μέσος όρος 3.3 έτη)¹⁵³.

Έχει παρατηρηθεί ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των αντι-Ro και αντι-La αντισωμάτων. Αντι-Ro αντισώματα χωρίς αντι-La αντισώματα ανιχνεύονται σε πολλούς ορούς ενώ τα αντι-La αντισώματα συνήθως συνυπάρχουν με αντι-Ro αντισώματα. Αντι-Ro και αντι-La αντισώματα, έχει αναφερθεί ότι βρίσκονται συχνότερα σε ασθενείς με ρευματοειδή παράγοντα, πολυκλωνική υπεργαμμασφαιριναιμία και κρυοσφαιριναιμία¹⁵⁴, ανεξάρτητα της υποκείμενης αυτοάνοσης νόσου. Έχει περιγραφεί διακύμανση των τίτλων των αντι-Ro αντισωμάτων κατά τη διάρκεια της νόσου σε ασθενείς με ΣΕΛ και σS¹⁵⁵⁻¹⁵⁸, δημιουργώντας έτσι φτωχή συσχέτιση με τη δραστηριότητα της νόσου και περιορίζοντας την αξία της για την παρακολούθηση στην κλινική πράξη των ασθενών αυτών. Ωστόσο, σταθεροί τίτλοι αντι-Ro και αντι-La αντισωμάτων έχουν περιγραφεί στους ορούς μητέρων που τα παιδιά τους έχουν νεογνικό λύκο, χωρίς όμως να συσχετίζονται με κλινικές εκδηλώσεις^{159,160}.

Αντι-Ro52 και αντι-La αντισώματα συνδέονται άμεσα με την παθογένεση των συνδρόμου νεογνικού λύκου. Το σύνδρομο αυτό χαρακτηρίζεται από παροδικό δερματικό εξάνθημα (φωτοευαισθησία και πολυκυκλικό δακτυλιοειδές εξάνθημα, τα οποία υποστρέφουν μετά τον 6^ο μήνα), ηπατικές και αιματολογικές διαταραχές και διαταραχές της αγωγιμότητας (πλήρης κολποκοιλιακός αποκλεισμός). Οι μητέρες των παιδιών αυτών έχουν σS, ΣΕΛ, υποξύ δερματικό λύκο ή είναι ασυμπτωματικές. Στον ορό τους όμως ανιχνεύονται αντισώματα έναντι κυρίως της πρωτεΐνης Ro52 (80%) καθώς και αντι-La αντισώματα (90%).

Το σύνδρομο οφείλεται στη μεταφορά μέσω του πλακούντα μητρικών IgG τάξης αυτοαντισωμάτων στο νεογνό από την 16^η έως την 20^η εβδομάδα της κύησης. Παθολογοανατομικά στην περιοχή του μεσοκοιλιακού διαφράγματος παρατηρούνται περιαγγειακή μονοκυτταρική διήθηση, ινική, ασβέστωση και εναπόθεση ανοσοσφαιρινών και συμπληρώματος¹⁶¹. Οι ιστικές αυτές βλάβες σχετίζονται με την

έκφραση των Ro (60 και 52 kDa) και La αντιγόνων στον νεογνικό καρδιακό ιστό και ειδικότερα στην επιφάνεια των μυοκαρδιακών κυττάρων από την 18^η έως την 24^η εβδομάδα της κύησης¹⁶²⁻¹⁶⁴.

Επιπρόσθετα, ανθρώπινη IgG ανοσοσφαιρίνη που περιέχει αντι-Ro αντισώματα, μπορεί να επάγει διαταραχές αγωγιμότητας σε καρδιές νεογνών κουνελιών^{165,166}, επιδρώντας στη λειτουργία των διαύλων ασβεστίου^{167,168}.

Πρόσφατα, δύο μελέτες από την ίδια ομάδα έδειξαν ότι η παρουσία αντι-Ro αντισωμάτων σε εγκύους ασθενείς με ΣΕΛ, δεν επηρεάζουν αρνητικά την έκβαση της εγκυμοσύνης¹⁶⁹. Ωστόσο, σε εγκύους με αυτοάνοσα νοσήματα η παρουσία αντι-Ro60 ή/και αντι-Ro52 αντισωμάτων στον ορό τους συσχετίζεται με αυτόματες αποβολές ή γέννηση θνησιγενούς τέκνου¹⁷⁰.

Έχει επίσης αναφερθεί ότι Ro και La αντιγόνα μπορούν να ανιχνευθούν στην κυτταρική μεμβράνη ως αποτέλεσμα ιικής λοίμωξης¹⁷¹, υψηλής συγκέντρωσης 17β οιστραδιόλης¹⁷² ή απόπτωση των καρδιακών μυϊκών κυττάρων^{173,174}. Αρκετές μελέτες έδειξαν ότι αντισώματα αντι-Ro βρέθηκαν σε έκπλυμα προσβεβλημένων οργάνων ασθενών με ΣΕΛ και σS. Πρώτον, στο έκπλυμα παρωτίδας ασθενούς με πρωτοπαθή χολική κίρρωση και σS βρέθηκαν αντι-Ro αντισώματα ενώ δεν ανιχνεύθηκε η παρουσία άλλων αυτοαντισωμάτων¹⁷⁵. Δεύτερον, εκχύλισμα νεφρών πλούσιο σε αντι-Ro αντισώματα βρέθηκε σε δύο ασθενείς με ΣΕΛ, οι οποίοι απεβίωσαν λόγω προϊούσας νεφρικής ανεπάρκειας¹⁷⁶. Στους ασθενείς με ΣΕΛ δεν είναι γνωστό πόσο συχνά τα αντι-Ro αντισώματα συμμετέχουν στην ανάπτυξη της νεφρίτιδας· είναι όμως γνωστό ότι σπάνια συμμετέχουν στη νεφρίτιδα χωρίς τη συνύπαρξη αντισωμάτων κατά DNA¹⁷⁷. Φαίνεται λοιπόν ότι η συνέργεια των δύο συστημάτων (αντι-Ro και αντι-DNA) συμμετέχει στην αύξηση της συχνότητας ή στη σοβαρότητα της νεφρίτιδας του λύκου στους ασθενείς εκείνους οι οποίοι έχουν και τα δύο αντισώματα. Σε τρίτη μελέτη βρέθηκαν αντι-Ro αντισώματα στο έκπλυμα καρδιάς παιδιού με πλήρη κολποκοιλιακό αποκλεισμό¹⁷⁸.



Πολλές μελέτες υποδηλώνουν τη συμμετοχή των αντι-Ro αντισωμάτων στην ανάπτυξη των δερματικών βλαβών που παρατηρούνται στον υποξύ δερματικό λύκο και στο σύνδρομο του νεογνικού λύκου.

Έτσι, σε ζωικό μοντέλο του δερματικού λύκου που αναπτύχθηκε με την μεταμόσχευση ανθρώπινου δέρματος σε ποντικό¹⁷⁹, η έγχυση στο ποντίκι ορού που περιείχε αντι-Ro αντισώματα είχε σαν αποτέλεσμα τη σύνδεση των αντισωμάτων με τα εμφυτευμένα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα. Επιπλέον, η εναπόθεση IgG αφορούσε κυρίως την επιδερμίδα και ήταν όμοια με αυτή που παρατηρείται στον υποξύ και στο νεογνικό λύκο. Μια άλλη ομάδα ερευνητών έδειξε ότι αν καλλιέργειες ανθρώπινων κερατινοκυττάρων ακτινοβοληθούν με UV ακτινοβολία, αυξάνεται η έκφραση του Ro αντιγόνου στην κυτταρική μεμβράνη, όπου μπορεί να συνδεθεί με ειδικά αυτοαντισώματα^{42,180-182}. Τέλος, άλλοι ερευνητές έδειξαν ότι τα αντι-Ro αντισώματα συμμετέχουν στην εξαρτώμενη από αντίσωμα κυτταροτοξικότητα (antibody dependent cellular cytotoxicity)¹⁸³, και ότι η έγχυσή τους στο δέρμα του guinea pig μετά την ακτινοβολήση αυξάνει σημαντικά τις μικροαγγειακού τύπου δερματικές βλάβες¹⁸⁴. Όλες οι ανωτέρω μελέτες συνηγορούν στην υπόθεση ότι τα αντι-Ro αντισώματα συμμετέχουν πιθανά στις δερματικές βλάβες στον ΣΕΛ και τα κλινικά του σύνδρομα.

Η παρουσία των αντι-Ro αντισωμάτων με ή χωρίς ταυτόχρονη παρουσία αντι-La αντισωμάτων συνδέεται με την παρουσία των HLA-DR3 ή/και DR2¹⁸⁵⁻¹⁸⁶. Πρόσφατα, ωστόσο, δεδομένα καταδεικνύουν ότι HLA αλληλία κλάσης DQ προάγουν παραγωγή αντι-Ro αντισωμάτων τόσο σε Καυκάσιους όσο και σε μαύρους ασθενείς. Ειδικότερα, σ' όλους τους αντι-Ro και αντι-La θετικούς ασθενείς, όλα τα DQα αλληλία έχουν γλουταμίνη στη θέση 34, ενώ όλα τα DQβ αλληλία έχουν λευκίνη στη θέση 26. Τα αμινοξέα αυτά συμμετέχουν στη θέση σύνδεσης του αντιγόνου στα HLA μόρια.

Στο πρωτοπαθές SΣ, αντι-Ro και αντι-La αντισώματα βρίσκονται συχνότερα σε ορούς ασθενών με πρωϊμότερη έναρξη της νόσου, μεγαλύτερη διάρκεια νόσου, διόγκωση παρωτίδων ή άλλων μεγάλων σιελογόνων αδένων και λεμφοκυτταρική διήθηση των μικρών σιελογόνων αδένων¹⁸⁷.



Επίσης, η παρουσία τους συσχετίζεται με την παρουσία εξωαδενικών εκδηλώσεων όπως, λεμφαδενοπάθεια, σπληνομεγαλία, καθώς και με την παρουσία πορφύρας, λευκοπενίας, λεμφοπενίας, αυξημένων πολυκλωνικών γάμμα-σφαιρινών και αυξημένων τίτλων ρευματοειδή παράγοντα¹⁸⁷⁻¹⁸⁹.

Τέλος, μελετήθηκε η ύπαρξη αντι-Ro και αντι-La αντισωμάτων στη σίελο ασθενών με σS, δεδομένου ότι οι σιελογόνοι αδένες αποτελούν όργανο-στόχο στη νόσο αυτή. Η παρουσία αντισωμάτων αντι-Ro και αντι-La επιβεβαιώθηκε από αρκετούς ερευνητές¹⁹⁰⁻¹⁹², ωστόσο δεν έχει ξεκαθαρισθεί ακόμη αν παράγονται τοπικά ή μεταφέρονται εκεί με το αίμα.

Οι προαναφερόμενες μελέτες δεν διακρίνουν τα αντι-Ro αντισώματα σε αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης Ro60 ή αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης Ro52. Όταν όμως κατέστη δυνατόν να διαχωρισθεί το αντιγόνο Ro52 με την ανοσοαποτύπωση, βρέθηκε ότι τόσο οι οροί των ασθενών με ΣΕΛ όσο και οι οροί των ασθενών με σS έχουν αντισώματα έναντι και των 2 πρωτεϊνών⁶⁰. Η παρουσία μόνο αντι-Ro60 αντισωμάτων είναι χαρακτηριστική στους ασθενείς με ΣΕΛ, ενώ η παρουσία μόνο αντι-Ro52 αντισωμάτων στους ασθενείς με σS. Ωστόσο, δεν βρέθηκε καμιά διαφορά στις κλινικές εκδηλώσεις ασθενών με σS και παρουσία αυτοαντισωμάτων αντι-Ro60 και αντι-Ro52, με τους ασθενείς με σS και παρουσία αντι-Ro 52 αντισωμάτων μόνο. Στο νεογνικό λύκο η αντισωματική απόκριση στρέφεται έναντι της πρωτεΐνης Ro52¹⁹³.



Ισότυποι και Παραγωγή Αντισωμάτων

Τα αντι-La αντισώματα είναι κυρίως IgG τάξης, ενώ IgA και IgM τάξης αντισώματα ανιχνεύονται σε πολύ χαμηλούς τίτλους. Επίσης, IgG τάξης αντισώματα κυρίως και σπανιότερα IgA τάξης, ανιχνεύονται στην σίελο ασθενών με ΣΣ^{194,195}. Σε ηλεκτροφόρηση ορού συνήθως ανιχνεύεται ολιγοκλωνική αντι-La αντίδραση κυρίως IgG1 υποτάξης¹⁹⁶, έχουν ωστόσο περιγραφεί και άλλες IgG υποτάξεις¹⁹⁷.

Τα αντι-Ro αντισώματα είναι πολυκλωνικά IgG τάξης αντισώματα¹⁹⁸ και δεν έχουν περιγραφεί ως τώρα IgA ή IgM τάξης αντι-Ro αντισώματα.

Η πολυκλωνική αυτή έκφραση επάγεται και μετά ανοσοποίηση ποντικού με ανασυνδυασμένη La πρωτεΐνη, η οποία οδηγεί στην παραγωγή τόσο αυτοαντισωμάτων έναντι διαφορετικών μη επαναλαμβανόμενων περιοχών της La πρωτεΐνης (intramolecular spreading: ενδομοριακή διασπορά επιτόπων), όσο και ειδικών αντι-Ro60 αυτοαντισωμάτων (intermolecular spreading: διαμοριακή διασπορά επιτόπων). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η παραγωγή αυτοαντισωμάτων έναντι πολλαπλών επιτόπων των Ro και La πρωτεϊνών μπορεί να είναι επακόλουθο αντίδρασης σε ένα μόνο επίτοπο, γεγονός που εξηγεί την παρουσία πολλαπλών αυτοαντισωμάτων σε διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα¹⁹⁹. Η ανοσοδιέγερση από Ro και



La πεπτίδια μπορεί να εκλυθεί μετά από UV ακτινοβολήση^{181,182} ή λοίμωξη από ιό¹⁷¹ καθώς επίσης και κατά τη διάρκεια της απόπτωσης²⁰⁰.

Τέλος, η παρουσία αντι-Ro και αντι-La αντισωμάτων τάξης κυρίως IgA, στη σίελο ασθενών με SS, υποδηλώνει τον πιθανό παθογενετικό τους ρόλο στο σύνδρομο ξηροστομίας-ξηροφθαλμίας (sicca syndrome).



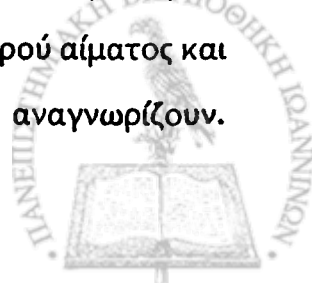
Μέθοδοι Ανίχνευσης των αντι-Ro και αντι-La Αντισωμάτων

Η ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός των αυτοαντισωμάτων παρουσιάζει ορισμένες δυσκολίες, οι οποίες όμως ξεπεράστηκαν με την ανάπτυξη και εφαρμογή μοντέρνων ανοσολογικών μεθόδων. Οι μέθοδοι ανίχνευσης των αντι-Ro και αντι-La αντισωμάτων είναι οι παρακάτω:

1. Ανοσοφθορισμός (Immunofluorescence)

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός ήταν η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στην καθ' ημέρα πράξη για ανίχνευση αντισωμάτων με ποικίλα ιστικά αντιγόνα²⁰¹. Ακόμη και σήμερα, όταν υποψιαζόμαστε την ύπαρξη αυτοάνοσου συστηματικού νοσήματος, η προσπάθεια ανίχνευσης αντισωμάτων ξεκινά χρησιμοποιώντας τον ανοσοφθορισμό σαν αρχική εξέταση διερεύνησης (screening test). Στην εξέταση αυτή αναζητούνται αντισώματα τα οποία συνδέονται με πυρηνικά αντιγόνα των κυττάρων του υποστρώματος και γι' αυτό ονομάζονται αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA, antinuclear antibodies).

Η τεχνική της εξέτασης είναι απλή. Επιστρωμένα κύτταρα, συνήθως μιας κυτταρικής σειράς, επωάζονται με το υπό εξέταση αραιωμένο δείγμα ορού αίματος και έτσι τα αντιπυρηνικά αντισώματα θα συνδεθούν με τα αντιγόνα που αναγνωρίζουν.



Αφού ξεπλυθεί η περίσσεια του ορού, το υπόστρωμα επωάζεται με αντι-ανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη, συνδεδεμένη με φθοριόχρωμα. Η περίσσεια της συζευγμένης ανοσοσφαιρίνης ξεπλένεται και το υπόστρωμα εξετάζεται στο μικροσκόπιο φθορισμού. Επί θετικού αποτελέσματος γίνεται τιτλοποίηση (διαδοχικές υποδιπλάσιες αραιώσεις του εξεταζόμενου ορού μέχρι την τελευταία θετική) ενώ παράλληλα καταγράφονται όλοι οι τύποι του φθορισμού που παρατηρήθηκαν. Ο τύπος του ανοσοφθορισμού (π.χ. ομοιογενής ή στικτός) μπορεί να μας δώσει πληροφορίες για την ειδικότητα των αντισωμάτων που ανιχνεύονται, ωστόσο όμως το ακριβές αντιγόνο-στόχος δεν μπορεί να καθορισθεί. Επί θετικού λοιπόν αποτελέσματος απαιτείται μια πιο ενδελεχής μελέτη με άλλες τεχνικές. Επί αρνητικού αποτελέσματος, ο περαιτέρω ανοσολογικός έλεγχος κρίνεται περιττός²⁰², εκτός αν υπάρχουν ιδιαίτεροι λόγοι όπως στον υποξύ δερματικό λύκο και στην δερματομυοσίτιδα²⁰³.

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κυτταρικές σειρές δεν είναι η καλύτερη μέθοδος για την ανίχνευση των αντι-Ro και αντι-La αντισωμάτων. Αυτό οφείλεται αφενός μεν στην χαμηλή συγκέντρωση του Ro αντιγόνου στους πυρήνες των κυττάρων, αφετέρου σε προβλήματα στη διαδικασία επίστρωσης²⁰⁴. Έτσι, αντι-Ro θετικοί οροί, στον έμμεσο ανοσοφθορισμό μπορεί να είναι αρνητικοί ή να μας δώσουν πυρηνικά στίγματα διαφόρων μεγεθών μαζί με φθορισμό του κυτταροπλάσματος.

Πρόσφατα, η χρησιμοποίηση ως υπόστρωμα, κυττάρων Hep 2000 σειράς (transfected με ανθρώπινη Ro60) βρέθηκε να έχει καλύτερη ευαισθησία 71-91%^{205,206}. Πάντως, η μέθοδος αυτή δεν μπορεί να ανιχνεύσει μεμονωμένα αντι-Ro 52 αντισώματα.

Συμπερασματικά, ο έμμεσος ανοσοφθορισμός αποτελεί μια απλή, ευαίσθητη αλλά μη ειδική, αρχική εξέταση ρουτίνας για κάθε ασθενή, με υπόνοια αυτοάνοσου νοσήματος.

2. Διπλή ανοσοδιάχυση (Double immunodiffusion)

Η μέθοδος της διπλής ανοσοδιάχυσης επέτρεψε τον καθορισμό της ειδικότητας των αντιπυρηνικών αντισωμάτων. Το 1961, οι Anderson και συν²,



χρησιμοποιώντας εκχύλισμα ανθρώπινου θυρεοειδούς, βρήκαν ότι οροί ασθενών με σ5 διαχεόμενοι σε γέλη αγαρόζης έναντι του προαναφερόμενου εκχυλίσματος έδιναν δύο ιζηματικές γραμμές που ήταν διαφορετικές μεταξύ τους (τεμνόμενες γραμμές). Το εύρημα αυτό υποδήλωνε ότι τα εκχυλίσματα ιστών περιέχουν περισσότερα από ένα αντιγόνα και ότι οι οροί ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν εργαλεία ("probes") για την ανίχνευση και περαιτέρω μελέτη των εκχυλιζόμενων από ιστούς αντιγόνων.

Η διπλή ανοσοδιάχυση συνίσταται σε σύγκριση της ιζηματικής γραμμής που παράγει ο προς εξέταση ορός, με την ιζηματική γραμμή που παράγει ορός γνωστής ειδικότητας όταν και οι δύο διαχέονται σε γέλη αγαρόζης, στην οποία επίσης διαχέεται αντιγόνο. Οι οροί τοποθετούνται σε διπλανά φρεάτια με διάταξη κυκλωτερή και η πηγή αντιγόνου σε ένα κεντρικό φρεάτιο που βρίσκεται σε ίση απόσταση από τα φρεάτια των ορών. Στις περιοχές αρίστης συγκεντρώσεως αντιγόνου-αντισώματος, δημιουργούνται καθιζάνοντα ανοσοσυμπλέγματα, που εμφανίζονται ως ιζηματικές γραμμές μεταξύ των φρεατίων των ορών και του φρεατίου του αντιγόνου. Όταν οι ιζηματικές γραμμές μεταξύ του υπό εξέταση ορού και του αντιγόνου και του ορού-μάρτυρα και του αντιγόνου αποτελούν μια συνεχή γραμμή, τότε τα αντισώματα των ορών αναγνωρίζουν το αυτό αντιγόνο στην πηγή αντιγόνου. Όταν αυτές οι γραμμές τέμνονται, αυτό σημαίνει ότι οι οροί έχουν αντισώματα διαφορετικής ειδικότητας, δηλαδή αναγνωρίζουν διαφορετικά αντιγόνα που βρίσκονται στην πηγή (εκχύλισμα) των αντιγόνων. Τέλος, οι δύο γραμμές είναι δυνατόν να τέμνονται μερικώς (εν είδει σπιρουνιού) πράγμα που υποδηλώνει μερική ομοιότητα των ιδιοτύπων των αντισωμάτων. Στην περίπτωση αυτή τα αντισώματα αναγνωρίζουν είτε διαφορετικά αντιγόνα μετακινούμενα εν μέρει σαν σύμπλεγμα και εν μέρει ελεύθερα, είτε διαφορετικούς αντιγονικούς καθοριστές που βρίσκονται πάνω στο ίδιο μεγαλομόριο.

Έτσι, με την τεχνική της διπλής ανοσοδιάχυσης περιγράφηκε για πρώτη φορά η ειδικότητα των αντι-Ro και αντι-La αντισωμάτων^{3,5,10}.



3. Αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση (Counterimmunoelectrophoresis)

Η αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση (CIE: counterimmunoelectrophoresis) είναι μια μορφή διπλής ανοσοδιάχυσης, όπου χρησιμοποιείται ηλεκτρικό πεδίο για το σχηματισμό ιζηματικών γραμμών αντιγόνου-αντισώματος. Στη μέθοδο αυτή ο ορός τοποθετείται στην άνοδο και η πηγή στην κάθοδο. Έτσι, τα ηλεκτροαρνητικά φορτισμένα αντιγόνα οδεύουν προς την πλευρά των ανοσοσφαιρινών με συνέπεια να ενισχύεται το αποτέλεσμα της ανοσοδιάχυσης. Η ευαισθησία της μεθόδου καθορίζεται από την πηγή του αντιγόνου που θα χρησιμοποιήσουμε, ενώ η ειδικότητά της καθορίζεται από την επιλογή του ορού αναφοράς (ορός γνωστής ειδικότητας). Έτσι, για την ανίχνευση αντι-Ro αντισωμάτων είναι γνωστό ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή αντιγόνου εκχύλισμα σπληνός ανθρώπου ή βοός, και όχι εκχύλισμα θύμου αδένα κουνελιού που χρησιμοποιείται όμως για την ανίχνευση των υπολοίπων αντισωμάτων (π.χ., αντι-La, αντι-Sm, κλπ). Ορισμένοι μάλιστα ερευνητές έδειξαν ότι εκχυλίσματα ανθρώπινων κυτταρικών σειρών υπερέχουν όσον αφορά την ανίχνευση των αντι-Ro αντισωμάτων. Επίσης, άλλοι ερευνητές έδειξαν ότι η αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση έχει χαμηλή ευαισθησία για την ανίχνευση αντι-La αντισωμάτων με τη χρησιμοποίηση εκχυλίσματος θύμου αδένα κουνελιού αν και αντιγόνο La βρίσκεται στο εκχύλισμα αυτό¹¹³. Η αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση είναι πιο ταχεία μέθοδος απ' την ανοσοδιάχυση και μπορεί να ανιχνεύσει ακόμη και αντισώματα που βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση, δεκαπλασιάζοντας μάλιστα την ευαισθησία της απλής ανοσοδιάχυσης²⁰⁷. Αν και δεν επιτρέπει τον καθορισμό της αντι-Ro αντίδρασης (αντι-Ro 52 ή/και αντι-Ro 60), θεωρείται η πιο αξιόπιστη μέθοδος ως εξέταση ρουτίνας²⁰⁸.

4. Ανοσοαποτύπωση (Immunoblotting)

Η ανοσοαποτύπωση αποτελεί μια πιο σύνθετη μέθοδο ανίχνευσης των αυτοαντισωμάτων. Αρχικά, το εκχύλισμα αντιγόνων επωάζεται με δωδεκυλθειϊκό νάτριο (SDS) με αποτέλεσμα το φορτίο τους να καθίσταται αρνητικό. Ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμιδίου όπου η ταχύτητα μετακίνησης των επιμέρους πεπτιδίων είναι συνάρτηση του μεγέθους τους. Η μέθοδος ονομάστηκε

"ηλεκτροφόρηση-SDS-γέλης πολυακρυλαμιδίου". Στη συνέχεια γίνεται ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών σε χαρτί νιτροκυτταρίνης²⁰⁹ (Western blotting). Μετά τη μεταφορά τους στο χαρτί νιτροκυτταρίνης, τα αντιγόνα επωάζονται με τους υπό εξέταση ορούς και αν υπάρχουν ειδικά αντισώματα, αυτά προσκολλώνται στα τμήματα της ταινίας που μεταφέρουν αντιγονικά πεπτίδια. Στη συνέχεια τα αντισώματα αυτά επωάζονται με αντι-ανθρώπινες ανοσοσφαιρίνες σεσημασμένες με ένζυμο και με την προσθήκη του κατάλληλου για το ένζυμο υποστρώματος, οι ζώνες που αντιστοιχούν σε πεπτιδικά αντιγόνα και αναγνωρίστηκαν από ειδικό αντίσωμα θα απεικονισθούν με χρωμογόνο ανάδραση. Αντισώματα που στη διπλή ανοσοδιάχυση εκφράζονται σαν να έχουν την αυτή ειδικότητα, είναι δυνατόν να καταδειχθεί με ανοσοαποτύπωση ότι αναγνωρίζουν διαφορετικά πεπτίδια του αυτού αντιγόνου.

Έτσι, οι Habets και συν²¹⁰ εξετάζοντας ορούς με ειδικότητα κατά hRNP διαπίστωσαν ότι άλλοι απ' αυτούς αναγνώριζαν ένα πεπτίδιο MB 70 kDa του RNP αντιγόνου και άλλοι ένα πεπτίδιο MB 23 kDa του ίδιου αντιγόνου. Επίσης, η πρωτεΐνη Ro52, η οποία περιγράφηκε ως ένα αντιγονικό πεπτίδιο της πρωτεΐνης Ro⁵¹, δεν κατέστη αρχικά δυνατόν να διαχωρισθεί από την πρωτεΐνη La, η οποία με MB 48 kDa κινείται κατά την ηλεκτροφόρηση στην ίδια περιοχή με την πρωτεΐνη Ro MB 52 kDa. Αργότερα όμως, βρέθηκε ότι αλλάζοντας την σχέση ακρυλαμιδίου-διακρυλαμιδίου στη γέλη πολυακρυλαμιδίου είναι δυνατόν ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών⁶⁸. Έτσι, βρέθηκε ότι οροί με αντι-Ro αντισώματα αναγνώριζαν την πρωτεΐνη Ro60 ή/και την πρωτεΐνη Ro52.

Αν και η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ερευνητικά, η χρήση της στην καθ' ημέρα πράξη παρουσιάζει μειονεκτήματα²¹¹. Πάνω από το 40% των αντι-Ro αντισωμάτων που ανιχνεύονται με την τεχνική της αντίθετης ανοσοηλεκτροφόρησης, δεν ανιχνεύονται με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης. Αυτό πιθανά οφείλεται στο γεγονός ότι το αντιγόνο, λόγω της επώασής του με το SDS, μετουσιώνεται (denaturated) αλλάζοντας έτσι την τριτοταγή δομή του· έχει δειχθεί ότι το μεγαλύτερο μέρος των αντι-Ro(SSA) αντισωμάτων αναγνωρίζει το φυσικό αντιγόνο Ro^{212,213}.



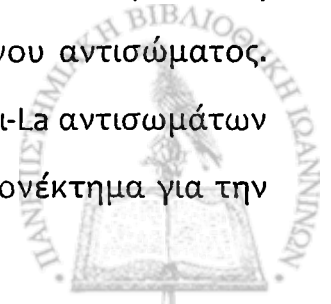
Έτσι, μετά τον αρχικό ενθουσιασμό αναφορικά με τις πιθανές εφαρμογές της ανοσοαποτύπωσης στη διάγνωση των αυτοάνοσων νοσημάτων είναι πλέον εμφανές ότι μια από τις λιγοστές, γενικά παραδεκτές, εφαρμογές της είναι η ανίχνευση των αντι-La αντισωμάτων, όπου η ευαισθησία της υπερέρχει έναντι της αντίθετης ανοσοηλεκτροφόρησης¹¹³.

5. Ενζυμικός Ανοσοπροσροφητικός Προσδιορισμός (ELISA)

Αρκετοί έως τώρα ερευνητές χρησιμοποίησαν τη μέθοδο ELISA για την ανίχνευση των αντι-Ro και αντι-La αντισωμάτων²¹⁴⁻²¹⁷. Στις περισσότερες από αυτές τις μελέτες χρησιμοποιήθηκαν σαν αντιγόνα πρωτεΐνες που απομονώθηκαν με χρωματογραφία συγγένειας, πράγμα όμως που προϋποθέτει ότι το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του αντιγόνου είναι μονοειδικό. Αλλιώς, ο κίνδυνος για λήψη ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων μεγιστοποιείται. Ως αντιγόνα έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί εκτός από ολόκληρη την πρωτεΐνη, συνθετικά πεπτίδια ή ανασυνδυασμένα πεπτίδια. Η μέθοδος συνίσταται στην επώαση του υπό εξέταση δείγματος ορού αίματος με αντιγόνο που είναι προσκολλημένο στη βάση φρεατίων από πολυστυρένιο, στην εν συνεχεία επώαση του συμπλέγματος αντιγόνου-αντισώματος με αντιορό σεσημασμένο με ένζυμο και τέλος στην πρόσθεση ειδικού υποστρώματος για την αντίδραση του ενζύμου. Η ενζυμική αντίδραση, αποτελεί το μέτρο της ποσότητας ειδικού αντισώματος κατά του αντιγόνου και μετρείται με τιμή απορρόφησης ακτινοβολίας ορισμένου μήκους κύματος.

Πιο έξυπνη όμως είναι η εφαρμογή ELISA-τύπου "sandwich" στην οποία στα φρεάτια προσκολλάται κυρίως το $F(ab)_2$ τμήμα του αντισώματος και στη συνέχεια ακολουθεί επώαση με το εκχύλισμα αντιγόνων· στην περίπτωση αυτή το προσκολλημένο αντίσωμα θα συνδεθεί με το αντίστοιχο αντιγόνο²¹³.

Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου ELISA εκτός από το ότι είναι μια απλή μέθοδος, είναι και η δυνατότητα ποσοτικοποίησης του ανιχνευμένου αντισώματος. Ωστόσο, η χρησιμοποίησή της για την ανίχνευση των αντι-Ro και αντι-La αντισωμάτων στην καθ' ημέρα πράξη δεν έχει ακόμη επιτευχθεί. Ένα βασικό μειονέκτημα για την



ανάπτυξή της αποτελεί η έλλειψη αξιόπιστων μονοκλωνικών αντισωμάτων, κυρίως έναντι της πρωτεΐνης Ro. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να χρησιμοποιούμε $F(ab)_2$ τμήματα πολυκλωνικών ανοσοσφαιρινών ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα ή ανοσοποιημένων κουνελιών. Έχει όμως περιγραφεί ότι ένας σημαντικός αριθμός ορών με αντι-Ro αντισώματα έχει ρευματοειδή παράγοντα, ο οποίος μπορεί να συνδεθεί με Fc τμήματα που δεν απομακρύνθηκαν κατά την απομόνωση των $F(ab)_2$ τμημάτων²¹⁸. Επίσης, μια άλλη ομάδα ερευνητών έδειξε ότι μερικά αντι-Ro αντισώματα συνδέονται με IgG²¹⁹. Και στις περιπτώσεις όμως που χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγόνα συνθετικά ή ανασυνδυασμένα πεπτίδια, τα αποτελέσματα ήταν επίσης φτωχά, πιθανόν γιατί αυτά στερούνται της τριτοταγούς διαμόρφωσής τους, γεγονός που φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ανίχνευση των αντι-Ro αντισωμάτων.

6. Ανοσοκατακρήμνιση RNA (RNA precipitation)

Η ανοσοκατακρήμνιση RNA είναι σήμερα η περισσότερη αποδεκτή μέθοδος για την ανίχνευση των αντισωμάτων αντι-Ro και αντι-La. Με τη μέθοδο αυτή η ανίχνευση των αυτοαντισωμάτων επιτυγχάνεται, αναλύοντας τα μικρά μόρια RNA των ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων Ro και La που ανοσοκαθιζάνουν με αυτοαντισώματα γνωστής ειδικότητας, όταν αυτά προστίθενται σε κυτταρικά εκχυλίσματα ραδιοσημασμένα *in vivo* με ^{32}P ²²⁰. Στη συνέχεια διαχωρίζεται το RNA από την πρωτεΐνη και τα δύο συστατικά μελετώνται χωριστά.

Για το σκοπό αυτό κύτταρα, συχνά HeLa, σημαίνονται βιοσυνθετικά με ^{32}P -ορθοφωσφορικό οξύ που ενσωματώνεται στην αλυσίδα φωσφορικών του RNA. Τα κύτταρα ομογενοποιούνται και εκχυλίζονται σε φωσφορούχα ρυθμιστικά διαλύματα με 130 mM NaCl και ανθρώπινος ορός γνωστής ειδικότητας προστίθεται στο διάλυμα. Τα σχηματιζόμενα συμπλέγματα προσροφώνται σε στήλη πρωτεΐνης Α/σεφαρόζης και στη συνέχεια εκκλύονται με 0.1 M γλυκίνης pH=3,2. Τα ανοσοσυμπλέγματα εκχυλίζονται με φαινόλη που καταστρέφει και απομακρύνει την πρωτεΐνη, ενώ αφήνει άθικτα τα μόρια RNA, τα οποία στη συνέχεια ηλεκτροφορούνται σε γέλη 10% άκρυλαμιδίου/7M ουρίας και διαχωρίζονται. Για την εξέταση των πρωτεϊνών, τα

κύτταρα ραδιοσημαίνονται με ^{35}S -μεθειονίνη και όπως παραπάνω μετά την επώαση των πυρηνικών θραυσμάτων με ορό καθαρίζονται τα ανοσοσυμπλέγματα. Οι πρωτεΐνες συμπυκνώνονται με καθίζηση σε ακετόνη και διαχωρίζονται σε γέλη 15% πολυακρυλαμίδιου παρουσία SDS.

Τα αντι-Ro αντισώματα ανοσοκατακρημνίζουν μικρά hYRNA, ενώ τα αντι-La αντισώματα ανοσοκατακρημνίζουν πολλά μικρά RNAs, όπως pre-tRNA, 5SRNA, 4.5SRNA, VA-RNA, όλα προϊόντα της RNA πολυμεράσης III και τα hY(Ro)RNAs.

Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα αφού η ανίχνευση των αυτοαντισωμάτων στηρίζεται στη σύνδεσή τους με τα "φυσιολογικά" (native) ανθρώπινα αντιγόνα. Η μέθοδος είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα ενώ άλλα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι η χρησιμοποίηση ραδιενέργειας, η εξάρτηση από *in vitro* καλλιέργεια κυτταρικών σειρών, συχνά για μεγάλο χρονικό διάστημα και τέλος, η απαιτούμενη εμπειρία που πρέπει να έχει κανείς για να ελαχιστοποιήσει προβλήματα όπως η υψηλή μη ειδική αντίδραση (background) όταν δεν πλυθεί καλά το ίζημα. Έτσι, η μέθοδος αυτή δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εξέταση ρουτίνας, είναι όμως πολύ χρήσιμη ως μέθοδος αναφοράς και επιβεβαίωσης²²¹.



Σκοπός της Μελέτης

Τα αντισώματα έναντι των κυτταρικών αντιγόνων Ro και La αποτελούν ένα ζεύγος ξεχωριστών αλλά άμεσα συσχετιζόμενων αυτοαντισωμάτων έναντι ριβονουκλεοπρωτεϊνών (RNP), που ανιχνεύονται κυρίως στον ορό ασθενών με πρωτοπαθές σύνδρομο Sjogren (1^ο σS) και συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (ΣΕΛ)^{203,222}. Χρησιμοποιώντας μεθόδους ανοσοκαθίζησης σε πηκτή, αντι-Ro και αντι-La αντισώματα βρέθηκαν σε ποσοστό 60% και 40% αντίστοιχα στο 1^ο σS, 35% και 15% αντίστοιχα στον ΣΕΛ και σε μικρότερο ποσοστό και σε διάφορα άλλα αυτοάνοσα νοσήματα^{187,203,223,224}. Ο παθογενετικός ρόλος των αυτοαντισωμάτων αυτών παραμένει ασαφής αν και έχουν περιγραφεί συσχετίσεις με διάφορες κλινικές εκδηλώσεις^{123,187,203,224,225}.

Στον άνθρωπο έχει δειχθεί ότι τα Ro RNP σύμπλοκα αποτελούνται από τουλάχιστον 4 αντιγονικά διάκριτα πολυπεπτίδια συνδεδεμένα με ένα εκ των τεσσάρων μικρών Ro-RNAs (hY1-hY5)¹⁶. Το La RNP σύμπλοκο αποτελείται από μια καλά διατηρημένη αντιγονική πυρηνική πρωτεΐνη 48 kDa, η οποία συνδέεται με διάφορα μικρά RNAs συμπεριλαμβανομένων των προϊόντων μεταγραφής του RNA πολυμεράσης III¹⁶.



Διάφορες μέθοδοι ανίχνευσης αντισωμάτων κατά των πρωτεϊνών Ro και La έχουν χρησιμοποιηθεί ως σήμερα. Οι μέθοδοι ανοσοκαθίζησης σε πηκτή όπως η διπλή ανοσοδιάχυση και η αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση, χρησιμοποιούνται ευρέως και χαρακτηρίζονται από σημαντική ακρίβεια¹¹³. Η ποσοτική ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA) με κεκαθαρμένο ή ανασυνδυασμένο αντιγόνο, χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο, λόγω απλότητας και μεγάλης ευαισθησίας. Η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης είναι η μέση μέθοδος για τη μελέτη της "λεπτής" αντιγονικής ειδικότητας των αντισωμάτων²²⁶. Τέλος, η ανοσοκατακρήμνιση RNA, που βασίζεται στην ανίχνευση ραδιοσημασμένων RNA που καθιζάνουν με αντι-RNP αντισώματα, φαίνεται να είναι η πιό ευαίσθητη και ειδική μέθοδος ανίχνευσης²²⁷.

Μελέτες ορών ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα (ΡΑ) με τη μέθοδο της αντίθετης ανοσοηλεκτροφόρησης, έχουν δείξει χαμηλή παρουσία αντι-Ro αντισωμάτων (2-19%) και σπανίως ύπαρξη αντι-La αντισωμάτων^{187,223,225, 228-230}.

Σκοπός της μελέτης ήταν πρωταρχικά οι πέντε διαθέσιμες μέθοδοι, (αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση, ανοσοκατακρήμνιση RNA, ELISA και δύο μέθοδοι ανοσοαποτύπωσης με εκχύλισμα εμπύρηνων κυττάρων HeLa και ερυθροκυττάρων) να εκτιμηθούν παράλληλα για την ανίχνευση αντι-Ro αντισωμάτων.

Σκοπός επίσης ήταν, χρησιμοποιώντας τέσσερις διαφορετικές μεθόδους ανίχνευσης (αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση, ανοσοκατακρήμνιση RNA, ανοσοενζυμική μέθοδο και ανοσοαποτύπωση) και διάφορα κυτταρικά εκχυλίσματα, να υποδείξουμε την ύπαρξη ανθρωποειδικών αντι-La αντισωμάτων σε επιλεγμένους ορούς ασθενών με ΡΑ, δεδομένου ότι, σε προκαταρκτικά πειράματα χρησιμοποιώντας την ανοσοκατακρήμνιση RNA με εκχυλίσματα ανθρώπινων κυττάρων, βρήκαμε ότι αρκετοί οροί ασθενών με ΡΑ, μονοειδικοί για αντι-Ro αντισώματα στην αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση με εκχύλισμα θύμου μοσχαριού, έχουν και αντι-La αντισώματα.



ΑΡΧΙΒΟΤΗΣΗ 1555201

ΑΤΕΝΕΙΑ

ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΣΤΟΛΗ ΤΟΥ ΚΑΙΣΑΡΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΑΙΣΑΡΙΣΣΑΣ

ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΝ ΤΟΝ ΚΑΙΣΑΡΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΑΙΣΑΡΙΣΣΑΝ

ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΝ ΤΟΝ ΚΑΙΣΑΡΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΑΙΣΑΡΙΣΣΑΝ

Ειδικό Μέρος

ΕΙΣ ΤΗΝ ΕΠΙΣΤΟΛΗΝ ΤΟΥ ΚΑΙΣΑΡΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΑΙΣΑΡΙΣΣΑΣ

ΕΙΣ ΤΗΝ ΕΠΙΣΤΟΛΗΝ ΤΟΥ ΚΑΙΣΑΡΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΑΙΣΑΡΙΣΣΑΣ

ΕΙΣ ΤΗΝ ΕΠΙΣΤΟΛΗΝ ΤΟΥ ΚΑΙΣΑΡΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΑΙΣΑΡΙΣΣΑΣ

ΕΙΣ ΤΗΝ ΕΠΙΣΤΟΛΗΝ ΤΟΥ ΚΑΙΣΑΡΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΑΙΣΑΡΙΣΣΑΣ

ΕΙΣ ΤΗΝ ΕΠΙΣΤΟΛΗΝ ΤΟΥ ΚΑΙΣΑΡΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΑΙΣΑΡΙΣΣΑΣ

ΕΙΣ ΤΗΝ ΕΠΙΣΤΟΛΗΝ ΤΟΥ ΚΑΙΣΑΡΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΑΙΣΑΡΙΣΣΑΣ

ΕΙΣ ΤΗΝ ΕΠΙΣΤΟΛΗΝ ΤΟΥ ΚΑΙΣΑΡΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΑΙΣΑΡΙΣΣΑΣ

ΕΙΣ ΤΗΝ ΕΠΙΣΤΟΛΗΝ ΤΟΥ ΚΑΙΣΑΡΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΑΙΣΑΡΙΣΣΑΣ

ΕΙΣ ΤΗΝ ΕΠΙΣΤΟΛΗΝ ΤΟΥ ΚΑΙΣΑΡΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΑΙΣΑΡΙΣΣΑΣ

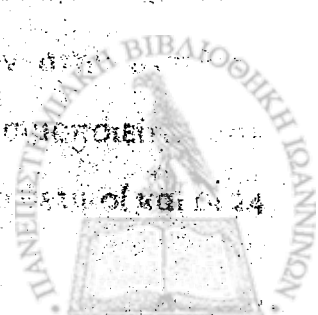
ΕΙΣ ΤΗΝ ΕΠΙΣΤΟΛΗΝ ΤΟΥ ΚΑΙΣΑΡΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΑΙΣΑΡΙΣΣΑΣ

ΕΙΣ ΤΗΝ ΕΠΙΣΤΟΛΗΝ ΤΟΥ ΚΑΙΣΑΡΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΑΙΣΑΡΙΣΣΑΣ

ΕΙΣ ΤΗΝ ΕΠΙΣΤΟΛΗΝ ΤΟΥ ΚΑΙΣΑΡΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΑΙΣΑΡΙΣΣΑΣ

ΕΙΣ ΤΗΝ ΕΠΙΣΤΟΛΗΝ ΤΟΥ ΚΑΙΣΑΡΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΑΙΣΑΡΙΣΣΑΣ

ΕΙΣ ΤΗΝ ΕΠΙΣΤΟΛΗΝ ΤΟΥ ΚΑΙΣΑΡΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΑΙΣΑΡΙΣΣΑΣ

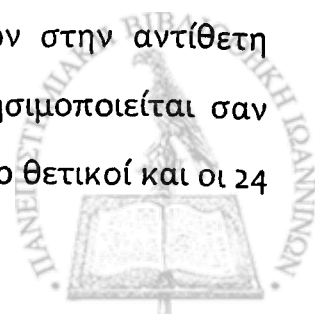


Υλικό και Μέθοδοι

ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Για την πρώτη μελέτη επιλέχθηκαν δείγματα ορών 93 ασθενών με αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα. Η επιλογή έγινε με βάση τα αποτελέσματα της αντίθετης ανοσοηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιείται στο εργαστήριό μας στην καθ' ημέρα πράξη για την ανίχνευση αντι-Ro αντισωμάτων (47 αντι-Ro θετικοί και 46 αντι-Ro αρνητικοί οροί). Στους ασθενείς, που παρακολουθούνται στο εξωτερικό ρευματολογικό ιατρείο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, περιλαμβάνονταν 28 ασθενείς με 1^ο σ5 (28 γυναίκες: μέση ηλικία 51.7 έτη, μέση διάρκεια νόσου 7.1 έτη), 26 με ΣΕΛ (22 γυναίκες και 4 άνδρες: μέση ηλικία 31.4 έτη, μέση διάρκεια νόσου 5.7 έτη) και 39 με ΡΑ (32 γυναίκες και 7 άνδρες: μέση ηλικία 54.8 έτη, μέση διάρκεια νόσου 6.1 έτη). Όλες οι διαγνώσεις στηρίχθηκαν σε προηγούμενα δημοσιευμένα κριτήρια^{190,231,232}. Στη μελέτη περιελήφθησαν επίσης 25 δείγματα ορών υγιών μαρτύρων.

Για τη δεύτερη μελέτη επιλέχθηκαν δείγματα ορών 39 ασθενών με ΡΑ²³². Η επιλογή έγινε με βάση την ύπαρξη ή μή αντι-Ro αντισωμάτων στην αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση με εκχυλίσματα θύμου μοσχαριού που χρησιμοποιείται σαν εξέταση ρουτίνας στο εργαστήριό μας. Οι 15 από αυτούς ήταν αντι-Ro θετικοί και οι 24



ήταν αντι-Ro αρνητικοί. Στους ασθενείς αυτούς, που παρακολουθούνται στο εξωτερικό Ρευματολογικό Ιατρείο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, περιλαμβάνονταν 32 γυναίκες και 7 άνδρες, με μέσο όρο ηλικίας 54.8 έτη και μέση διάρκεια νόσου 6.1 χρόνια. Επίσης, 57 δείγματα ορών ασθενών με 1^ο σS και ΣΕΛ (επιλεγμένα με βάση τα αποτελέσματα της ανοσοκατακρήμνισης RNA) και 25 δείγματα ορών υγιών μαρτύρων περιελήφθησαν στη μελέτη.

Όλοι οι οροί κωδικοποιήθηκαν και συντηρήθηκαν στους -30° C μέχρι τη χρησιμοποίησή τους. Οι πρότυποι αντιοροί προσφέρθηκαν ευγενικά από το Κέντρο Ελέγχου Νόσων (Center for Disease Control, Atlanta, Georgia, USA).

ΜΕΘΟΔΟΙ

Αντίθετη Ανοσοηλεκτροφόρηση (CIE)

Αντισώματα έναντι των εκχυλισμένων κυτταρικών αντιγόνων Ro και La ανιχνεύθηκαν όπως περιγράφηκε από τους Bunh και συν²³³. Για το σκοπό αυτό ως πηγή αντιγόνου χρησιμοποιήθηκαν αδρά εκχυλίσματα θύμου μοσχαριού (50 mg/ml), θύμου κουνελιού (70 mg/ml) καθώς και εκχύλισμα καλλιέργειας κυττάρων HeLa-S3 (αντιστοιχεί σε 10⁸ κύτταρα/ml). Οι ιζηματικές γραμμές που σχηματίσθηκαν βάφτηκαν με την χρωστική Comassie Brilliant Blue R. Η ειδικότητα των αυτοαντισωμάτων καθορίστηκε με τη σύγκρισή τους με ορούς αναφοράς που είχαν αντι-Ro, αντι-La, αντι-Sm ή αντι-U1nRNP αντισώματα αντίστοιχα.

Ανοσοκατακρήμνιση RNA

Χρησιμοποιήθηκαν ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα ραδιοσημασμένων με ³²P κυττάρων HeLa, όπως περιγράφηκε από τους Craft και συν²³⁴. Οι αντιδράσεις ανοσοκατακρήμνισης έγιναν όπως περιγράφηκε από τους Pettersson και συν²³⁵. Τα RNA των RNP συμπλόκων εκχυλίσθηκαν με φαινόλη και αναλύθηκαν σε πηκτές 10% πολυακρυλαμίδιου-7M ουρίας. Οι ταινίες εμφανίσθηκαν με αυτοραδιογραφία με



ακτίνες Χ. Σε κάθε πείραμα για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν οροί αναφοράς, δηλαδή οροί γνωστής ειδικότητας για αντι-Ro, αντι-La αλλά και για αντι-Sm και αντι-U1-nRNP αντισώματα.

Μέθοδος Ενζυμικού Ανοσοπροσροφητικού Προσδιορισμού (ELISA)

Η παρουσία αλλά και τα επίπεδα των αντισωμάτων αντι-Ro και αντι-La καθορίστηκαν με εμπορικά διαθέσιμες ELISA, IgG ισotyπου (Diastat anti-Ro και Diastat anti-La, Shield Diagnostics αντίστοιχα) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα φρεάτια των πλακιδίων είχαν επιστρωθεί με αντιγόνα Ro και La κεκαθαρμένα με χρωματογραφία συγγένειας. Σε κάθε πείραμα η ποσοτική μέτρηση των αντισωμάτων στους υπο εξέταση ορούς (σε μονάδες/ml) υπολογίσθηκε με βάση μια πρότυπη καμπύλη αναφοράς που σχηματίσθηκε από ορούς γνωστής συγκέντρωσης για αντι-Ro και αντι-La αντισώματα. Δείγματα ορών με τιμές μεγαλύτερες από 2 μονάδες/ml θεωρήθηκαν θετικά.

Ανοσοαποτύπωση

Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκαν ξεχωριστά ως πηγή αντιγόνου ολικό εκχύλισμα κυττάρων HeLa²³⁶, εκχύλισμα θύμου μοσχαριού, εκχύλισμα θύμου κουνελιού και εκχύλισμα ερυθροκυττάρων που παρασκευάσθηκε από ολικό αίμα. Συγκεκριμένα, εκχύλισμα 6×10^7 κυττάρων HeLa, 15mg εκχυλίσματος θύμου μοσχαριού, 15 mg εκχυλίσματος θύμου κουνελιού και εκχύλισμα ερυθροκυττάρων αφού απομακρύνθηκε η αιμοσφαιρίνη με χρωματογραφία ανταλλαγής κατιόντων (Cation exchange chromatography) με Cm-52 (Whatman) σύμφωνα με τη μέθοδο των Rader και συν.⁴⁹, φορτώθηκαν σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου. Η τελική σχέση ακρυλαμιδίου προς διακρυλαμίδιο ήταν 172, ώστε να επιτευχθεί ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός της πρωτεΐνης La 48 kDa από την πρωτεΐνη Ro 52 kDa⁶⁸. Η ηλεκτροφόρηση SDS-γέλης πολυακρυλαμιδίου, η ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών και η ανοσοαποτύπωση έγιναν όπως έχει περιγραφεί^{68, 236}.



Στατιστική Ανάλυση

Τα στοιχεία αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας δοκιμασία χ^2 μετά διόρθωση κατά Yates και παραμετρική μέθοδο Student's t-test.



Αποτελέσματα - Συζήτηση

Σύγκριση των διαθέσιμων μεθόδων για ανίχνευση αντι-Ro αντισωμάτων.

Στην πρώτη μελέτη, η ανοσοκατακρήμνιση RNA βρέθηκε να είναι η πιο ευαίσθητη μέθοδος μεταξύ εκείνων στις οποίες τα αντιγόνα διατηρούν τη φυσική τους διαμόρφωση (native conformation) [αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση (CIE), ELISA και ανοσοκατακρήμνιση RNA]. Στους 93 επιλεγμένους ορούς που εξετάσθηκαν, αντι-Ro αντισώματα ανιχνεύθηκαν στους 47 απ' αυτούς με CIE, στους 40 με ELISA και στους 53 με ανοσοκατακρήμνιση RNA. Στους φυσιολογικούς ορούς δεν βρέθηκαν αντι-Ro αντισώματα με καμιά από τις παραπάνω μεθόδους (Πίνακας 4). Από τους 40 αυτοάνοσους ασθενείς, που βρέθηκαν θετικοί για αντι-Ro αντισώματα με ELISA, οι ασθενείς με 1^ο σS είχαν υψηλότερους τίτλους (14 ασθενείς, μέση τιμή: 36.6 μονάδες/ml, εύρος: 3.5 έως 464 μονάδες/ml) συγκρινόμενοι με ασθενείς με ΣΕΛ (12 ασθενείς, μέση τιμή: 10.4 μονάδες/ml, εύρος: 2 έως 52.1 μονάδες/ml) ή ΡΑ (14 ασθενείς, μέση τιμή: 8.4 μονάδες/ml, εύρος 2.9 έως 28.2 μονάδες/ml).

Οι 32 από τους 53 ορούς που κατακρήμνιζαν Ro-YRNAs με ανοσοκατακρήμνιση RNA (Εικόνα 11), κατακρήμνιζαν επίσης RNAs ενδεικτικά άλλων αντι-RNP ειδικοτήτων, όπως αντι-La (n=21), αντι-U1RNP (n=6) και αντι-Sm (n=5) αντισωμάτων. Επιπρόσθετα, δύο οροί κατακρήμνιζαν μόνο U-RNAs ενδεικτικό της παρουσίας αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων U1nRNP και Sm. Οι οροί με αντι-Ro και

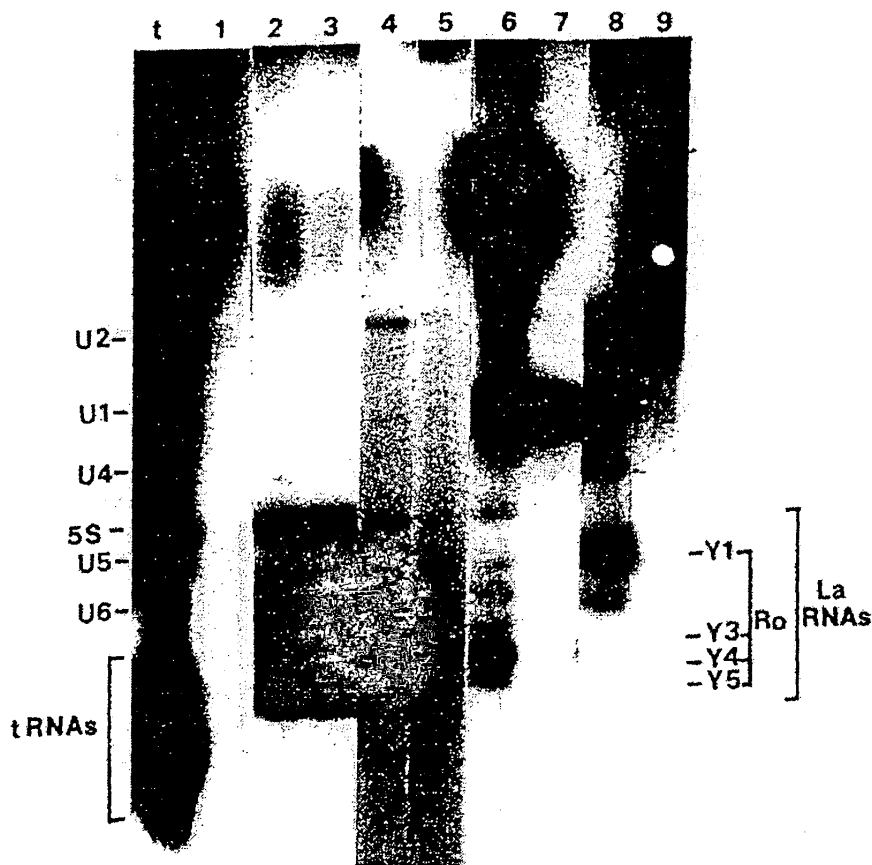
αντι-La αντισώματα, είχαν στην ELISA υψηλότερους τίτλους αντι-Ro αντισωμάτων (52.1 ± 22.2 μονάδες/ml), συγκρινόμενοι με ορούς με αντι-Ro μόνο (8.8 ± 2.5 μονάδες/ml), αντι-Ro και αντι-U1nRNP (6.4 ± 2.2 μονάδες/ml) ή αντι-Ro και αντι-Sm αντισώματα (3.9 ± 2.3 μονάδες/ml).

Πίνακας 4. Αντι-Ro αντισώματα που ανιχνεύθηκαν με αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση (CIE), ανοσοκατακρήμνιση RNA, ELISA και ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας κυτταροπλασματικό εκχύλισμα κυττάρων HeLa (IB-HeLa) ή εκχύλισμα ερυθροκυττάρων (IB-RBC) σε επιλεγμένους ορούς ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα και σε υγιείς μάρτυρες (Φ).

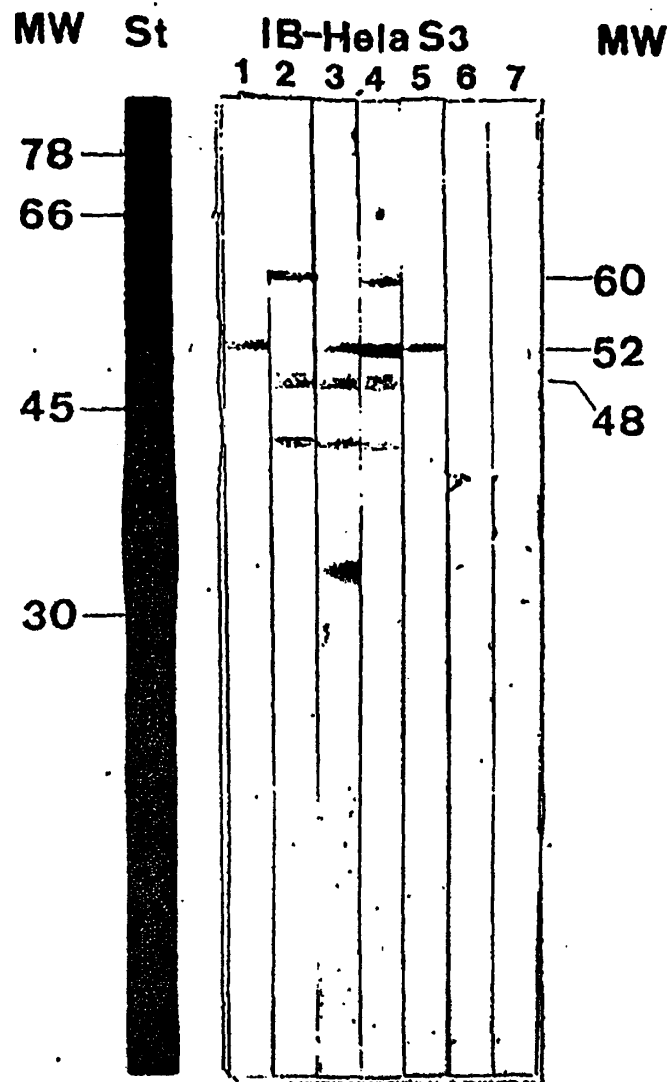
Μέθοδος/αντιγονική ειδικότητα	Αριθμός (%) θετικών ορών			
	1 ^ο σS (n=28)	ΣΕΛ (n=26)	ΡΑ (n=39)	Φ (n=25)
CIE	16 (57)	16 (62)	15 (39)	0 (0)
Ανοσοκατακρήμνιση RNA	17 (61)	17 (65)	19 (49)	0 (0)
ELISA	14 (50)	12 (46)	14 (36)	0 (0)
IB-HeLa				
Αντι-60 ή/και 52 kDa	13 (46)	8 (31)	5 (13)	0 (0)
Αντι-60 kDa	4 (14)	4 (15)	2 (5)	0 (0)
Αντι-52 kDa	13 (46)	5 (19)	3 (8)	0 (0)
IB-RBC				
Αντι-60, 54 ή/και 52 kDa	17 (61)	16 (62)	20 (51)	0 (0)
Αντι-60 kDa	6 (21)	13 (50)	16 (41)	0 (0)
Αντι-54 kDa	3 (11)	1 (4)	4 (10)	0 (0)
Αντι-52 kDa	13 (46)	6 (23)	10 (26)	0 (0)

Οι αντι-Ro θετικοί οροί με CIE και ανοσοκατακρήμνιση RNA, αναγνωρίζουν στην ανοσοαποτύπωση την 60 kDa ή/και 52 kDa πρωτεΐνη, όταν σαν πηγή αντιγόνου χρησιμοποιηθεί είτε κυτταροπλασματικό εκχύλισμα κυττάρων HeLa (IB-HeLa) είτε εκχύλισμα ερυθροκυττάρων (IB-RBC) (Εικόνες 12 και 13). Επιπρόσθετα, μερικοί αντι-Ro θετικοί οροί αντιδρούσαν με την πρωτεΐνη 54 kDa στην IB-RBC (Εικόνα 13).

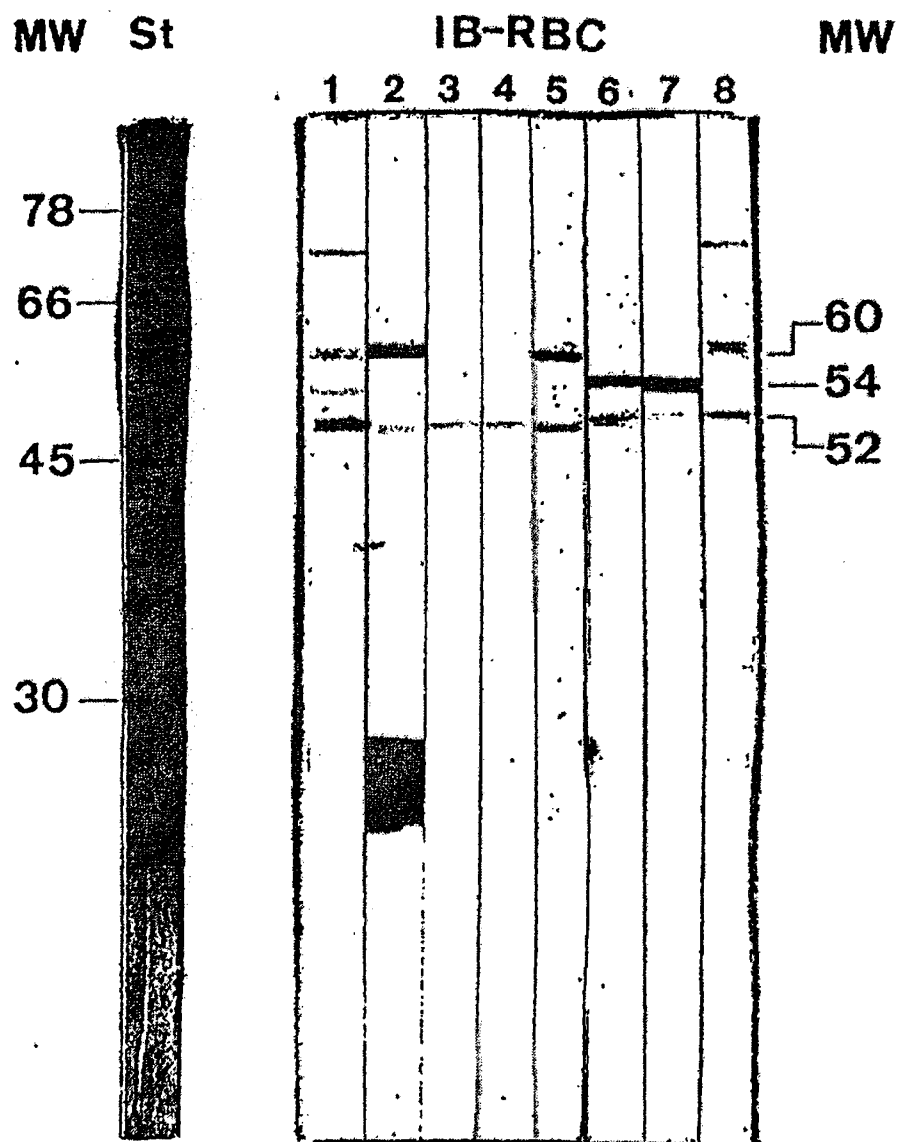




Εικόνα 11. Αντιπροσωπευτικά δείγματα των σεσημασμένων με ^{32}P RNAs (ολικών εκχυλισμάτων κυττάρων HeLa από 5×10^6 περίπου κύτταρα) που ανοσοκατακρημνίζονται με ορούς με διάφορες αντιριβονουκλεοπρωτεϊνικές ειδικότητες. **Διαδρομή 1:** φυσιολογικός ανθρώπινος ορός. **Διαδρομές 2 και 3:** αντι-Ro και αντι-La θετικοί οροί. **Διαδρομές 4 και 5:** αντι-Ro θετικοί οροί, **Διαδρομή 6:** ορός θετικός για αντι-Ro, αντι-La και αντι-U1nRNP αντισώματα. **Διαδρομή 7:** αντι-U1nRNP θετικός ορός. **Διαδρομή 8:** αντι-Sm θετικός ορός, **Διαδρομή 9:** αρνητικό control. Στη **διαδρομή t** φαίνονται όλα τα RNAs δείγματος ολικού εκχυλίσματος κυττάρων HeLa (αντιστοιχεί σε 10^4 κύτταρα περίπου).



Εικόνα 12. Ανοσοαποτύπωση με εκχύλισμα κυττάρων HeLa, αντι-Ro θετικών ορών (με CIE και ανοσοκατακρήμνιση RNA) ασθενών με 1° σS (διαδρομές 1, 2, 4 και 6), ΣΕΛ (διαδρομές 3 και 7) και ΡΑ (διαδρομή 5). Διαδρομές 2 και 4: αντι-Ro και αντι-La θετικοί οροί. Διαδρομές 1, 3 και 5: οροί με αντισώματα μόνο έναντι της πρωτεΐνης 52 kDa. Διαδρομές 2 και 4: οροί θετικοί για αντι-Ro 52 kDa και αντι-Ro 60 kDa αντισώματα, Διαδρομές 6 και 7: οροί αρνητικοί για αντι-Ro 52 kDa ή αντι-Ro 60 kDa αντισώματα. Στις διαδρομές 2-4 φαίνονται αντιδραστικότητες έναντι των πρωτεϊνών La 48 και 43 kDa. Στη διαδρομή St φαίνονται οι πρωτεΐνες στην ταινία της νιτροκυτταρίνης βαμμένες με τη χρωστική Amido Black. Επίσης δείχνονται τα μοριακά βάρη (M.W) των πρωτεϊνών σε kDa.



Εικόνα 13. Ανοσοαποτύπωση με εκχύλισμα ερυθροκυττάρων, αντι-Ro θετικών ορών (με CIE και ανοσοκατακρήμνιση RNA) ασθενών με ΣΕΛ (διαδρομές 1, 4 και 5), 1^ο σS (διαδρομές 2, 3 και 6) και ΡΑ (διαδρομές 7 και 8). **Διαδρομή 1:** ορός με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών 60, 54 και 52 kDa, **Διαδρομές 2, 5 και 8:** οροί θετικοί για αντι-Ro 52 kDa και αντι-Ro 60 kDa αντισώματα, **Διαδρομές 3 και 4:** οροί με αντισώματα μόνο έναντι της πρωτεΐνης 52 kDa, **Διαδρομές 6 και 7:** οροί θετικοί για αντι-Ro 52 kDa ή αντι-Ro 54 kDa αντισώματα. Στη **διαδρομή St** φαίνονται οι πρωτεΐνες στην ταινία της νιτροκυτταρίνης μετά την ηλεκτροφορητική τους μεταφορά και τη χρώση τους με χρωστική Amido Black [στην περιοχή των 60 kDa φαίνεται μια παχιά ταινία πρωτεΐνης(ών)]. Επίσης δείχνονται τα μοριακά βάρη (M.W) των πρωτεϊνών σε kDa.

Από τους 93 ορούς αυτοάνοσων ασθενών που περιελήφθησαν στη μελέτη, αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών 60 kDa ή/και 52 kDa ανιχνεύθηκαν στους 26 από αυτούς με IB-HeLa και στους 53 με IB-RBC. Στους 25 φυσιολογικούς ορούς που εξετάσθηκαν και με τις δύο προαναφερόμενες μεθόδους ανοσοαποτύπωσης δεν βρέθηκε καμιά αντιδραστικότητα (Πίνακας 4). Αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης 60 kDa σπάνια βρέθηκαν με την IB-HeLa σε όλες τις ομάδες ασθενών (5 έως 15%). Τα θετικά αποτελέσματα αφορούσαν κυρίως αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης 52 kDa (Πίνακας 4). Το αντι-Ro 52 kDa αντίσωμα ήταν πιο συχνό στους ασθενείς με 1^ο σS (46%) παρά στους ασθενείς με ΣΕΛ (19%) ή ΡΑ (8%) (Πίνακας 4). Σε τέσσερις ασθενείς με 1^ο σS και σε έναν με ΣΕΛ, παρατηρήθηκαν αντιδραστικότητες έναντι και των δύο πρωτεϊνών 60 και 52 kDa.

Με την IB-RBC, αντισώματα έναντι της ερυθροκυτταρικής πρωτεΐνης 52 kDa βρέθηκαν πιο συχνά σε ασθενείς με 1^ο σS (46%), παρά στους ασθενείς με ΣΕΛ (23%) ή ΡΑ (26%). Αντίθετα, αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης 60 kDa βρέθηκαν πιο συχνά σε ασθενείς με ΣΕΛ (50%) και ΡΑ (41%), παρά στους ασθενείς με 1^ο σS (21%) (Πίνακας 4). Δύο ασθενείς με 1^ο σS, τρεις ασθενείς με ΣΕΛ και έξι ασθενείς με ΡΑ είχαν αντισώματα έναντι και των δύο πρωτεϊνών, 60 και 52 kDa. Τέλος, σε ένα μικρό ποσοστό από κάθε ομάδα ασθενών (4 έως 11%) βρέθηκαν αντισώματα έναντι της ερυθροκυτταρικής πρωτεΐνης Ro 54 kDa (Πίνακας 4). Τα αντι-Ro 54 kDa αντισώματα ανιχνεύθηκαν πάντα μαζί με αντι-Ro 60 ή/και αντι-Ro 52 kDa αντισώματα· πιο συγκεκριμένα σε ένα ορό μαζί με αντι-60 kDa (10σS), σε τρεις ορούς μαζί με αντι-52 kDa (2 1^ο σS και 1 ΡΑ) και σε τέσσερις ορούς μαζί με αντι-60 και αντι-52 kDa αντισώματα (1 ΣΕΛ και 3 ΡΑ).

Η ανοσοκατακρήμνιση RNA χρησιμοποιήθηκε σαν μέθοδος αναφοράς για την ανάλυση των αποτελεσμάτων των άλλων μεθόδων. Η CIE και η ELISA συμφωνούσαν σημαντικά με την ανοσοκατακρήμνιση RNA τόσο στα θετικά (ολική ευαισθησία, CIE 47/53, 89%, ELISA: 38/53, 72%) όσο και στα αρνητικά ευρήματα (ολική ειδικότητα, CIE: 40/40, 100%, ELISA: 38/40, 95%) (Πίνακας 5). Οι μέθοδοι ανοσοαποτύπωσης (IB-HeLa και IB-RBC) ήταν γενικά λιγότερο αξιόπιστες από την CIE και την ELISA για την ανίχνευση των αντι-Ro αντισωμάτων (Πίνακας 5).



Πίνακας 5. Αντι-Ro αντισώματα που ανιχνεύθηκαν με αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση (CIE), ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA) και ανοσοαποτύπωση σε ορούς, τόσο θετικούς όσο και αρνητικούς για αντι-Ro αντισώματα με ανοσοκατακρήμνιση RNA (RNA-P).

Μέθοδος/αντιγονική ειδικότητα	Αριθμός (%) Θετικών ορών					
	RNA-P Θετικοί			RNA-P αρνητικοί		
	10 σS (n=17)	ΣΕΛ (n=17)	PA (n=19)	10 σS (n=11)	ΣΕΛ (n=9)	PA (n=20)
CIE	16 (94)	16 (94)	15 (79)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ELISA	13 (77)	11 (65)	14 (74)	1 (9)	1 (11)	0 (0)
IB-HeLa						
Αντι-60 ή/και 52 kDa	12 (71)	7 (41)	5 (26)	1 (9)	1 (11)	0 (0)
Αντι-60 kDa	4 (24)	3 (18)	2 (11)	0 (0)	1 (11)	0 (0)
Αντι-52 kDa	12 (71)	4 (24)	3 (16)	1 (9)	1 (11)	0 (0)
IB-RBC						
Αντι-60, 54 ή/και 52 kDa	13 (77)	12 (71)	11 (58)	4 (36)	4 (44)	9 (45)
Αντι-60 kDa	2 (12)	9 (53)	7 (37)	4 (36)	4 (44)	9 (45)
Αντι-54 kDa	2 (12)	1 (6)	4 (21)	1 (9)	0 (0)	0 (0)
Αντι-52 kDa	13 (77)	5 (29)	9 (47)	0 (0)	1 (11)	1 (5)

Ωστόσο, οι δύο μέθοδοι βρέθηκε να είναι περισσότερο ευαίσθητες και ειδικές για την ανίχνευση αντι-Ro 52 kDa παρά αντι-Ro 60 kDa αντισωμάτων. Επιπρόσθετα, η πλειονότητα των αντι-52 kDa θετικών ορών με IB-HeLa (19/21, 91%) και με IB-RBC (27/29, 93%) βρέθηκε ότι ανοσοκατακρήνιζουν Ro RNAs (Πίνακας 5). Η ανίχνευση αντι-60 kDa αντισωμάτων με IB-HeLa είναι σπάνια αλλά ειδική, όπως επιβεβαιώθηκε στις 9 από τις 10 περιπτώσεις με ανοσοκατακρήνιση RNA (Πίνακας 5). Αντιθέτως, οι μισοί περίπου από τους ορούς με αντι-60 kDa αντισώματα με IB-RBC (17/35, 49%), ήταν αντι-Ro αρνητικοί με ανοσοκατακρήνιση RNA (Πίνακας 5). Τέλος, οι επτά από τους οκτώ ορούς με αντι-54 kDa αντισώματα με IB-RBC ήταν αντι-Ro θετικοί με ανοσοκατακρήνιση RNA (Πίνακας 5).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων των 53 ορών που ήταν αντι-Ro θετικοί με την ανοσοκατακρήνιση RNA έδειξε την ύπαρξη ισχυρής συσχέτισης ($p < 0.001$) μεταξύ των δύο μεθόδων ανοσοαποτύπωσης (IB-HeLa και IB-RBC) για την ανίχνευση των αντι-52 kDa αντισωμάτων. Οι οροί με αντι-Ro και αντι-La αντισώματα, στην εξέταση με ανοσοκατακρήνιση RNA, βρέθηκε να έχουν αντισώματα κυρίως κατά της πρωτεΐνης 52 kDa όταν εξετάσθηκαν με IB-HeLa (12/21, $p < 0.001$) ή IB-RBC (16/21, $p < 0.001$), καθώς και αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης 54 kDa με IB-RBC (5/21, $p < 0.05$). Χρησιμοποιώντας και τις δύο μεθόδους ανοσοαποτύπωσης, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, όσον αφορά την επίπτωση των αντι-60 kDa αντισωμάτων μεταξύ των διαφόρων ορολογικών υποομάδων.

Από τους 38 αντι-Ro θετικούς ορούς με ELISA και ανοσοκατακρήνιση RNA (Πίνακας 5) οι θετικοί οροί για αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών 52 ή/και 60 kDa με IB-HeLa, είχαν υψηλότερους τίτλους, σε βαθμό στατιστικά σημαντικό ($p < 0.05$) στην ELISA ($n=21$, 57.1 ± 22.5 μονάδες/ml) συγκρινόμενοι με τους αρνητικούς ορούς ($n=17$, 10.1 ± 2.3 μονάδες/ml). αυτό εξηγεί εν μέρει την αναισθησία της μεθόδου IB-HeLa για την ανίχνευση αντισωμάτων χαμηλής συγγένειας. Μια παρόμοια, αλλά μη στατιστικά σημαντική διαφορά, παρατηρήθηκε μεταξύ των θετικών ($n=31$, 40.8 ± 15.4 μονάδες/ml) και των αρνητικών ορών ($n=7$, 10.6 ± 4.9 μονάδες/ml) για αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών 52 ή/και 60 kDa με IB-RBC.



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μετά την πρώτη περιγραφή των αντι-Ro αντισωμάτων, πριν από είκοσι και πλέον έτη²⁰³, η αναγνώριση των αυτοαντισωμάτων σε διάφορες κλινικές ομάδες έχει ενθαρρύνει τη διερεύνηση των αντιδράσεων αντιγόνου-αντισώματος σε μοριακό επίπεδο. Έως τώρα έχουν αναγνωριστεί διάφορα πολυπεπτιδικά συστατικά του αντιγόνου Ro, τα οποία χαρακτηρίζονται από τη σύνδεσή τους με μικρά κυτταροπλασματικά RNAs²²⁷. Η ανοσοκατακρήμνιση αυτών των Y-RNAs με αντι-Ro αντισώματα, είχε σαν αποτέλεσμα να υπάρχει μια αξιόπιστη μέθοδος για τον προσδιορισμό των αντι-Ro αντισωμάτων σε βιολογικά υγρά και ένα μέσον για την εκτίμηση άλλων μεθόδων ανίχνευσης των αντισωμάτων αυτών.

Τα ευρήματά μας, που συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες^{113,237}, υποδηλώνουν ότι η ανοσοκατακρήμνιση RNA είναι μέχρι τώρα η πιο ευαίσθητη μέθοδος για την ανίχνευση των αντι-Ro αντισωμάτων. Στην παρούσα μελέτη η ανοσοκατακρήμνιση RNA χρησιμοποιήθηκε σαν μέθοδος αναφοράς και επιβεβαίωσης για την ανάλυση των αποτελεσμάτων των άλλων μεθόδων. Ωστόσο, λόγω της πολυπλοκότητας και της χρησιμοποίησης μεγάλων ποσοτήτων ραδιοσημασμένων αντιδραστηρίων, η μέθοδος αυτή δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μέθοδος ρουτίνας. Πάντως, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η αντι-Ro ELISA, αν και λιγότερο ευαίσθητη και ειδική από την CIE είναι αξιόπιστη και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν πρώτη εξέταση (screening test) στην καθ' ημέρα πράξη. Η μέθοδος αυτή είναι γρήγορη, σχετικά απλή και ποσοτική. Παρ' όλα αυτά, έως ότου καταστεί δυνατή η χρησιμοποίηση στην ELISA συνθετικών πεπτιδίων ή συντηκόμενων πρωτεϊνών, η κλασική CIE είναι η καλύτερη και πιο αξιόπιστη μέθοδος για την ανίχνευση των αντι-Ro αντισωμάτων. Επιπρόσθετα, αφού έχει δειχθεί ότι η ανοσολογική απόκριση στο αντιγόνο Ro είναι ειδική για το είδος και στρέφεται έναντι του ανθρώπινου αντιγόνου^{114,238}, χρησιμοποιώντας ανθρώπινες πηγές του αντιγόνου Ro, μπορούμε να αυξήσουμε την ευαισθησία της CIE και της εμπορικά διαθέσιμης ELISA. Πάντως, το

εργαστήριό μας σε διάφορες διεργαστηριακές μελέτες (consensus workshops) έδειξε ότι το εκχύλισμα θύμου μοσχαριού στη CIE έχει περίπου την ίδια ευαισθησία και ειδικότητα με το εκχύλισμα ανθρώπινου σπληνός, όσον αφορά την ανίχνευση αντι-Ro αντισωμάτων.

Οι δύο μέθοδοι ανοσοαποτύπωσης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη (IB-HeLa, IB-RBC) φάνηκε να είναι λιγότερο ακριβείς από τις CIE και ELISA για την ανίχνευση των αντι-Ro αντισωμάτων. Αυτό πιθανά οφείλεται στην αλλαγή της διαμόρφωσης των πρωτεϊνών Ro κατά τη διαδικασία της μεθόδου, που οδηγεί σε καταστροφή των επιτόπων¹¹³. Επιπρόσθετα, η συγκριτική ανάλυση των αποτελεσμάτων των μεθόδων ανοσοαποτύπωσης και ELISA, έδειξαν ότι οι πρώτες δεν μπορούν να ανιχνεύσουν χαμηλούς τίτλους αντι-Ro αντισωμάτων, πράγμα που έχει και προηγούμενα δειχθεί¹¹³. Στα χέρια μας, η IB-HeLa, αν και ήταν ειδική (95%) για την ανίχνευση των αντι-Ro αντισωμάτων, δεν ήταν ευαίσθητη, αφού αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών 52 ή/και 60 kDa βρέθηκαν μόνο στο 45% (24/53) των θετικών με ανοσοκατακρήμνιση RNA ορών. Τα περισσότερα από τα αντισώματα αυτά στρέφονταν κατά της Ro52 kDa πρωτεΐνης και παρατηρήθηκαν κυρίως στους ορούς ασθενών με 1^ο σS. Η ίδια συσχέτιση, του 1^ο σS με αντι-52 kDa αντισώματα, έχει περιγραφεί και από άλλους ερευνητές^{51,239}. Ωστόσο, πιθανά αυτό αντανakλά ποσοτικές διαφορές των αυτοαντισωμάτων μεταξύ διαφόρων ομάδων ασθενών, δεδομένου ότι οι δικοί μας οροί ασθενών με 1^ο σS είχαν τους υψηλότερους τίτλους αντι-Ro αντισωμάτων, συγκρινόμενοι με τις άλλες ομάδες. Τα αντι-52 kDa αντισώματα βρέθηκε να επικρατούν στους ορούς με αντι-Ro και αντι-La αντισώματα, γεγονός που συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες²⁴⁰. Εν αντιθέσει όμως με τη μελέτη αυτή²⁴⁰, δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας αντι-60 kDa αντισωμάτων και άλλων αυτοαντισωμάτων.

Όσον αφορά την IB-RBC, δύο σημεία αξίζουν ιδιαίτερης προσοχής. Πρώτον η ταυτόχρονη εξέταση αντι-Ro θετικών και αρνητικών ορών έδειξε ότι η αντιδραστικότητα έναντι της ερυθροκυτταρικής πρωτεΐνης 60 kDa, δεν περιορίζεται



σε αντι-Ro αντισώματα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, οι μισοί σχεδόν από τους αντι-60 kDa θετικούς ορούς με IB-RBC, ήταν αντι-Ro αρνητικοί με ανοσοκατακρήμνιση RNA. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν μια μη-ειδική ανίχνευση αντι-60 kDa αντισωμάτων με IB-RBC αν και δεν έγινε ειδική έκλουση από τις ταινίες της νιτροκυτταρίνης, που πιθανά οφείλεται σε αντιδραστικότητες έναντι μίγματος ερυθροκυτταρικών πρωτεϊνών που κινούνται στην περιοχή των 60 kDa. Πράγματι, μετά την ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών σε ταινίες νιτροκυτταρίνης, η βαφή των πρωτεϊνών αποκαλύπτει μια ορατή πλατιά ταινία 60 kDa (Εικόνα 13). Μπορεί επίσης να αποδοθεί σε αντισωματικές απαντήσεις έναντι "κρυφών" (hidden) επιτόπων της πρωτεΐνης Ro 60 kDa, οι οποίοι εκφράζονται λόγω των συνθηκών μετουσίωσης της μεθόδου. Δεύτερον, τα αποτελέσματά μας με IB-RBC, δείχνουν ότι η κύρια αντιδραστικότητα των αντι-Ro θετικών ορών στρέφεται έναντι της ερυθροκυτταρικής πρωτεΐνης Ro 52 kDa, εν αντιθέσει με προηγούμενες μελέτες που αποδεικνύουν αντιδραστικότητα έναντι της πρωτεΐνης Ro 54 kDa, που βρίσκεται σε εκχυλίσματα ερυθροκυττάρων^{49,240}. Τα ευρήματά μας ενισχύονται από το γεγονός ότι 9 οροί, μονοειδικοί για αντι-Ro αντισώματα με ανοσοκατακρήμνιση RNA, στην εξέτάσή τους με IB-RBC αντιδρούσαν με μια πρωτεΐνη 52 kDa, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 13 (διαδρομές 3 και 4). Η IB-RBC βρέθηκε να είναι το ίδιο ειδική, αλλά περισσότερο ευαίσθητη από την IB-HeLa, για την ανίχνευση των αντι-Ro 52 kDa αντισωμάτων. Δεδομένου ότι ένα μικρό ποσοστό των αντι-Ro θετικών ορών, έχει αντισώματα έναντι της ερυθροκυτταρικής πρωτεΐνης 54 kDa, δεν μπορεί να αποκλεισθεί η παρουσία και των δύο πρωτεϊνών Ro 52 και 54 kDa. Τέλος, τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν την ύπαρξη σημαντικής συσχέτισης μεταξύ IB-HeLa και IB-RBC για την ανίχνευση των αντι-Ro 52 kDa αντισωμάτων, συμφωνώντας έτσι με προηγούμενες μελέτες²⁴⁰. Τα αντι-52 kDa αντισώματα που ανιχνεύθηκαν με IB-RBC, παρατηρήθηκαν κυρίως στους ορούς ασθενών με 1⁰ SS και σε εκείνους που έχουν και αντι-La αντισώματα.



Ανθρωποειδικά αντι-La αντισώματα σε επιλεγμένους ορούς ασθενών με ΡΑ.

Στη δεύτερη μελέτη, τα αποτελέσματα των ορών των ασθενών με ΡΑ, ως προς την παρουσία αντι-Ro και αντι-La αντισωμάτων φαίνονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 6. Ανάμεσα στους 15 αντι-Ro θετικούς ορούς ασθενών με ΡΑ, η αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση (CIE) με εκχύλισμα θύμου μοσχαριού απεκάλυψε επιπρόσθετα την ύπαρξη αντι-La αντισωμάτων σε 3 από αυτούς και αντι-U1nRNP αντισώματος σε έναν άλλο. Με ανοσοκατακρήμνιση RNA οκτώ οροί καθιζάνουν μόνο Y-RNAs (οι τρεις από αυτούς αποκλειστικά Y5-RNA) ενδεικτικά των αντι-Ro αντισωμάτων· μόνο οι τέσσερις από αυτούς ήταν θετικοί για αντι-Ro αντισώματα στη CIE με εκχύλισμα θύμου μοσχαριού. Επίσης, ένας ορός καθιζάνει YRNAs και U1RNA (αντι-Ro και αντι-U1nRNP αντισώματα όπως στη CIE). Η ταυτόχρονη παρουσία αντι-Ro και αντι-La αντισωμάτων (καθίζησης εκτός των Y-RNAs και των 5SRNA και προ-tRNA), βρέθηκε σε 10 ορούς· από αυτούς οι 3 είχαν αντι-Ro και αντι-La αντισώματα και οι υπόλοιποι επτά μόνο αντι-Ro αντισώματα στη CIE με εκχύλισμα θύμου μοσχαριού (Εικόνα 14).

Πίνακας 6. Αντι-Ro και αντι-La αντισώματα που ανιχνεύθηκαν με αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση (CIE), ανοσοενζυμικές μεθόδους (ELISA) και ανοσοαποτύπωση, με εκχυλίσματα θύμου μοσχαριού (CTE), θύμου κουνελιού (RTE) και κυττάρων HeLa (HeLa) σε 39 ορούς ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Η επιλογή των ορών έγινε με βάση τα αποτελέσματα της ανοσοκατακρήμνισης RNA.

	CIE		ELISA ¹	Ανοσοαποτύπωση			
	CTE	RTE		HeLa	HeLa	CTE	RTE
Ανοσοκατακρήμνιση RNA	Αριθμός θετικών ορών						
Αντι-Ro θετικοί (n=19)	15	0	19	14	10 ²	ΔΜ*	ΔΜ
Αντι-La θετικοί (n=10)	3	3	10	1	10	2	2
Αντι-Ro/La αρνητικοί (n=20)	0	0	0	0	0	ΔΜ	ΔΜ

¹: Ανοσοενζυμικές μέθοδοι ELISA για την ανίχνευση αντι-Ro και αντι-La αντισωμάτων.

²: αναγνώριση της 52 ή/και 60 kDa πρωτεΐνης Ro

* Δεν μελετήθηκε





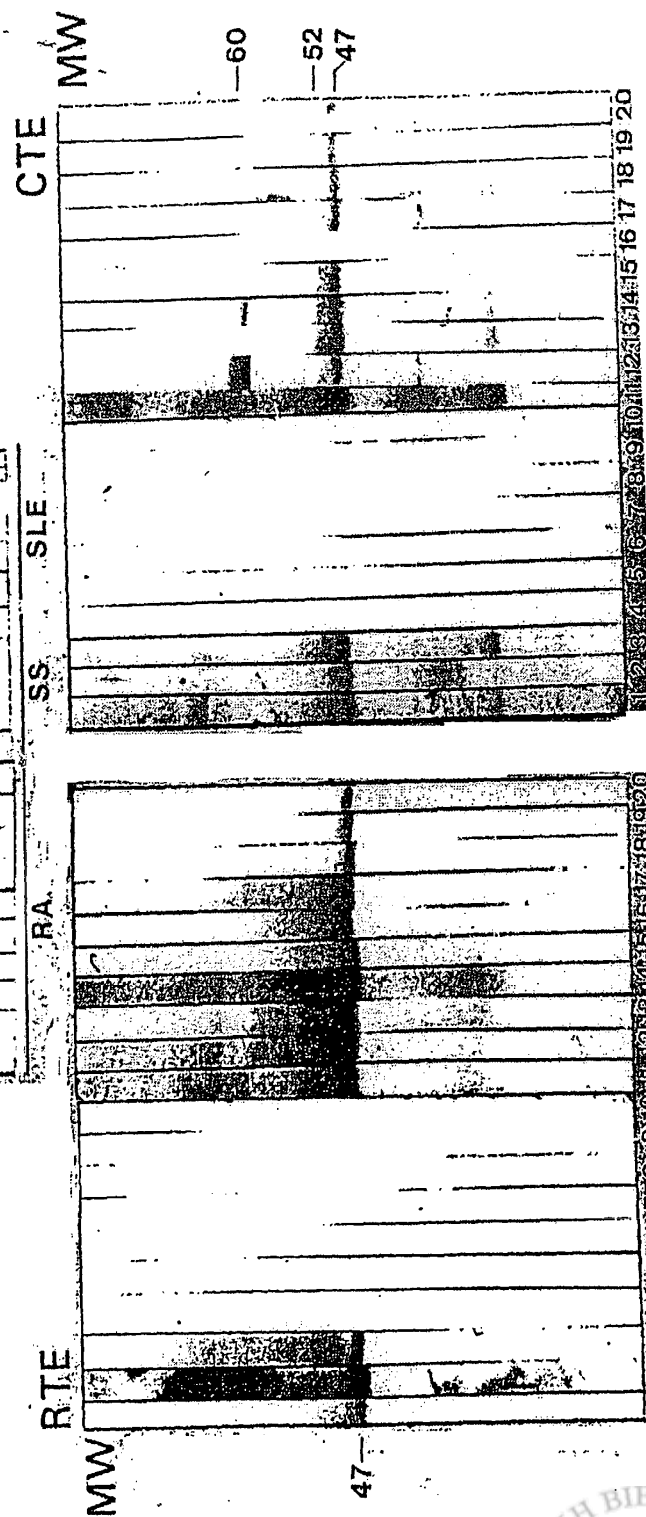
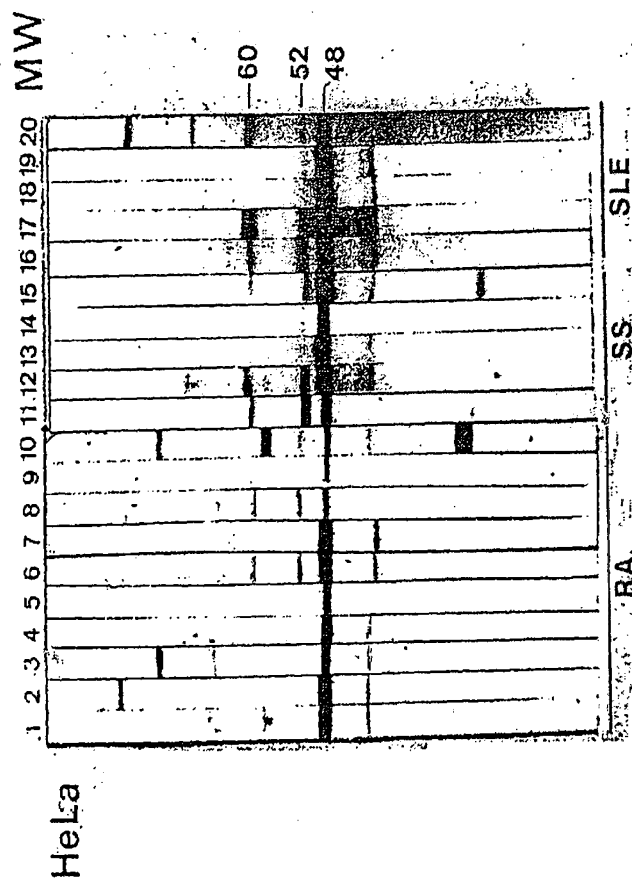
Εικόνα 14. Αντιπροσωπευτικά δείγματα των σεσημασμένων με ^{32}P RNAs ολικών εκχυλισμάτων κυττάρων HeLa (το κάθε ένα αντιστοιχεί σε 5×10^6 κύτταρα περίπου) που ανοσοκατακρημνίζονται με ορούς ασθενών με πρωτοπαθές σύνδρομο Sjogren (SS), συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (SLE) και ρευματοειδή αρθρίτιδα (RA). Όλοι οι ανωτέρω οροί βρέθηκε ότι καθιζάνουν YRoRNAs (θετικοί για αντι-Ro αντισώματα). Στην εικόνα, οι μονοειδικοί για αντι-Ro αντισώματα οροί (SS: διαδρομές 1 και 7, SLE: διαδρομές 4 και 7, RA: διαδρομές 1 και 6) δεν φαίνονται· αυτό οφείλεται στο ότι ο χρόνος έκθεσης του film κατά την αυτοραδιογραφία ήταν μικρός, προκειμένου να δειχθούν οι ανοσοκατακρημνίσεις των RNA στους άλλους ορούς. Εκτός των αντι-Ro θετικών ορών, δείχνονται επίσης οροί με αντι-La (SS: διαδρομές 2-6, SLE: διαδρομή 3 και RA: διαδρομές 2-5), με αντι-La και αντι-U1nRNP (SLE: διαδρομή 1), με αντι-U1nRNP (SLE: διαδρομή 2, RA: διαδρομή 7) ή αντι-U1nRNP και αντι-Sm αντισώματα (SLE: διαδρομές 5 και 6). Η διαδρομή M αντιπροσωπεύει τον PBR 322 DNA δείκτη κομμένο με το περιοριστικό ένζυμο Hpa II (τμήματα μεγέθους 622 έως 626 νουκλεοτίδια). Στη διαδρομή T φαίνονται όλα τα RNAs δείγματος ολικού εκχυλίσματος κυττάρων HeLa (αντιστοιχεί σε 10^4 κύτταρα περίπου). Επίσης, δείχνονται τα RNAs που καθιζάνουν με ορούς αναφοράς· συγκεκριμένα, ορούς με αντι-Sm/U1nRNP αντισώματα (διαδρομή α-Sm), αντι-Ro/La αντισώματα (διαδρομή α-La) και φυσιολογικών ορών (διαδρομή N).

Η ταυτόχρονη ανοσοκαθίζηση των 5SRNA και προ-tRNA μαζί με τα YRNAs επιβεβαιώθηκε επίσης με ειδικό Northern υβριδισμό χρησιμοποιώντας συμπληρωματικούς ανιχνευτές (anti-sense) της αλληλουχίας των Y1, Y3 και Y5 RNA (τα

αποτελέσματα δεν δείχνονται). Με ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA) αντι-Ro αντισώματα βρέθηκαν σε 14 ορούς, οι οποίοι ήταν επίσης θετικοί στη CIE και ανοσοκατακρήμνιση RNA, ενώ αντι-La αντισώματα βρέθηκαν μόνο σε ένα δείγμα. Το δείγμα αυτό ήταν θετικό για αντι-La αντισώματα στην ανοσοκατακρήμνιση RNA αλλά αρνητικό στη CIE με εκχύλισμα θύμου μοσχαριού. Τέλος, στην ανοσοαποτύπωση με ολικό εκχύλισμα κυττάρων HeLa, 10 οροί αναγνώρισαν τις Ro52 ή/και Ro60 πρωτεΐνες. Όλοι οι οροί αυτοί ήταν θετικοί για αντι-Ro αντισώματα στην ανοσοκατακρήμνιση RNA και όλοι πλην ενός ήταν επίσης θετικοί και στην CIE με εκχύλισμα θύμου μοσχαριού. Επίσης, με την ίδια μέθοδο, 10 οροί αναγνώρισαν τα πολυπεπτίδια La 48kDa και 43 kDa· όλοι τους ήταν θετικοί για αντι-La αντισώματα και στην ανοσοκατακρήμνιση RNA (Πίνακας 6, Εικόνα 15, πάνω μέρος).

Η χαμηλή ικανότητα ανίχνευσης αντι-La αντισωμάτων της CIE με εκχύλισμα θύμου μοσχαριού στους ορούς των ασθενών με RA που μελετήθηκαν, μας οδήγησε στην υπόθεση ότι πιθανά αυτό οφείλεται σε διάκριτους αντιγονικά επίτοπους. Οι επίτοποι αυτοί υπάρχουν πιθανά στην ανθρώπινη πρωτεΐνη La του εκχυλίσματος κυττάρων HeLa (που χρησιμοποιείται στην ανοσοκατακρήμνιση RNA και στην ανοσοαποτύπωση), αλλά απουσιάζουν στην πρωτεΐνη La του θύμου μοσχαριού (που χρησιμοποιείται στην CIE). Για το σκοπό αυτό, οι ίδιοι οροί μελετήθηκαν επιπλέον με CIE με εκχυλίσματα κυττάρων HeLa καθώς και θύμου κουνελιού. Πράγματι, τα αποτελέσματα της CIE με εκχυλίσματα κυττάρων HeLa συμφωνούσαν 100% με τα αποτελέσματα της ανοσοκατακρήμνισης RNA, όσον αφορά την ανίχνευση τόσο των αντι-Ro όσο και των αντι-La αντισωμάτων (Πίνακας 6). Εν αντιθέσει, με τη CIE με εκχύλισμα θύμου κουνελιού (που ως γνωστό περιέχει μεγάλες ποσότητες πρωτεΐνης La αλλά μη ανιχνεύσιμες ποσότητες πρωτεΐνης Ro) ανιχνεύθηκαν αντι-La αντισώματα μόνο σε τρεις ορούς· οι ίδιοι οροί ήταν θετικοί και στη CIE με εκχύλισμα θύμου μοσχαριού (Πίνακας 6). Επιπρόσθετα, μέθοδοι ανοσοαποτύπωσης με εκχύλισμα θύμου μοσχαριού και θύμου κουνελιού αντίστοιχα, έδειξαν όμοια αποτελέσματα με τη CIE έναντι των προαναφερόμενων εκχυλισμάτων (Πίνακας 6 και Εικόνα 15, κάτω μέρος).





Εικόνα 15. Ανοσοαποτύπωση με εκχυλίσματα κυττάρων HeLa (HeLa, πάνω μέρος), θύμου κουνελιού (RTE, κάτω αριστερά μέρος) και θύμου μοσχαριού (CTE, κάτω δεξιά μέρος) ορών ασθενών με RA (διαδρομές 1-10), 1^ο σS (διαδρομές 11-15) και ΣΕΛ (διαδρομές 16-20). Όλοι οι οροί ήταν θετικοί για αντι-La αντισώματα στην ανοσοκατακρήμνιση RNA. Τα αντισώματα αναγνώριζαν την πρωτεΐνη La MB 48 kDa στα HeLa και MB 47 kDa στο RTE και CTE και τις πρωτεΐνες Ro MB60 ή/και 52 kDa.

Στη συνέχεια, εκτιμήθηκε η πιθανότητα της ειδικής για το είδος αναγνώρισης της πρωτεΐνης La, με αυτοαντισώματα ορών ασθενών με 1^ο σS και ΣΕΛ. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν, με βάση τα αποτελέσματα της ανοσοκατακρήμνισης RNA, 57 οροί ασθενών με 1^ο σS και ΣΕΛ. Στους ορούς αυτούς περιλαμβάνονταν 19 οροί μονοειδικοί για αντι-Ro αντισώματα, 18 οροί θετικοί για αντι-Ro και για αντι-La αντισώματα καθώς και 20 οροί αρνητικοί για αντι-Ro και αντι-La αντισώματα. Οι οροί αυτοί εξετάστηκαν με CIE και ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας εκχυλίσματα κυττάρων HeLa, θύμου μοσχαριού και θύμου κουνελιού. Επίσης, εξετάστηκαν με ανοσοενζυμικές μεθόδους (ELISA). Οι αντι-La θετικοί οροί, βρέθηκαν σχεδόν όλοι επίσης θετικοί, με όλες τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν και αναγνώριζαν την πρωτεΐνη La σε όλα τα εκχυλίσματα θηλαστικών που χρησιμοποιήθηκαν ως πηγές αντιγόνου (Πίνακας 7, Εικόνα 15). Οι αντι-Ro θετικοί οροί ανιχνεύθηκαν εύκολα με CIE με εκχυλίσματα κυττάρων HeLa και θύμου μοσχαριού· δύο οροί, ένας από ασθενή με 1^ο σS και ένας από ασθενή με ΣΕΛ, αντέδρασαν μόνο με εκχύλισμα κυττάρων HeLa. Αντίθετα, η ευαισθησία τόσο της ELISA όσο και της ανοσοαποτύπωσης για την ανίχνευση των αντι-Ro αντισωμάτων ήταν χαμηλή (Πίνακας 7, Εικόνα 15).

Πίνακας 7. Αντι-Ro και αντι-La αντισώματα που ανιχνεύθηκαν με αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση (CIE), ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA) και ανοσοαποτύπωση, με εκχυλίσματα θύμου μοσχαριού (CTE), θύμου κουνελιού (RTE) και κυττάρων HeLa (HeLa) αντίστοιχα, σε 57 ορούς ασθενών με πρωτοπαθές σύνδρομο Sjogren και συστηματικό ερυθηματώδη λύκο. Η επιλογή των ορών έγινε με βάση τα αποτελέσματα της ανοσοκατακρήμνισης RNA.

Ανοσοκατακρήμνιση RNA	CIE		ELISA ¹		Ανοσοαποτύπωση		
	CTE	RTE	HeLa		HeLa	CTE	RTE
				Αριθμός θετικών ορών			
Αντι-Ro θετικοί (=37)	35	0	37	26	26 ²	ΔΜ*	ΔΜ
Αντι-La θετικοί (n=18)	18	17	18	17	18	13/13	15/15
Αντι-Ro/La αρνητικοί (n=20)	0	0	0	2 ³	0	ΔΜ	ΔΜ

¹: Ανοσοενζυμικές μέθοδοι ELISA για την ανίχνευση αντι-Ro και αντι-La αντισωμάτων.

²: αναγνώριση της 52 ή/και 60 kDa πρωτεΐνης Ro

³: ένας ορός με αντι-Ro και ένας ορός με αντι-La αντισώματα

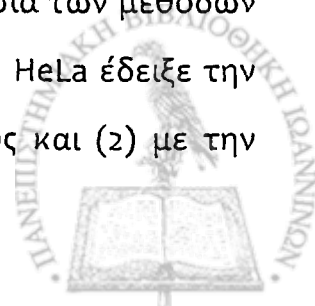
* Δεν μελετήθηκε



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Προηγούμενες μελέτες από το εργαστήριό μας έδειξαν ότι, χρησιμοποιώντας την κλασσική μέθοδο της αντίθετης ανοσοηλεκτροφόρησης με εκχύλισμα θύμου μοσχαριού, αντι-Ro αντισώματα ανιχνεύονται στο 10% περίπου των ορών Ελλήνων ασθενών με ΡΑ, ενώ αντι-La αντισώματα ανευρίσκονται μόνο στο 1% των ασθενών αυτών^{128,187}. Η παρουσία αντι-Ro αντισωμάτων στους ασθενείς αυτούς συσχετίστηκε με υψηλό ποσοστό δυσανεξίας στην D-πενικιλλαμίνη¹²⁸. Στον διεθνή χώρο, η επίπτωση των αντι-Ro και αντι-La αντισωμάτων στους ασθενείς με ΡΑ, διαφέρει στις διάφορες μελέτες και σχετίζεται κυρίως με την ευαισθησία της μεθόδου ανίχνευσής τους. Χρησιμοποιώντας την αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση ή διπλή ανοσοδιάχυση, έχειδειχθεί ότι αντι-Ro αντισώματα βρίσκονται στο 2%^{228,229} ως 19% των ασθενών αυτών^{187,223,225,230} και τα αντι-La αντισώματα σε λιγότερο από το 2%^{187,223,228-230}. Με την ανοσοκαθίζηση, αντι-Ro και αντι-La αντισώματα βρέθηκαν στο 2% και 6%, αντίστοιχα, των ορών ασθενών με ΡΑ²²⁹ και σε ποσοστό άνω του 88% και 63%, αντίστοιχα, στους ασθενείς με ΡΑ και δευτεροπαθές σS¹⁸⁸. Πρόσφατα, οι Slobbe και συν¹¹⁶ χρησιμοποίησαν εκχυλίσματα κυττάρων HeLa επιμολυσμένων με αδενοϊό, που περιείχαν ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα VA RNA-πρωτεΐνης La και έδειξαν την παρουσία αντι-La αντισωμάτων στο 16% των ασθενών με ΡΑ.

Στην παρούσα μελέτη, η χρησιμοποίηση της ανοσοκατακρήμνισης RNA και της ανοσοαποτύπωσης με εκχύλισμα κυττάρων HeLa, έδειξε την παρουσία αντι-La αντισωμάτων σε περισσότερους από τους μισούς αντι-Ro θετικούς ασθενείς με ΡΑ. Αξιοσημείωτο είναι ότι η αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση με εκχυλίσματα θύμου μοσχαριού και θύμου κουνελιού (πηγών πλούσιων σε πρωτεΐνη La) καθώς και η ELISA δεν έδειξαν την παρουσία αντι-La αντισωμάτων στην πλειονότητα των θετικών περιπτώσεων. Το τελευταίο δεν φαίνεται να οφείλεται στην ευαισθησία των μεθόδων αφού: (1) η αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση με εκχύλισμα κυττάρων HeLa έδειξε την παρουσία αντι-La ιζηματινών, σε όλους τους αντι-La θετικούς ορούς και (2) με την



αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση και την ανοσοαποτύπωση με εκχυλίσματα κυττάρων τριών θηλαστικών ελήφθησαν πανομοιότυπα αποτελέσματα. Τα ανωτέρω ευρήματα υποδεικνύουν ότι στους ασθενείς με PA που μελετήθηκαν, τα αντι-La αντισώματα αναγνωρίζουν κυρίως μη εξελικτικά διατηρημένους επιτόπους της ανθρώπινης πρωτεΐνης La. Οι επίτοποι αυτοί προφανώς δεν είναι επίτοποι ασυνεχείς όπως υποδεικνύεται από την αντιδραστικότητά τους σε ανοσοαποτύπωση με συνθήκες μετουσίωσης.

Εν αντιθέσει με τους ασθενείς με PA, αντι-La θετικοί οροί ασθενών με 1^ο σS και ΣΕΛ αναγνωρίζονται ομοιόμορφα με εκχυλίσματα κυττάρων ανθρώπου, μοσχαριού και κουνελιού. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν απόλυτα με προηγούμενες μελέτες που έδειξαν ότι αντι-La αντισώματα ασθενών με 1^ο σS και ΣΕΛ, αντιδρούν με διάφορα εκχυλίσματα κυττάρων θηλαστικών, αναγνωρίζοντας εξελικτικά διατηρημένους επιτόπους της πρωτεΐνης La^{21,60}. Πράγματι, έχειδειχθεί, ότι η ανθρώπινη πρωτεΐνη La είναι πολύ καλά διατηρημένη κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, και συγκρινόμενη με την βόεια πρωτεΐνη έχει επιπρόσθετα τέσσερα αμινοξέα και παρουσιάζει αντικατάσταση άλλων 23 αμινοξέων²⁷. Η λεπτομερής χαρτογράφηση των επιτόπων των συντηγμένων πρωτεϊνών (fusion proteins) που κωδικοποιούνται από τμήματα του ανθρώπινου La cDNA έδειξε ότι αντι-La αντισώματα ασθενών με 1^ο σS και ΣΕΛ αναγνωρίζουν συχνά πολλαπλές αντιγονικές θέσεις στην πρωτεΐνη La, οι οποίες έχουν ιδιότητες διασταυρούμενης αντίδρασης^{241,242}. Ωστόσο, αναγνωρίστηκαν τουλάχιστον τρεις μη αλληλοεπικαλυπτόμενες περιοχές (ονομάστηκαν LaA, LaC και LaD) και οι ανοσοεπικρατούντες επίτοποι προσδιορίστηκαν στο αμινοτελικό LaA^{110,242} ή στο μεσαίο LaC τμήμα²⁴¹.

Έτσι, μελλοντικές μελέτες μπορεί να καθορίσουν αν ο κύριος αυτοεπίτοπος(οι) της πρωτεΐνης La που αντιδρά με ορούς ασθενών με PA, βρίσκεται στην ανθρώπινη LaD περιοχή, η οποία φαίνεται να είναι η λιγότερο καλά διατηρημένη, αφού περιλαμβάνει όλα τα επιπλέον αμινοξέα και την πλειονότητα (57%) των αμινοξέων που αντικαθίστανται.



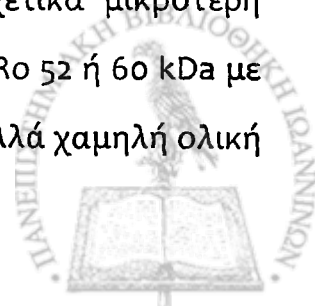
Η αναγνώριση ανθρωποειδικών αντι-La απαντήσεων στην PA, υποδεικνύει πιθανά την ύπαρξη ενός καθοδηγούμενου από αυτοαντιγόνο (autoantigen driven) μηχανισμό για την παραγωγή αντι-La αντισωμάτων στα αυτοάνοσα νοσήματα. Παρόμοια, έχει δειχθεί ότι τα αντι-Ro αντισώματα αναγνωρίζουν κυρίως μη διατηρημένους επίτοπους του ανθρώπινου αυτοαντιγόνου Ro^{60,238}. Πράγματι, και στην παρούσα μελέτη, έξι αντι-Ro θετικοί οροί οι οποίοι δεν ανιχνεύθηκαν με την CIE με εκχύλισμα θύμου μοσχαριού, τελικά έδειξαν δυνατές ιζηματικές γραμμές με εκχύλισμα κυττάρων HeLa (Πίνακες 6 και 7). Τέλος, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι στην καθ'ημέρα πράξη, η αρκετά καλή ευαισθησία της CIE για την ανίχνευση των αντισωμάτων αντι-Ro και αντι-La¹³, μπορεί να αυξηθεί με τη χρησιμοποίηση ανθρώπινων εκχυλισμάτων.



Περίληψη και Συμπεράσματα

Η παρούσα εργασία είχε δύο σκοπούς. Πρώτον, τη σύγκριση πέντε διαθέσιμων έως σήμερα μεθόδων για την ανίχνευση των αντι-Ro αντισωμάτων. Δεύτερον, να εκτιμήσουμε την παρουσία ανθρωποειδικών αντι-La αντισωμάτων σε επιλεγμένους ορούς ασθενών με ΡΑ, δεδομένου ότι στην προηγούμενη μελέτη, μονοειδικοί οροί για αντι-Ro αντισώματα, όταν μελετήθηκαν με ανθρώπινα εκχυλίσματα βρέθηκε να έχουν και αντι-La αντισώματα.

Στο πρώτο μέρος, η αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση (CIE), η ανοσοκατακρήμνιση RNA, η ενζυμική μέθοδος ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού (ELISA) και η ανοσοαποτύπωση με κυτταροπλασματικό εκχύλισμα HeLa (IB-HeLa) και με εκχύλισμα ερυθροκυττάρων (IB-RBC) χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση αντι-Ro αντισωμάτων, σε 93 επιλεγμένους ορούς ασθενών με διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα (από αυτούς 47 ήταν αντι-Ro θετικοί στη CIE). Η ανοσοκατακρήμνιση RNA η οποία αποδείχθηκε ότι έχει τη μεγαλύτερη ευαισθησία χρησιμοποιήθηκε σαν μέθοδος αναφοράς. Η CIE βρέθηκε να είναι αξιόπιστη μέθοδος με ειδικότητα 100% και ευαισθησία 89%. Η ELISA είχε ανάλογη ειδικότητα (95%) αλλά σχετικά μικρότερη ευαισθησία (72%). Η ανίχνευση αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών Ro 52 ή 60 kDa με IB-HeLa βρέθηκε να έχει υψηλή ειδικότητα (95 και 97% αντίστοιχα), αλλά χαμηλή ολική



ευαισθησία (36 και 17% αντίστοιχα). Η ανίχνευση αντι-Ro αντισωμάτων έναντι των ερυθροκυτταρικών πρωτεϊνών Ro, 52, 54 και 60 kDa με IB-RBC, βρέθηκε να έχει ευαισθησία 95, 97 και 57% αντίστοιχα και ειδικότητα 51, 13 και 34% αντίστοιχα. Τα αντι-52 kDa αντισώματα που ανιχνεύθηκαν με IB-HeLa συσχετίζονταν με αυτά που βρέθηκαν με IB-RBC ($p < 0.001$) και απαντώνται κυρίως στο πρωτοπαθές σύνδρομο Sjogren ($p < 0.001$, ευαισθησία 71 και 77%) καθώς και σε ορούς με αντι-Ro και αντι-La αντισώματα ($p < 0.001$).

Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν ότι η ανοσοκατακρήμνιση RNA έχει τη μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα για την ανίχνευση των αντι-Ro αντισωμάτων. Ωστόσο, μέχρις ότου θα είναι διαθέσιμη μια πιο ευαίσθητη ELISA, η CIE, λόγω της αξιοπιστίας της μπορεί να είναι η μέθοδος εκλογής. Τέλος, βρέθηκε ότι η ανίχνευση αντι-Ro 52 kDa αντισωμάτων με IB-RBC είναι πιο ευαίσθητη μέθοδος από την IB-HeLa.

Στο δεύτερο μέρος, οροί ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα (PA), τόσο θετικοί όσο και αρνητικοί για την ύπαρξη αντι-Ro αντισωμάτων, συγκρίθηκαν με ορούς ασθενών με πρωτοπαθές σS (1^ο σS) και ΣΕΛ, όσον αφορά την παρουσία αντι-La αντισωμάτων. Αρκετές μέθοδοι ανίχνευσης αντισωμάτων (ανοσοκατακρήμνιση RNA, αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση, ανοσοενζυμική μέθοδος και ανοσοαποτύπωση) έδειξαν την παρουσία αντι-La αντισωμάτων σε ορούς θετικούς για αντι-Ro αντισώματα (10/19 στη PA, 18/37 στο 1^ο σS και ΣΕΛ) αλλά όχι σε ορούς αρνητικούς για αντι-Ro αντισώματα. Και οι 10 οροί των ασθενών με PA που είχαν αντισώματα αντι-La αντιδρούσαν με εκχύλισμα ανθρώπινων κυττάρων HeLa, αλλά μόνο 3 από αυτούς αντιδρούσαν και με εκχύλισμα θύμου αδένος κουνελιού ή μοσχαριού. Εν αντιθέσει, οι οροί των ασθενών με 1^ο σS και ΣΕΛ με αντι-La αντισώματα, αντιδρούσαν ομοιόμορφα με όλες τις παραπάνω αντιγονικές πηγές. Η μελέτη αυτή υποδεικνύει ότι οι επίτοποι που αναγνωρίζονται από τα αντι-La αντισώματα των ασθενών με PA, διαφέρουν από εκείνους που αναγνωρίζονται από αντισώματα ασθενών με 1^ο σS και ΣΕΛ.



Summary and Conclusions

This thesis had two aims. First the comparison of five currently available methods for the detection of anti-Ro antibodies. Second, to evaluate the presence of human-specific anti-La antibodies in selected sera from RA patients. The latter was based on the previous study, where sera monospecific for anti-Ro antibodies were also found to have anti-La antibodies, when examined using human extracts.

In the first part of the thesis, counterimmunoelectrophoresis (CIE), RNA precipitation, ELISA and immunoblotting against cytoplasmic HeLa cell extract (IB-HeLa) and erythrocyte extract (IB-RBC) were applied to detect anti-Ro antibodies in 93 sera selected from patients with various autoimmune diseases [47 were anti-Ro positive by CIE]. The RNA precipitation assay, which demonstrated the highest sensitivity was selected as the reference method. CIE was found to be reliable with a specificity of 100% and a sensitivity of 89%. ELISA showed a comparable specificity (95%) but somewhat lower sensitivity (72%). Antibodies to 52 or 60 kDa Ro proteins by IB-HeLa demonstrated a high specificity (95 and 97% respectively) but a low overall sensitivity (36 and 17% respectively). Anti-Ro antibodies to 52, 54 and 60 kDa erythrocyte proteins by IB-RBC, had a variable overall specificity (95, 97 and 57%) and sensitivity (51, 13 and 34%). The anti-52 kDa antibodies detected by IB-HeLa correlated to those found by IB-RBC ($p < 0.001$) and

occurred predominantly in primary Sjogren's syndrome ($p < 0.001$, sensitivity: 71 and 77%) as well as in sera with anti-Ro and anti-La antibodies ($p < 0.001$).

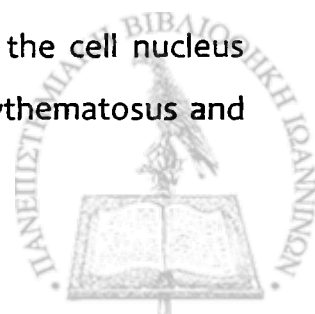
These findings confirm that RNA precipitation assay has the highest sensitivity and specificity for anti-Ro antibody detection. However, until a more sensitive ELISA is available, CIE because of its reliability appears to be the method of choice. Finally, IB-RBC was found to be more sensitive than IB-HeLa for the detection of anti-Ro52 kDa antibodies.

In the second part, sera from anti-Ro positive and negative patients with rheumatoid arthritis (RA) were compared with those from patients with primary Sjogren's syndrome (pSS) and systemic lupus erythematosus (SLE) with regard to anti-La antibodies. Several assays for anti-La (RNA precipitation, counterimmunoelectrophoresis, enzyme-immunoassay and immunoblotting) demonstrated the presence of such antibodies in selected anti-Ro positive (10/19 in RA and 18/37 in pSS and SLE) but not in anti-Ro negative sera. All 10 anti-La sera from RA patients reacted with human HeLa cell extracts, whereas only three also reacted with calf and rabbit thymus extracts. This was in direct contrast to anti-La from pSS and SLE patients where uniform reactivity to all the above mammalian La sources was found. This study suggests that the epitopes recognized by the anti-La antibodies from RA patients differ from those recognized by antibodies from pSS and SLE patients and may provide a clue to their genesis.



Βιβλιογραφία

1. Jones BR: Lacrimal and salivary precipitating antibodies. Lancet 1958: 773-5.
2. Anderson JR, Gray KG, Beck JS, et al: Precipitating autoantibodies in Sjogren's syndrome. Lancet 1961: 456-60.
3. Clark G, Reichlin M, Tomasi T: Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. J. Immunol. 1969; 102: 117-22.
4. Mattioli M, Reichlin M: Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1974; 17: 421-9.
5. Alspaugh M, Tan EM: Antibodies to cellular antigens in Sjogren's syndrome. J. Clin. Invest. 1975; 55: 1067-73.
6. Alspaugh M, Talal N, Tan EM: Differentiation and characterization of autoantibodies and the antigens in Sjogren's syndrome. Arthritis Rheum 1976; 19: 216.
7. Kurata N, Tan EM: Identification of antibodies to nuclear acidic antigens by counterimmunoelectrophoresis. Arthritis Rheum 1976; 19: 574-80.
8. Akizuki M, Powers R, Holman HR: A soluble acidic protein of the cell nucleus which reacts with serum from patients with systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. J. Clin. Invest. 1977; 59: 264-71.



9. Kassan SS, Akizuki M, Steinberg AD, , et al: Antibody to a soluble acidic nuclear antigen in Sjogren's syndrome. *Am J Med* 1977; 63: 328-35.
10. Alspaugh M, Maddison PJ: Resolution of the identity of certain antigen antibody system in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome: an interlaboratory collaboration. *Arthritis Rheum* 1979; 22: 796-8.
11. Lerner MR, Steitz JA: Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 5495-7.
12. Rinke J, Steitz JA: Precursor molecules of both human 5S ribosomal RNA and transfer RNAs are bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies. *Cell* 1982; 29: 149-59.
13. Hendrick JP, Wolin SL, Rinke J, , et al: Ro cytoplasmic small ribonucleoproteins are a subclass of La ribonucleoproteins: further characterization of the Ro and La small ribonucleoproteins from uninfected mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1981; 1: 1138-49.
14. Teppo AM: Enzyme immunoassays of antibodies to Sjogren's syndrome B antigens. *Clin Chem* 1981; 27: 1341-5.
15. Deng JS, Takasaki Y, Tan EM: Nonhistone nuclear antigens reactive with autoantibodies. Immunofluorescent studies of distribution in synchronized cells. *J Cell Biol* 1981; 91: 654-65.
16. Pruijn GJM, Slobbe RL, Van Venrooij WJ: Structure and function of La and Ro RNPs. *Mol Biol Rep* 1990; 14: 43-8.
17. Stefano JE: Purified lupus antigen La recognizes an oligouridylate stretch common to the 3' termini of RNA polymerase III transcripts. *Cell* 1984; 36: 145-54.
18. Champers JC, Kenan D, Martin BJ, et al: Genomic structure and amino acid sequence domains of the human La autoantigen. *J Biol Chem* 1988; 263: 18043-51.
19. Chan EKL, Tan EM: The small nuclear ribonucleoprotein SS-B/La binds RNA with a conserved protease-resistant domain of 28 kilodaltons. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 2588-91.



20. Moreau G, Lin N, Stutz F, et al: Functional analysis of the *Xenopus* La protein. *Mol Biol Rep* 1990; 14: 51.
21. Chan EKL, Tan EM: Human autoantibody-reactive epitopes of SS-B/La are highly conserved in comparison with epitopes recognized by murine monoclonal antibodies. *J Exp Med* 1987; 166: 1627-40.
22. Topfer F, Gordon T, McCluskey J: Characterization of the mouse autoantigen La(SS-B). Identification of conserved RNA-binding motifs, a putative ATP binding site and reactivity of recombinant protein with poly(U) and human autoantibodies. *J Immunol* 1993; 150: 3091-100.
23. Scherly D, Stutz F, Lin Mary N, et al: La proteins from *Xenopus laevis*: cDNA cloning and developmental expression. *J. Mol Biol* 1993; 231: 196-204.
24. Bandziulis RJ, Swanson MS, Dreyfuss G: RNA binding proteins as developmental regulators. *Genes Dev* 1989; 3: 431-7.
25. Query CC, Bentley RC, Keene JD: A common RNA recognition motif identified within a defined U1 RNA-binding domain of the 70K U1 snRNP protein. *Cell* 1989; 57: 89-101.
26. Scherly D, Boelens W, van Venrooij WJ, et al: Identification of the RNA-binding segment of the human U1 protein and definition of its binding site on U1 snRNA. *EMBO J* 1989; 8: 4163-70.
27. Chan EKL, Sullivan KF, Tan EM: Ribonucleoprotein SS-B/La belongs to a protein family with consensus sequences for RNA-binding. *Nucleic Acids Res.* 1989; 17: 2233-44.
28. Habets WJ, Den Brok JH, Boerbooms AMT, et al: Characterization of the SS-B (La) antigen in adenovirus-infected and uninfected HeLa cells. *EMBO J.* 1983; 2: 1625-31.
29. Chan EKL, Francoeur A, Tan EM: Epitopes, structural domains and assymetry of amino acid residues in SS-B/La nuclear protein. *J. Immunol* 1986; 136: 3744-9.
30. Clemens MJ. *Mol Biol Rep* 1993; 17: 81-92



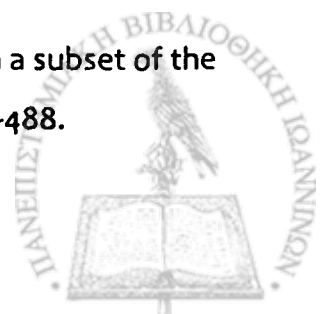
31. Bachmann M, Mayet WJ, Schroder HC, et al: Association of La and Ro antigens with intracellular structures in HEp-2 carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 7770-4.
32. Carmo-Fonseca M, Pfeifer K, Schroder HC, et al: Identification of La ribonucleoproteins as a component of interchromatin granules. *Exp Cell Res* 1989; 185: 73-85.
33. Gottlieb E, Steitz JA: The RNA binding protein La influences both the accuracy and the efficiency of RNA polymerase III transcription in vivo. *EMBO J* 1989; 8: 841-50.
34. Gottlieb E, Steitz JA: Function of the mammalian La protein: evidence for its action in transcription termination by RNA polymerase III. *EMBO J* 1989; 8: 851-61.
35. Bachmann M, Pfeifer K, Schroder HC, et al: Characterization of the autoantigen La as a nucleic acid dependent ATPase/dATPase with melting properties. *Cell* 1990; 60: 85-9.
36. Bachmann M, Pfeifer K, Schroder HL, et al: The La antigen shuttles between the nucleus and the cytoplasm in CV-1 cells. *Mol Cell Biochem*: 1989; 85: 103-14.
37. Meerovitch K, Sritkin YV, Lee HS, et al: La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate. *J Virol* 1993; 67: 3798-807.
38. Guddat U, Bakken AH, Pieler T: Protein-mediated nuclear export of RNA: 5S rRNA containing small RNPs in *Xenopus* oocytes. *Cell* 1990; 60: 619-28.
39. Bachmann M, Falke D, Schroder HC, et al: Intracellular distribution of the La antigen in CV-1 cells after herpes simplex virus type 1 infection compared with the localization of U small nuclear ribonucleoprotein particles. *J. Gen Virol.* 1989; 70: 881-91.
40. Babbonian C, Venables PJW, Booth J, et al: Virus infection induces redistribution and membrane localization of the nuclear antigen La (SS-B): a possible mechanism for autoimmunity. *Clin. Exp. Immunol* 1989; 78: 454-9.



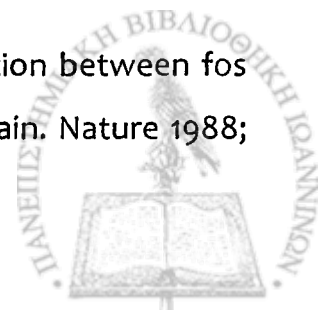
41. Bachman M, Chang S, Slor H, et al: Shuttling of the autoantigen La between nucleus and cell surface after UV irradiation of human keratinocytes. *Exp Cell Res* 1990; 191: 171-80.
42. Furukawa F, Kashihara-Sawami M, Lyons MB, et al: Binding of antibodies to the extractable nuclear antigens SS-A/Ro and SS-B/La is induced on the surface of human keratinocytes by ultraviolet light (UVL): implications for the pathogenesis of photosensitive cutaneous lupus. *J. Invest. Dermatol.* 1990; 94: 77-85.
43. Golan TD, Elkon KB, Gharavi AE, et al: Enhanced membrane binding of autoantibodies to cultured keratinocytes of systemic lupus erythematosus patients after ultraviolet B/ultraviolet A irradiation. *J Clin Invest* 1992; 90: 1067-76.
44. Kato N, Hoshino H, Harada F: Nucleotide sequence of 4.5S RNA (C8 or hY5) from HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 108: 363-70.
45. O'Brien CA, Harley JB: A subset of hY RNAs is associated with erythrocytes Ro ribonucleoproteins. *EMBO J* 1990; 9: 3683-9.
46. Wolin SL, Steitz JA: The Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins: identification of the antigenic protein and its binding site on the Ro RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 1996-2000.
47. Mamula MJ, O'Brien CA, Harley JB, et al: The Ro ribonucleoprotein particle: induction of autoantibodies and the detection of Ro RNAs among species. *Clin Immunol Immunopathol* 1989; 52: 435-46.
48. Itoh Y, Kriet JD, Reichlin M: Organ distribution of the Ro (SS-A) antigen in the guinea pig. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1815-21.
49. Rader MD, O'Brien CA, Yunshang L, et al: Heterogeneity of the Ro/SS-A antigen. Different molecular forms in lymphocytes and red blood cells. *J Clin Invest* 1989; 83: 1293-8.
50. Itoh Y, Reichlin M: Ro/SS-A antigen in human platelets: different distributions of the isoforms of Ro/SS-A protein and the Ro/SS-A-binding RNA. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 888-93.
51. Ben Chetrit E, Chan EKL, Sullivan KF, et al: A 52-kDa protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle. *J Exp Med* 1988; 167: 1560-71.



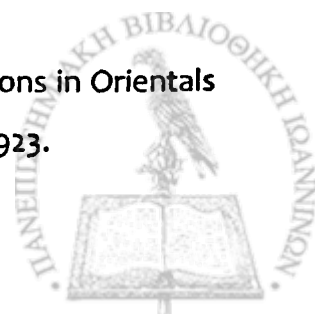
52. Lieu TS, Newkirk MM, Capra JD, et al: Molecular characterization of human Ro/SS-A antigen. Amino terminal sequence of the protein moiety of human Ro/SS-A antigen and immunological activity of a corresponding synthetic peptide. *J Clin Invest* 1988; 82: 96-101.
53. McCauliffe DP, Luk F, Lieu T-S, et al: Molecular cloning, expression and chromosome 19 localization of a human Ro/SS-A autoantigen. *J Clin Invest* 1990; 85: 1379-91.
54. McCauliffe DP, Zappi E, Lieu TS, et al: A human Ro/SS-A autoantigen is the homologue of calreticulin and is highly homologous with onchocercal RAL-1 antigen and an aplysia "Memory Molecule". *J Clin Invest* 1990; 86: 332-5.
55. Rokeach LA, Haselby JA, Meilof JF, et al: Characterization of the autoantigen calreticulin. *J Immunol* 1991; 147: 3031-9.
56. Pruijn GJM, Bozic B, Schoute F, et al: Refined definition of the 56k and other autoantigens in the 50-60 kDa region. *Mol Biol Rep* 1992; 16: 267-76.
57. Boire G, Craft J: Human Ro ribonucleoprotein particles: characterization of native structure and stable association with the La polypeptide. *J Clin Invest* 1990; 85: 1182-91.
58. Boire G, Craft J: Biochemical and immunological heterogeneity of the Ro ribonucleoprotein particles. Analysis with sera specific for the Ro hY5 particle. *J Clin Invest* 1989; 84: 270-9.
59. Pruijn GJM, Slobbe RL, Van Venrooij WJ: Analysis of protein -RNA interactions within Ro ribonucleoprotein complexes. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19: 5173-80.
60. Slobbe RL, Pruijn GJM, Damen WGM, et al: The detection and occurrence of the 60 and 52 kDa Ro (SS-A) antigens and of autoantibodies against these proteins. *Clin Exp Immunol.* 1991; 86: 99-105.
61. Cheng ST, Nguyen TW, Yang YS, et al. Calreticulin binds hYRNA and the 52-kDa polypeptide component of the Ro/SS-A ribonucleoprotein autoantigen. *J Immunol* 1996; 156: 4484-4491.
62. Fouraux MA, Bouvet P, Verkaart S, et al. Nucleolin associates with a subset of the human Ro ribonucleoprotein complexes. *J Mol Biol* 2002; 320: 475-488.



63. Deutscher SL, Harley JB, Keene JD: Molecular analysis of the 60 kDa human Ro ribonucleoprotein. *Proc Natl Acad. Sci USA* 1988; 85: 9479-83.
64. Ben Chetrit E, Gandy BJ, Tan EM, et al: Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the 60-kDa component of the human SS-A/Ro ribonucleoprotein autoantigen. *J Clin Invest* 1989; 83: 1284-92.
65. Bozic B, Pruijn GJM, Rozman B, et al: Sera from patients with rheumatic diseases recognize different epitope region on the 52-kD Ro/SSA protein. *Clin. Exp. Immunol* 1993; 94: 227-35.
66. Berg JM: Zinc fingers and other metal-binding domains. *J Biol Chem* 1990; 265: 6513-6.
67. Nelissen RLH, Heinrichs V, Habets WJ, et al: Zinc finger-like structure in U1-specific protein C is essential for specific binding to U1 snRNP. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 449-54.
68. Byuon JP, Slade SG, Chan EKL, Tam EM, et al: Effective separation of the 52 kDa SS-A/Ro polypeptide from the 48kDa SS-B/La polypeptide by altering conditions of polyacrylamide gel electrophoresis. *J Immunol Methods* 1990; 129: 207-10.
69. Itoh K, Itoh Y, Frank MB: Protein heterogeneity in the human Ro/SS-A ribonucleoproteins. The 52- and 60-kD Ro/SS-A autoantigens are encoded by separate genes. *J Clin Invest* 1991; 87: 177-86.
70. Chan EKL, Hamel JC, Buyon JP, et al: Molecular definition and sequence motifs of the 52-kDa component of human SS-A/Ro autoantigen. *J Clin Invest* 1991; 87: 68-76.
71. Klug A, Rhodes D: "Zinc fingers" a novel protein motif for nucleic acid recognition. *TIBS* 1987; 12: 464-9.
72. Landschultz WH, Johnson PF, McKnight SL: The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA-binding proteins. *Science* 1988; 240: 1759-64.
73. Sassone-Corsi P, Ransone LJ, Lamph WW, et al: Direct interaction between fos and jun nuclear oncoproteins: role of the «leucine zipper» domain. *Nature* 1988; 336: 692-5.



74. Kouzarides T, Ziff E: The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature* 1988; 336: 646-51.
75. Peek R, Pruijn GJM, Van der Kemp AM, et al: Subcellular distribution of Ro RNPs and their constituents. *J Cell Sci* 1993.
76. Bachmann M, Mayet WJ, Schroder HC, et al: Identification of the Ro and La antigens in the endoribonuclease VII-ribonucleoprotein complex. *Biochem J* 1987; 243: 189-94.
77. Elkon KB. Use of synthetic peptides for the detection and quantification of autoantibodies. *Mol Biol Rep* 1992; 16: 207-212.
78. Wahren M, Solomin L, Pettersson I, et al. Autoantibody repertoire to Ro/SSA and La/SSB antigens in patients with primary and secondary Sjogren's syndrome. *J Autoimmun* 1996; 9: 537-544.
79. Pettersson I. Methods of epitope mapping. *Mol Biol Rep* 1992; 16: 149-153.
80. Geysen HM, Rodda SJ, Mason TJ, et al. Strategies for epitope analysis using peptide synthesis. *J Immunol Meth* 1987; 102: 259-274.
81. Itoh Y, Reichlin M. Autoantibodies to the Ro/SSA antigen are conformation dependent. II. Anti-60 kD antibodies are mainly directed to the native protein; anti-52 kD antibodies are mainly directed to the denatured protein. *Autoimmunity* 1992; 14: 57-65.
82. McCauliffe DP, Yin H, Wang L-X, et al. Autoimmune sera react with multiple epitopes on recombinant 52 and 60 kDa Ro(SSA) proteins. *J Rheumatol* 1994; 21: 1073-1080.
83. Tsuzaka K, Fujii T, Akizuki M, et al. Clinical significance of antibodies to native or denatured 60-kd or 52-kd Ro/SS-A proteins in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 88-92.
84. Wahren M, Ruden U, Andersson B, et al. Identification of antigenic regions of the human Ro 60 kD protein using recombinant antigen and synthetic peptides. *J Autoimmun* 1992; 5: 19-32.
85. Boey ML, Peebles CL, Tsay G, et al. Clinical and antibody correlations in Orientals with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1988; 47: 918-923.



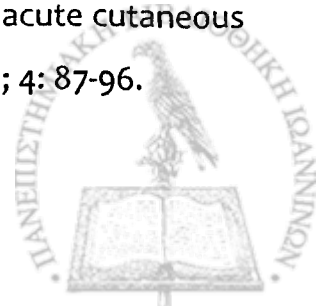
86. Saitta MR, Arnett FC, Keene JD. 60-kDa Ro protein autoepitopes identified using recombinant polypeptides. *J Immunol* 1994; 152: 4192-4202.
87. Veldhoven CH, Pruijn GJ, Meilof JF, et al. Characterization of murine monoclonal antibodies against 60-kD Ro/SS-A and La/SS-B autoantigens. *Clin Exp Immunol* 1995; 101: 45-54.
88. Wahren M, Muller S, Isenberg D. Analysis of B-cell epitopes of the Ro/SS-A autoantigen. *Immunology Today* 1999; 20: 234-239.
89. Routsias JG, Tzioufas AG, Sakarellos DM, et al. Epitope mapping of the Ro/SSA 60KD autoantigen reveals disease-specific antibody-binding profiles. *Eur J Clin Invest* 1996; 26: 514-521.
90. Scofield RH, Harley JB. Autoantigenicity of Ro/SSA antigen is related to a nucleocapsid protein of vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 1991; 88: 3343-3347.
91. Huang SC, Yu H, Scofield RH, et al. Human anti-Ro autoantibodies bind peptides accessible to the surface of the native Ro autoantigen. *Scand J Immunol* 1995; 41: 220-228.
92. James JA, Scofield RH, Harley JB. Lupus humoral autoimmunity after short peptide immunization. *Ann N.Y. Acad Sci* 1997; 815: 124-127.
93. Scofield RH, Henry WE, Kurien BT, et al. Immunization with short peptides from the sequence of the systemic lupus erythematosus-associated 60-kDa Ro autoantigen results in anti-Ro ribonucleoprotein autoimmunity. *J Immunol* 1996; 156: 4059-4066.
94. Scofield RH, Dickey WD, Jackson KW, et al. A common autoepitope near the carboxyl terminus of the 60kD Ro ribonucleoprotein: sequence similarity with a viral protein. *J Clin Immunol* 1991; 11: 378-388.
95. Routsias JG, Sakarellos-Daitsiotis M, Detsikas E, et al. Antibodies to EYRKK vesicular stomatitis virus-related peptide account only for a minority of anti-60KD antibodies. *Clin Exp Immunol* 1994; 98: 414-418.



96. Bozic B, Pruijn GJ, Rozman B, et al. Sera from patients with rheumatic diseases recognize different epitope regions on the 52-kD Ro/SS-A protein. *Clin Exp Immunol* 1993; 94: 227-235.
97. Buyon JP, Slade SG, Reveille JD, et al. Autoantibody responses to the "native" 52-kD SS-A/Ro protein in neonatal lupus syndromes, systemic lupus erythematosus, and Sjogren's syndrome. *J Immunol* 1994; 152: 3675-3684.
98. Blange I, Ringertz NR, Pettersson I. Identification of antigenic regions of the human 52kD Ro/SS-A protein recognized by patient sera. *J Autoimmun* 1994; 7: 263-274.
99. Dorner T, Feist E, Wagenmann A, et al. Anti-52 kDa Ro(SSA) autoantibodies in different autoimmune diseases preferentially recognize epitopes on the central region of the antigen. *J Rheumatol* 1996; 23: 462-468.
100. Dorner T, Feist E, Held C, et al. Differential recognition of the 52-kD Ro(SS-A) antigen by sera from patients with primary biliary cirrhosis and primary Sjogren's syndrome. *Hepatology* 1996; 24: 1404-1407.
101. Kato T, Sasakawa H, Suzuki S, et al. Autoepitopes of the 52-kD SS-A/Ro molecule. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 990-998.
102. Frank MB, Itoh K, McCubbini V. Epitope mapping of the 52-kD Ro/SSA autoantigen. *Clin Exp Immunol* 1994; 95: 390-396.
103. Ricchiuti V, Briand JP, Meyer O, et al. Epitope mapping with synthetic peptides of 52-kD SSA/Ro protein reveals heterogenous antibody profiles in human autoimmune sera. *Clin Exp Immunol* 1994; 95: 397-407.
104. Pourmand N, Pettersson J. The Zn²⁺ binding domain of the human Ro 52 kDa protein is a target for conformation dependent autoantibodies. *J Autoimmun* 1998; 11: 11-17.
105. McNeilage LJ, Macmillan EM, Whittingham SF. Mapping of epitopes on the La(SS-B) autoantigen of primary Sjogren's syndrome: identification of a cross-reactive epitope. *J Immunol* 1990; 145: 3829-3835.
106. Weng YM, McNeilage J, Topfer F, et al. Identification of a human-specific epitope in a conserved region of the La/SS-B autoantigen. *J Clin Invest* 1993; 92: 1104-1108.



107. Rischmueller M, McNeilage LJ, McCluskey J, et al. Human autoantibodies directed against the RNA recognition motif of La(SS-B) bind to a conformational epitope present on the intact La (SS-B)/Ro (SS-A) ribonucleoprotein particle. *Clin Exp Immunol* 1995; 101: 39-44.
108. Haaheim LR, Kvakestad R, et al. Immunodominant epitopes on the La/SSB autoantigen recognized by sera from patients with primary Sjogren syndrome and systemic lupus erythematosus. *Sjogren's syndrome: State of the Art- 4th International Symposium, Tokyo, Japan*, pp. 11-13.
109. Troster H, Bartsch H, Klein R, et al. Activation of a murine autoreactive B cell by immunization with human recombinant autoantigen La/SS-B: characterization of the autoepitope. *J Autoimmun* 1995; 8: 825-842.
110. Kohsaka H, Yamamoto K, Fujii H, et al. Fine epitope mapping of the human SS-B/La protein. Identification of a distinct autoepitope homologous to a viral gag polyprotein. *J Clin Invest* 1990; 85: 1566-1574.
111. Tzioufas AG, Yiannaki E, Sakarellos DM, et al. Fine specificity of autoantibodies to La/SSB: epitope mapping and characterization. *Clin Exp Immunol* 1997; 108: 191-198.
112. Williams DG, Stocks MR, Charles PJ, et al: Antibodies to La, Jo-1, nRNP and Sm detected by mutli-track immunoblotting using a novel filter holder: a comparative study with counterimmunoelectrophoresis and immunodiffusion using sera from patients with systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. *J. Immunol. Methods* 1986; 91: 65-73.
113. Meilof JF, Bantjes I, De Jong J, et al: THE detection of anti-Ro/SS-A and anti-La/SS-B antibodies. A comparison of counterimmunoelectrophoresis with immunoblot, ELISA and RNA-precipitation assays. *J. Immunol Methods* 1990; 133: 215-26.
114. Provost TT, Levin LS, Watson RM, et al: Detection of anti-Ro (SS-A) antibodies by gel double-diffusion and a "sandwich" ELISA in systemic and subacute cutaneous lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. *J Autoimmun* 1991; 4: 87-96.



115. Van Venrooij WJ, Charles P, et al: The consensus workshops for the detection of autoantibodies. *J. Immunol Methods* 1991; 140: 181-9.
116. Slobbe RL, Van Esch SA, Kveder T, et al: The use of adenovirus-infected HeLa cells for the detection of low titer autoantibodies. *J Immunol Methods* 1991; 138: 237-44.
117. Gaither KK, Fox OF, Yamagata H, et al: Implications of anti-Ro/Sjogren's syndrome A antigen autoantibody in normal sera for autoimmunity. *J Clin Invest* 1987; 79: 841-6.
118. Mumford P, Room GRW, Venables PJW, et al: IgG antibodies to SS-B(La), RNP/Sm and DNA are produced by PWM-stimulated normal human lymphocytes in culture. *Rheumatol Int* 1988; 5: 109-12.
119. Maddison PJ, Provost TT, Reichlin M. Serologic findings in patients with "ANA-negative" SLE. *Medicine (Balt)* 1981; 60: 87-94.
120. Provost TT, Arnett FC, Reichlin M. C2 deficiency, lupus erythematosus, and anti-cytoplasmic Ro(SS-A) antibodies. *Arthritis Rheum* 1983; 26: 1279-1282.
121. Tappainer G, Hintner H, Scholz S, et al. Systemic lupus erythematosus in hereditary deficiency of the fourth component of complement. *J Am Acad Dermatol* 1982; 7: 66-79.
122. Provost TT, Talal N, Harley JB, et al. The relationship between anti-Ro(SS-A) antibody positive Sjogren's syndrome and anti-Ro(SS-A) antibody positive lupus erythematosus. *Arch Dermatol* 1998; 124: 63-71.
123. Tsokos GL, Pillemer SR, Klipper JH: Rheumatic diseases associated with antibodies to the Ro(SSA) ribonucleolar protein. *Semin Arthritis Rheum* 1987; 16: 237-44.
124. McCauliffe DP. Cutaneous diseases in adults associated with anti-Ro/SS-A autoantibody production. *Lupus* 1997; 6: 158-166.
125. Buyon JP, Winchester RJ, Slade SC, et al. Identification of mothers at risk for congenital heart block and other neonatal lupus syndromes in their children. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1263-1273.



126. Reichlin M: Current perspectives on serological reaction in SLE patients. *Clin. Exp. Immunol* 1981; 44: 1.
127. Meyer O, Hauptmann G, Tappainer G, et al. Genetic deficiency of C4, C2 or C1q and lupus syndromes. Association with anti-Ro(SSA) antibodies. *Clin Exp Immunol* 1985; 62: 678.
128. Skopouli FN, Andonopoulos AP, Moutsopoulos HM: Clinical implications of the presence of anti-Ro(SSA) antibodies in patients with rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* 1988; 3: 381-8.
129. Bernstein RM, Bunn CC, Hughes GRV, et al. Cellular protein and RNA antigens in autoimmune disease. *Mol Biol Med* 1984; 2: 105-120.
130. Moutsopoulos HM, Giotaki H, Maddison PJ. Antibodies to cellular antigens in Greek patients with autoimmune rheumatic diseases: anti-Ro(SSA) antibody a possible marker of penicillamine-D intolerance. *Ann Rheum Dis* 1984; 43: 285-287.
131. Moutsopoulos HM, Skopouli FN, Sarras AK. Anti-Ro(SSA) positive rheumatoid arthritis (RA): a clinicoserological group of patients with high incidence of D-penicillamine side effects. *Ann Rheum Dis* 1984; 44: 215-219.
132. Tishler M, Golbrut B, Shoenfeld Y, et al. Anti-Ro(SSA) antibodies in patients with rheumatoid arthritis – a possible marker for gold induced side effects. *J Rheumatol* 1994; 21: 1040-1042.
133. Boire G, Menard HA, Gendron M, et al. Rheumatoid arthritis: anti-Ro antibodies define a non-HLA-DR4 associated clinicoserological cluster. *J Rheumatol* 1993; 20: 1654-1660.
134. Franceschini F, Cavazzana I, Malacarne F, et al. Anti-Ro/SSA antibodies in rheumatoid arthritis (RA). *Arthritis Res Ther* 2003; 5(Suppl 1): 8.
135. Parodi A, Puiatti P, Rebora A. Serologic profiles as prognostic clues for progressive systemic scleroderma: The Italian experience. *Dermatologica* 1991; 183; 1-20.
136. Drosos AA, Andonopoulos AP, Costopoulos JS. Sjogren's syndrome in progressive systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1988; 15: 965-968.



137. Fujimoto M, Shimozuma M, Yazawa N, et al. Prevalence and clinical relevance of 52 kDa Ro/SSA autoantibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 1997; 56: 667-670.
138. Antonioli C, Franceschini F, Cavazzana I, et al. Anti-Ro/SSA antibodies in systemic sclerosis (SSc): Determination of the fine specificity, clinical and laboratory correlations. *Arthritis Res* 2002; 4: A27.
139. Breit SN, Cairns D, Szentirmay A, et al. The presence of Sjogren syndrome is a major determinant of pattern of interstitial lung disease in scleroderma and other connective tissue diseases. *J Rheumatol* 1989; 16: 8.
140. Targoff IN, Miller FW, Medsger TA, et al. Classification criteria for the idiopathic inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheum* 1997; 9: 527-535.
141. Kao AH, Lacomis D, Lucas M, et al. Antisignal recognition particle autoantibody in patients with and patients without idiopathic inflammatory myopathy. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 209-215.
142. Rutjes SA, Vree Egberts WTM, Jongen P. Anti-Ro 52 antibodies frequently co-occur with anti-Jo1 antibodies in sera from patients with idiopathic inflammatory myopathy. *Clin Exp Immunol* 1997; 109: 32-40.
143. Frank MB, McCubbin V, Trieu E. The association of anti-Ro 52 autoantibodies with myositis and scleroderma autoantibodies. *J Autoimmun* 1999; 12: 137-142.
144. Kubo M, Ihn H, Asano Y, et al. Prevalence of 54 KD and 60 kD Ro/SSA autoantibodies in Japanese patients with polymyositis/dermatomyositis. *J Am Acad Dermatol* 2002; 47: 148-151.
145. Franceschini F, Cretti L, Quinzanini M, et al. Deforming arthropathy of the hands in systemic lupus erythematosus is associated with antibodies to SSA/Ro and to SSB/La. *Lupus* 1994; 3: 419-422.
146. Simmons-O'Brien E, Suephy C, Watson R, et al. One hundred anti-Ro(SS-A) antibody positive patients: a 10-year follow-up. *Medicine* 1995; 74: 109-130.
147. Catoggio LR, Skinner RP, Smith G, et al. Systemic lupus erythematosus in the elderly. Clinical and serological characteristics. *J Rheumatol* 1984; 11: 175-181.



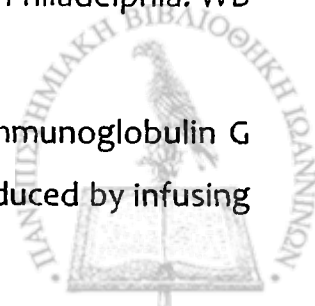
148. Hochberg MC, Boyd RE, Ahearn JM, et al. Systemic lupus erythematosus: a review of clinico-laboratory features and immunogenetic markers in 150 patients with emphasis on demographic subsets. *Medicine* 1988; 64: 285-295.
149. Reichlin M, Harley JB, Antibodies to Ro/SSA and the heterogeneity of systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1987; 14: 112.
150. Hedgepeth MT, Boulware DW. Interstitial pneumonitis in antinuclear antibody-negative systemic lupus erythematosus: a new clinical manifestation and possible association with anti-Ro(SSA) antibodies. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 545-552.
151. Provost TT, Watson R, Simmons-O'Brian E. Anti-Ro(SSA) antibody positive Sjogren's/lupus erythematosus overlap syndrome. *Lupus* 1977; 6: 105-111.
152. Voulgari PV, Katsimbri P, Alamanos Y, et al. Gender and age differences in systemic lupus erythematosus. A study of 489 Greek patients with a review of the literature. *Lupus* 2002; 11: 722-729.
153. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003; 349: 1526-1533.
154. Alexander EL, Arnett FC, Provost TT, et al. Sjogren's syndrome: association of anti-Ro(SSA) antibodies with vasculitis, hematologic abnormalities, and serologic hyperreactivity. *Ann Int Med* 1983; 98: 155-160.
155. Praprotnik S, Bozic B, Kveder T, et al. Fluctuation of anti-Ro/SSA antibody levels in patients with systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome: a prospective study. *Clin Exp Rheumatol* 1999; 17: 63-68.
156. Scopelitis E, Biundo JB, Alsbaugh MA. Anti-SSA antibody and other antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1980; 23: 287-293.
157. Derksen R, Meilof JF. Anti-Ro/SSA anti-La/SSB autoantibody levels in relation to systemic lupus erythematosus disease activity and congenital heart block. A longitudinal study comprising two consecutive pregnancies in patient with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 953-959.



158. Wahren M, Tengner P, Gunnarsson I, et al. Ro/SSA and La/SSB antibody level variation in patients with Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 1998; 11: 29-38.
159. Tseng CE, Di Donato F, Buyon JP. Stability of immunoblot profile of anti-SSA/Ro-SSB/La antibodies over time in mothers whose children have neonatal lupus. *Lupus* 1996; 5: 212-215.
160. Franceschini F, Coluccio E, Brucato A, et al. Anti-Ro/SSA autoantibodies over time in mother of children with congenital complete heart block. *Clin Exp Rheum* 1999; 17: 634-635.
161. Litsey SE, Noonan JA, O'Connor WN, et al: Maternal connective tissue disease and congenital heart block. Demonstration of immunoglobulin in cardiac tissue. *N. Engl J Med* 1985; 312: 98-100.
162. Deng JS, Bair LW, Shen-Schwartz S, et al. Localization of Ro(SSA) antigen in the cardiac conduction system. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 1232-1238.
163. Taylor PV, Scott JS, Gerlis LM, et al. Maternal autoantibodies against fetal cardiac antigens in congenital complete heart block. *N Engl J med* 1986; 315: 667-672.
164. Tseng CE, Buyon JP. Neonatal lupus syndrome. *Pregnancy and rheumatic disease. Rheum Dis Clin North Am* 1997; 1: 31-57.
165. Alexander E, Buyon J, Provost TT, et al. Anti-Ro/SSA antibodies in the pathophysiology of congenital heart block in neonatal lupus syndrome, an experimental model. In vivo electrophysiologic and immunocytochemical studies. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 176-189.
166. Garcia S, Nascimento JHM, Bonfa E, et al. Cellular mechanism of the conduction abnormalities induced by serum from anti-Ro/SSA positive patients in rabbit hearts. *J Clin Invest* 1994; 93: 718-724.
167. Boutjdir M, Chen L, Zhang ZH, et al. Arrhythmogenicity of IgG and anti-52 kD SSA/Ro affinity-purified antibodies from mother of children with congenital heart block. *Circ Res* 1997; 80: 354-362.



168. Xiao GC, Hu K, Boutjdir M. Direct inhibition of expressed cardiac L- and T-type calcium channels by IgG from mothers whose children have congenital heart block. *Circulation* 2001; 103: 1599-1604.
169. Mavragani CP, Dafni UG, Tzioufas AG, et al. Pregnancy outcome and anti-Ro/SSA in autoimmune diseases: a retrospective cohort study. *Br J Rheumatol* 1998; 37: 740-745.
170. Mavragani CP, Ioannidis JPA, Tzioufas AG, et al. Recurrent pregnancy loss and autoantibody profile in autoimmune diseases. *Rheumatology* 1999; 38: 1228-1233.
171. Babbonian C, Venable PJW, Booth J, et al. Virus infection induces redistribution and membrane localization of the nuclear antigen La(SSB): A possible mechanism for autoimmunity. *Clin Exp Immunol* 1989; 78: 454-459.
172. Ciocca DR, VargasRoig LM. Estrogen receptors in human non target tissues: Biological and clinical implications. *Endocr Rev* 1995; 16: 35-62.
173. Buyon JP, Brucato A. Neonatal lupus. *Semin Clin Immunol* 1998; 15: 5-19.
174. Miranda E, Chan EKL, Tseng C, et al. Recognition by maternal autoantibodies of 48 kD La, 52 kD and 60 kD Ro on the cell surface of apoptotic human fetal cardiocytes: A potential mediator of inflammation. *Arthritis Rheum* 1998; S: 571.
175. Penner E, Reichlin M: Primary biliary cirrhosis associated with Sjogren's syndrome: evidence for circulating and tissue deposited Ro/anti-Ro immune complexes. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1250-3.
176. Maddison PJ, Reichlin M: Deposition of antibodies to a soluble cytoplasmic antigen in the kidneys of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1979; 22: 858-63.
177. Reichlin M, Harley JB: Antibodies to Ro(SSA) and the heterogeneity of systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1987; 14(Suppl 13): 112-7.
178. Reichlin M. Antibodies to ribonuclear proteins in systemic lupus erythematosus. In: McCune WJ, ed. *Rheumatic Disease of North America*, Vol 20. Philadelphia: WB Saunders Co; 1994: pp. 29-43.
179. Lee LA, Garther KK, Coulter SN, et al: Pattern of cutaneous immunoglobulin G deposition in subacute cutaneous lupus erythematosus is reproduced by infusing



- purified anti-Ro(SSA) antibodies into human skin-grafted mice. *J. Clin Invest* 1989; 83: 1556-62.
180. LeFeber WP, Norris DA, Ryan SR, et al: Ultraviolet light induces expression of selected nuclear antigens on cultured human keratinocytes. *J. Clin. Invest* 1984; 74: 1545-51.
 181. Furukawa F, Kaslinhara-Sawami M, Lyons MB, et al. Binding of antibodies to the extractable nuclear antigens SSA/Ro and SSB/La is induced on the surface of human keratinocytes by ultraviolet (UVL): implications for the pathogenesis of photosensitive cutaneous lupus. *J Invest Dermatol* 1990; 94: 77-85.
 182. Golan TD, Elkon KB, Gharavi AE, et al. Enhanced membrane binding of autoantibodies to cultured keratinocytes of systemic lupus erythematosus patients after Ultraviolet B/ultraviolet A irradiation. *J Clin Invest* 1992; 90: 1067-1076.
 183. Norris DA, Ryan SR, Fritz KA, et al: The role of RNP, Sm and SSA specific antisera from patients with lupus erythematosus in inducing antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) of ribonucleoprotein coated targets: a potential mechanism for lupus skin lesions. *Clin Immunol Immunopathol* 1984; 31: 311-20.
 184. Davis TL, Lyde CB, Davis BM, et al: Perturbation of experimental ultraviolet light induced erythema by passive transfer of serum from subacute cutaneous lupus erythematosus patients. *J. Invest Dermatol* 1989; 573-77.
 185. Wilson R, Provost TT, Bias WB, et al. Sjogren's syndrome: influence of multiple HLA-D region alloantigens on clinical and serological expression. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 1245-1253.
 186. Hamilton RG, Harley JB, Bias WB, et al. Two Ro(SS-A) autoantibody responses in systemic lupus erythematosus. Correlation of HLA DR/DQ specificities with quantitative expression of Ro(SS-A) autoantibody. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 496-505.
 187. Manoussakis MN, Tzioufas AG, Pange PJE, et al: Serological profiles in subgroups of patients with Sjogren's syndrome. *Scand J Rheum* 1986; 61 (Suppl): 89-92.



188. Harley JB, Alexander E, Bias WB, et al: Anti-Ro (SS-A) and anti-La (SS-B) in patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 196-206.
189. Tzioufas AG, Manoussakis MN, Costello R, et al: Cryoglobulinemia in autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 1098-104.
190. Manoussakis MN, Zerva LV, Siouna-Fatourou CG, et al: Sjogren's syndrome: immunological parameters in saliva. *Clin. Rheumatol* 1989; 8: 147A.
191. Ben-Chetrit E, Fischel R, Rubinow A: Anti-SSA/Ro and anti-SSB/La antibodies in serum and saliva of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1991; 34(Suppl): B28.
192. Horsfall AC, Rose LM, Maini RN: Autoantibody synthesis in salivary glands of Sjogren's syndrome patients. *J. Autoimmun.* 1989; 2: 559-68.
193. Buyon JP, Ben Chetrit E, Karp S, et al. Acquired congenital heart block. Pattern of maternal and body response to biochemically defined antigens of the SS-A/Ro – SS-B/La system in neonatal lupus. *J Clin Invest* 1989; 84: 627-634.
194. Venables PJW, Charles PJ, Buchanan RRC, et al. Quantitation and detection of isotypes of anti-SSB antibodies by ELISA and Farr assays using affinity purified antigens. *Arthritis Rheum* 1983; 26: 146-155.
195. Horsfall AC, Rose LM, Maini RN. Autoantibody synthesis in salivary glands of Sjogren's syndrome patients. *J Autoimmune* 1991; 4: 165-176.
196. Meilof JF. Autoantibodies against small cytoplasmic ribonucleoproteins: the anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoimmune response. A review of autoantibody detection, autoantigen composition, autoantibody-disease associations and possible etiologic mechanisms. *Rheumatol Int* 1992; 12: 129-140.
197. Maran R, Dueymes M, Pennec YL, et al. Predominance of IgG1 subclass of antiRo/SSA, but not antiLa/SSB antibodies in primary Sjogren's syndrome. *J Autoimmune* 1993; 6: 379-387.
198. Reichlin M, Scofield RH. SSA (Ro) autoantibodies. In: Peter JB, Shoenfeld Y, eds. *Autoantibodies*. Elsevier Science, BV; 1996: 783-788.



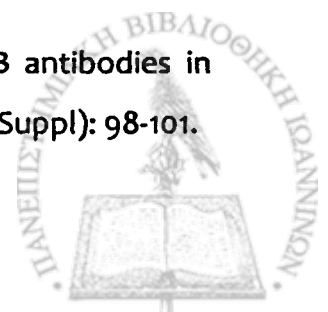
199. Topfer F, Gordon T, McCluskey J. Intra- and intermolecular spreading of autoimmunity involving the nuclear self-antigens La(SSB) and Ro (SSA). *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 875-879.
200. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med* 1994; 179: 1317.
201. Holman HR, Kunkel HG: Affinity between the lupus erythematosus serum factor and cell nuclei and nucleoprotein. *Science* 1957; 126: 162-63.
202. Manoussakis MN, Garalea KL, Tzioufas AG, et al: Testing for antibodies to ENA and to dsDNA is not indicated to FANA negative sera. *Clin. Rheumatol* 1988; 7: 465.
203. Tan EM: Autoantibodies to nuclear antigens (ANA). Their immunobiology and medicine. *Adv. Immunol* 1982; 33: 167-240.
204. Harmon CE, Deng J, Peebles CL, Tan EM. The importance of tissue substrate in the SS-A/Ro antigen-antibody system. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 166-173.
205. Pollock W, Toh BH. Routine immunofluorescence detection of Ro/SSA autoantibody using Hep-2 cells transfected with human 60 kDa Ro/SSA. *J Clin Pathol* 1999; 52: 684-687.
206. Peene I, Van Ael W, Vandenbossche M, et al. Sensitivity of the Hep-2000 substrate for the detection of anti-SSA/Ro 60 antibodies. *Clin Rheumatol* 2000; 19: 291-295.
207. Bunn C, Kveder T. Counterimmunoelectrophoresis and immunodiffusion for the detection of antibodies to soluble cellular antigens. *Manual of biological markers of disease. Vol A3. Kluwer Academic Publishers; 1993; p.1-12.*
208. Charles PJ, Van Venrooij WJ, Maini RN. The consensus workshop for the detection of autoantibodies to intracellular antigens in rheumatic diseases: 1989-1992. *Clin Exp Rheumatol* 1992; 10: 507-511.
209. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1979; 76: 4350-4354.



210. Habets WJ, Berden JHM, Huch SO, et al: Further characterization and subcellular localization of Sm and U1 ribonucleoprotein antigens. *Eur J Immunol* 1985; 15: 992-997.
211. Dam AP van, Van den Brink HG, Smeenk RJT: Technical problems concerning the use of immunoblots for the detection of antinuclear antibodies. *J Immunol Methods* 1990; 129: 63-70.
212. Boire G, Lopez-Longo F-J, Lapointe S, et al: Sera from patients with autoimmune disease recognize conformational determinants on the 60-kD Ro/SS-A protein. *Arthritis Rheum.* 1991; 34: 722-30.
213. Rader MD, Coddling C, Reichlin M: Differences in the fine specificity of anti-Ro (SS-A) in relation to the presence of other precipitating autoantibodies. *Arthritis Rheum.* 1989; 32: 1563-71.
214. Harley JB, Yamagata H, Reichlin M: Anti-La/SS-B antibody is present in some normal sera and is coincident with anti-Ro/SSA precipitins in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1984; 11: 309-14.
215. Yamagata H, Harley JB, Reichlin M: Molecular properties of the Ro/SSA antigen and enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of antibody. *J Clin Invest* 1984; 74: 625-33.
216. Hansen BU, Larsen P, Manthorpe R: SS-B/La antigen purification, and ELISA detection of antiSS-B/La antibodies in sera from patients with inflammatory connective tissue diseases. *Allergy* 1988; 43: 577-85.
217. Gordon TP, Greer M, Reynolds P, et al: Estimation of amounts of anti-La(SS-B) antibody directed against immunodominant epitopes of the La(SS-B) autoantigen. *Clin Exp Immunol* 1991; 85: 402-6.
218. Gharavi AE, Skopouli FN, Patel BM, et al: Rheumatoid factors in Ro (SSA) positive and Ro(SSA) negative rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Int.* 1986; 6: 61-2.
219. Mamula MJ, Fox OF, Yamagata H, et al: The Ro/SSA autoantigen as an immunogen. Some anti-Ro/SSA antibody binds IgG. *J. Exp. Med.* 1986; 86: 1889-901.



220. Lerner MR, Steitz JA: Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 5495-99.
221. Tzoufas AG, Moutsopoulos HM. Clinical significance of autoantibodies to Ro/SSA and La/SSB. *Manual of biological markers of disease. Col. C4.1.* Kluwer Academic Publishers, 1996; p: 1-14.
222. Reichlin M: Antibodies to RNA proteins in systemic lupus erythematosus: the significance of paired immune responses. In: "Molecular Autoimmunity" (N. Talal Ed), Academic Press, 1991, pp.51-63.
223. Smeenk R, Westgeest T, Swaak T: Antinuclear antibody determination: the present state of diagnostic and clinical relevance. *Scand J Rheumatol* 1985; (Suppl) 56: 78-92.
224. Chan EKL, Tan EM: Epitopic targets for autoantibodies in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. *Curr Opin Rheum* 1989; 1: 376-381.
225. Alexander EL, Hirsch TJ, Arnett FC, et al: Ro(SSA) and La(SSB) antibodies in the clinical spectrum of Sjogren's syndrome. *J. Rheumatol* 1982; 9: 239-246.
226. De Rooij DJ, Van de Putte LB, Habets WJ, et al: The use of immunoblotting to detect antibodies to nuclear and cytoplasmic antigens. *Scand J Rheum* 1988; 17: 353-64.
227. Hendrick JP, Wolin SL, Rinke J, et al: Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins: further characterization of the Ro and La small ribonucleoproteins from uninfected mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1981; 1: 1138-49.
228. Alspaugh MA, Buchanan WW, Whaley K: Precipitating antibodies to cellular antigens in Sjogren's syndrome, rheumatoid arthritis and other organ and non-organ specific autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 1978; 37: 244-6.
229. Maddison PJ, Skinner RP, Vlachoyiannopoulos P, et al: Antibodies to nRNP, Sm, Ro (SS-A) and La (SS-B) detected by ELISA: their specificity and interrelations in connective tissue disease sera. *Clin Exp Immunol* 1985; 62: 337-45.
230. Yamagata H, Akizuki M, Tojo T, et al: Anti-Ro/SS-A and La/SS-B antibodies in patients with connective tissue diseases. *Scand J Rheum* 1986; 61 (Suppl): 98-101.



231. Tan EM, Cohen AS, Fries JD, et al: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1271-77.
232. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-24.
233. Bunn CC, Gharavi AE, Hughes GRV: Antibodies to extractable nuclear antigens in 173 patients with DNA-binding positive SLE: an association between antibodies to RNP and Sm antigens observed by counterimmunoelectrophoresis. *J Clin Lab Immunol* 1982; 8: 13-8.
234. Craft J, Mimori T, Olsen TL, et al: The U2 small nuclear ribonucleoprotein particle as an autoantigen: analysis with sera from patients with overlap syndromes. *J Clin Invest* 1988; 81: 1716-24.
235. Pettersson J, Hinterberger M, Mimori T, et al: The structure of mammalian small nuclear ribonucleoproteins. *J Biol Chem* 1984; 259: 5907-14.
236. Habets WJ, De Rooij DJ, Hoet MH, et al: Quantitation of anti-RNP and anti-Sm antibodies in MCTD and SLE patients by immunoblotting. *Clin Exp Immunol* 1985; 59: 457-466.
237. Forman MS, Nakamura M, Mimori T, et al: Detection of antibodies to small nuclear ribonucleoproteins and small cytoplasmic ribonucleoproteins using unlabelled cell extracts. *Arthritis Rheum* 1985; 28: 1356-61.
238. Reichlin M, Rader M, Harley IB: Autoimmune response to the Ro(SSA) particle is directed to the human antigen. *Clin Exp Immunol* 1989; 76: 373-7.
239. Ben-Chetrit E, Fox RJ, Tan EM: Dissociation of immune responses to the SS-A (Ro) 52-kD and 60-kD polypeptides in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 349-55.
240. Itoh Y, Rader MD, Reichlin M: Heterogeneity of the Ro/SSA antigen and auto anti-Ro/SSA response: evidence of the four antigenically distinct forms. *Clin Exp Immunol* 1990; 81: 45-51.



241. StClair EW, Pisetsky DS, Reich CF, et al: Analysis of autoantibody binding to different regions of the human La antigen expressed in recombinant fusion proteins. *J Immunol* 1988; 141: 4173-80.
242. McNeillage LJ, Macmillan EM, Whittingham SF: Mapping of epitopes on the La(SSB) autoantigen of primary Sjogren's syndrome: identification of a cross-reactive epitope. *J Immunol* 1990; 145: 3829-35.

