

AUTOANTICOSSOS EN LES MALALTIES REUMÀTIQUES: CARACTERÍSTIQUES MOLECULARS DELS AUTOANTÍGENS

MONTSERRAT BACH i JAUME PALAU

Institut de Biologia de Barcelona del C.S.I.C. Barcelona.

SUMMARY

Patients suffering from rheumatic diseases may present autoantibodies in their sera as a characteristic of the disorder. The corresponding autoantigens are a group of macromolecules of the own organism.

The different autoantigens, which are known up to date, are reviewed, summarizing their biochemical and molecular properties, as well as their possible functions which have been described by different authors.

Key words: ANA/autoantibodies/Sm/SS-B/RNP.

ÍNDEX

I. INTRODUCCIÓ

II. AUTOANTICOSSOS EN LES MALALTIES REUMÀTIQUES I TÈCNiques DE DETECCIÓ

1. Immunofluorescència
 - 1.1. DNA i histones
 - 1.2. Antígens nuclears extraïbles en medi salí (ENA)
2. Immunodifusió (ID)
3. Contraimmunolectroforesi (CIE)
4. ELISA
5. Radioimmunoassaig
6. Immunoprecipitació i electroforesi en gels de poliacrilamida
7. Traducció *in vitro*
8. Transferència proteica a paper de nitrocel·lulosa

III. AUTOANTÍGENS EN LES MALALTIES REUMÀTIQUES

1. Àcids nuclèics i histones
 - 1.1. Àcid desoxirribonucleic
 - 1.2. Espècies moleculars amb reacció encreuada amb els anticossos anti-DNA
 - 1.3. Àcid ribonucleic (amb reacció amb els anticossos anti-RNA)
 - 1.4. Histones
2. Antígens nucleolars
3. Proteïnes nuclears no histones
 - 3.1. RANA (antigen nuclear associat amb l'Artritis reumatoide)
 - 3.2. Centròmer
 - 3.3. Scl-70 i Scl-86 (anti-esclerodèrmia 70 i 86 kDa)
 - 3.4. PCNA (antigen nuclear de cèl·lules en proliferació)

- 3.5. PM-1 (polimiositis-1)
- 3.6. Ku (nom del malalt inicial)
- 3.7. Mi-1 (miositis-1)
- 3.8. MU i TM
- 4. Ribonucleoproteïnes
 - 4.1. Jo-1 (nom del malalt inicial)
 - 4.2. Sistema sm/RNP
 - a. Component nucleic de les partícules Sm/RNP snRNP
 - b. Composició proteica de les partícules Sm/RNP snRNP
 - c. Funció biològica de les partícules Sm/RNP snRNP
 - 4.3. Sistema SS-A/SS-B
 - 4.3.1. La partícula antigènica SS-A
 - a. Component nucleic de l'antigen SS-A
 - b. Component proteic de l'antigen SS-A
 - c. Funció biològica de l'antigen SS-A
 - 4.3.2. La partícula antigènica SS-B
 - a. Component nucleic de l'antigen SS-B
 - b. Component proteic de l'antigen SS-B
 - c. Funció biològica de l'antigen SS-B
 - 4.3.3. Associació física de les partícules RNP corresponents a SS-A i SS-B

IV. CONCLUSIONS

SUMMARY

Patients suffering from rheumatic diseases may present autoantibodies in their sera as a characteristic of the disorder. The corresponding autoantigens are a group of macromolecules of the own organism.

The different autoantigens, which are known up to date, are reviewed, summarizing their biochemical and molecular properties, as well as their possible functions which have been described by different authors.

Key words:

ANA/autoantibodies/Sm/SS-B/RNP.

I. INTRODUCCIÓ

El sistema immunològic té la funció, extensament coneguda, de reconèixer agents estranys que puguin penetrar en l'organisme, al mateix temps que presenta mecanismes encarregats d'evitar que el sistema limfoide reconegui com a antigens els components propis. Quan aquest mecanisme falla, existeix la possibilitat que es produeixin autoanticossos, és a dir, anticossos que reaccionen contra estructures pròpies de l'organisme. Aquest fenomen és més probable com més vell és l'organisme. Les malalties autoimmunes comprenen els casos on es demostra que el procés autoimmune contribueix a la patogènia de la malaltia i no pas a les situacions on es formen autoanticossos aparentment innocus. Tot i així, la separació no és tan senzilla i cal deixar consignat que existeixen desordres on no està clarament definit el paper de l'autoimmunitat.

Moltes malalties de tipus reumàtic (ex: lupus eritematós disseminat, síndrome de Sjögren, connectivopatia mixta, artritis reumatoide, etc.) presenten característiques d'autoimmunitat, com poden ésser la detecció dels ANA (anticossos antinuclears) o dels anticossos anticitoplasma. Aquestes malalties tenen una gran importància ja que fan disminuir la qualitat de

vida d'un percentatge important de població, no tan sols per desordres en les articulacions i teixit connectiu en general, sinó perquè poden afectar una sèrie diversa d'òrgans (cervell, ronyó, etc.).

II. AUTOANTICOSSOS EN LES MALALTIES REUMÀTIQUES I TÈCNIQUES DE DETECCIÓ

El descobriment de l'existència en el sèrum de malalts reumàtics dels anomenats ANA (anticossos antinuclears) i dels anticossos contra estructures citoplasmàtiques, ha conduït a l'augment d'investigadors interessats en el tema, i que es podrien classificar en dos grups: d'una banda hi ha els biòlegs moleculars que han emprat els ANA com a eina per definir les estructures dels antígens corresponents i la seva funcionalitat; per una altra, tenim els immunòlegs clínics que mantenen l'interès centrat en conèixer la natura molecular dels autoantígens amb la finalitat d'elucidar l'especificitat dels ANA que permetria de classificar les malalties autoimmunes segons l'especificitat de l'anticòs trobat, i entendre els punts inicials i la immunopatologia del procés. A la Taula I es presenten les diverses especificitats d'ANA trobades juntament amb les malalties principalment associades. A continuació es descriuen els mètodes més emprats per a detectar els autoanticossos.

1. Immunofluorescència

La immunofluorescència és el mètode més emprat en clínica per detectar ANA i ENA (antígens nuclears extraïbles en medi salí), sobretot quan es troba un substrat idoni i les condicions apropiades (144). El mètode consisteix en la tinció d'una secció de teixit amb el sèrum del malalt i posteriorment amb un anti-anticòs:

1.1. DNA i histones

Els mètodes per detectar anticossos contra DNA i histones estan molt ben establerts. Una primera anàlisi es realitza per immunofluorescència indirecta sobre seccions de fetge de rata congelades o bé una preparació de línies cel·lulars en cultiu fixada amb acetona, com per ex. la línia HEp2, que s'adhereix molt bé als portaobjectes del microscopi pel fet de contenir un citoplasma abundant i un nucli en divisió. Quan el sèrum presenta anticossos contra DNA i/o histones, es detecta una tinció homogènia. Per tal d'esbrinar quina de les dues especificitats es troba en el sèrum, es realitza una segona anàlisi especificada per anti-DNA, amb radioimmunoassaig o immunofluorescència amb *Crithidia luciliae* (1), mentre que l'especificitat contra les histones es determina per immunofluorescència sobre un teixit lliure d'histones per tractament amb HCl 0,1N, i reconstituït amb histones purificades (41).

1.2. Antígens nuclears extraïbles en medi salí (ENA)

Els mètodes d'immunofluorescència per anticossos dirigits contra antígens nuclears extraïbles en medi salí (ENA) necessiten una preparació molt més acurada que en el cas anterior ja que la fixació inadequada de les cèl·lules sobre el portaobjectes pot provocar que els antígens nuclears passin al citoplasma, o bé que es perdin antígens de la cèl·lula, la qual cosa dóna lloc a interpretacions errònies de la tinció presentada (16, 142, 144).

La immunofluorescència pot presentar quatre models característics: homogeni, perifèric, clapat i nucleolar, que indiquen la presència o no d'ENA (en general el clapat és el més comú), però no permeten discernir l'especificitat present en el sèrum. A causa del gran nombre d'especifici-

tats descrites (veure Taula I), es fa evident la necessitat d'emprar tècniques més refinades que detectin quin és l'anticòs que es troba en el sèrum del malalt. Aquestes tècniques són les següents:

2. Immunodifusió (ID)

Permet de detectar els autoanticossos presents en el sèrum. Es basa en la precipitació dels complexos antigen-anticòs formats per difusió en gels d'agarosa entre el sèrum del malalt i un extret antigènic. Té el desavantatge que és necessari disposar constantment de sèrums control d'especificitat ja coneguda, i a més és una tècnica de baixa sensibilitat, però en canvi permet detectar de manera senzilla tots els sistemes antigen-anticòs (12, 144).

3. Contraimmunolectroforesi (CIE)

Permet detectar l'especificitat de l'anticòs d'una manera senzilla. Es basa en la precipitació dels complexos antigen-anticòs en gels d'agarosa per l'acció del corrent elèctric. És més sensible que no l'ID, però té dos desavantatges, que són la necessitat de disposar constantment de sèrums control d'especificitat ben establerta i el fet que només es detectin antigens àcids (71).

4. ELISA

És una tècnica laboriosa, però molt sensible en el cas de disposar d'anticossos monoclonals o bé de l'antigen purificat corresponent. Es basa en la detecció dels complexos antigen-anticòs en una fase sòlida (en general) mitjançant immunorevelat enzimàtic (134-150).

5. Radioimmunoassaig

És una tècnica laboriosa i sensible anàloga a l'ELISA, que fa necessari disposar d'extrets enriquits en l'antigen estudiat i d'un sèrum de malalt amb alt títol de l'especificitat en estudi. Es basa en la detecció mitjançant derivats radioactius bé de l'antigen o bé de l'anticòs (154).

6. Immunoprecipitació i electroforesi en gels de poliacrilamida

Permet de detectar acuradament (en el cas de les ribonucleoproteïnes) l'especificitat d'un sèrum referida als RNA petits o bé al contingut proteic que immunoprecipita per l'acció dels anticossos del malalt. És una tècnica senzilla si es disposa de línies cel·lulars en cultiu que es puguin marcar radioactivament *in vivo*, però justament això fa que sigui poc popular en anàlisi clínica (137).

7. Traducció *in vitro*

El mètode consisteix a traduir mRNAs en un sistema de traducció *in vitro* en presència d'aminoàcids marcats amb ^{35}S i immunoprecipitar els traduïts amb els sèrums estudiats. Els immunoprecipitats presenten polipèptids característics de l'especificitat del sèrum. Aquest mètode no és massa popular ja que és costós i lent, però és una tècnica bàsica en laboratoris de recerca on s'estudiï el clonatge dels DNA codificadors dels polipèptids de l'antigen (37).

8. Transferència proteica a paper de nitrocel·lulosa

La transferència proteica a paper de nitrocel·lulosa és una tècnica molt recent que

TAULA I
Autoanticossos contra antígens cel·lulars descrits en malalties reumàtiques

<i>Autoanticossos reactius amb</i>	<i>Malalties reumàtiques (%)</i>	<i>Ref.</i>
<i>DNA, histones, HMGs i RNA</i>		
DNA de cadena doble i simple	LED-alt títol (100 %) baix títol en altres malalties	(105)
DNA de cadena simple (purines i pirimidines)	LED, altres malalties autoimmunes i algunes no autoimmunes	(67)
DNA Z (conformació levògira)	LED	(131)
Histones (H1, H2A, H2B, H3, H4)	LED induït per drogues (més del 95 %) LED (30 %) Artritis Reumatoide (20 %)	(41,144)
HMG	LED (45 %) MCTD (18 %)	(18)
RNA	LED (40-60 %)	(31,70)
<i>Ribonucleoproteïnes</i>		
(U1) RNP (Mo)	MCTD (100 %) baixa freqüència en LED, Lupus vulgar i Esclerodèrmia	(128)
Sm	LED (35 %)	(105,141)
SS-A (Ro)	Síndrome de Sjögren primari (70 %), LED (30 %)	(5,24)
SS-B (La o Ha)	Síndrome de Sjögren primari (70 %)	(91)
Jo-1	Polimiositis (30 %)	(104)
To	Esclerodèrmia	(115)
<i>Antígens nucleolars</i>		
4S-6S nucleolar RNA	Esclerodèrmia	(111,122,144)
Altres RNA i RNP nucleolars	Esclerodèrmia	(111,122,144)
<i>Proteïnes nuclears no histones</i>		
Antigen nuclear associat amb l'Artritis Reumatoide (RANA)	Artritis Reumatoide (95 %)	(7,11)
Centròmer	Esclerodèrmia CREST (superior al 70 %)	(25,42,143)
Scl-70	Esclerodèrmia (20 %)	(29,42,47,50)
Antigen nuclear de cèl·lules en proliferació (PCNA)	LED (superior al 5 %)	(97,140)
PM1	Polimiositis (64 %) Superposició de Polimiositis/Esclerodèrmia (87 %)	(144,159)
Ku	Superposició de Polimiositis i Esclerodèrmia	(95)
Mi-1 i Mi-2	Dermatomiositis	(103,116,145)
Ma	LED (20 %)	(158)
<i>Altres</i>		
Ga, OK, Si, VLS, fus, SL, MU i TM, etc	LED i altres malalties autoimmunes	(4,98,100,144)

Abreviatures: LED-Lupus Eritematós Disseminat i MCTD-Connectivopatia Mixta.

comença a ésser molt popular en laboratoris de recerca i en clínica. Es fonamenta en la detecció dels polipèptids que porten els determinants antigènics a sobre d'una ma-

triu de nitrocel·lulosa, mitjançant incubacions amb el sèrum del malalt reumàtic i immunorevelat enzimàtic o radioactiu. El pes molecular del polipèptid antigènic així

com el de les seves possibles degradacions són una empremta dactilar de l'especificitat que es troba en el sèrum del malalt. El mètode també permet de discernir en un sol assaig dues o tres especificitats diferents en el sèrum (30, 101).

III. AUTOANTÍGENS EN LES MALALTIES REUMÀTIQUES

Donat que aquesta revisió té una connotació molecular, es descriuran les característiques moleculars i bioquímiques fins ara conegudes dels autoantígens detallats a la Taula I. La recopilació es realitza més extensivament pels casos dels sistemes Sm, RNP i SS-B a causa de la importància que pot tenir la funció biològica d'aquests antígens.

1. Àcids nucleics i histones

1.1. Àcid desoxiribonucleic

Els DNA considerats com antígens es classifiquen generalment en DNA natiu (doble cadena) i en DNA desnaturalitzat (cadena simple). En els sèrums de malalts de LE_D es poden detectar diverses poblacions d'anticossos anti-DNA. El DNA pot presentar diferents classes de determinants antigènics que poden ésser descrits (135, 139) en funció dels determinants estructurals del DNA:

a) Determinants de DNA natiu que no es troben en l'esquelet de sucre-fosfat. En aquest cas l'anti-DNA natiu corresponent no reacciona amb DNA de cadena simple.

b) Determinants deguts a l'estructura conformacional desoxiribosa-fosfat.

Aquests determinants són reconeguts per anti-DNA natiu. Es tracta d'anticossos que poden reconèixer també zones helicoidals del DNA de cadena simple. Aquests anticossos reaccionen també amb fosfolípids.

c) Determinants en el DNA de cadena simple que també s'expressen dèbilment en DNA natiu. Són anticossos també reactius amb mononucleòtids i fosfolípids.

d) Determinants dependents de bases en el DNA de cadena simple, reactius també amb mononucleòtids i mononucleòsids, però no amb els anti-DNA de doble cadena ja que les bases es troben inaccessibles.

e) Determinants en el DNA de cadena simple, que s'expressen dèbilment en el DNA natiu. Aquests anticossos també reaccionen amb RNA, amb alguns mononucleòtids i mononucleòsids, i amb filaments del citoesquelet.

f) Determinants exposats en l'estructura Z del DNA de doble cadena (131).

1.2. Espècies moleculars amb reacció encreuada amb els anticossos anti-DNA

S'ha demostrat l'existència de reaccions encreuades dels anticossos anti-DNA (9, 35, 43, 74, 131). També s'ha descrit que alguns autoanticossos anti-DNA monoclonals de malalts de lupus i de ratolins autoimmunes reaccionen alhora amb DNA i cardiolipina (74, 131). Alguns anti-DNA monoclonals de ratolí poden reaccionar de forma encreuada amb proteïnes del citoesquelet com és ara la vimentina (9). Aquestes reaccions encreuades suggereixen que els àcids nucleics, els fosfolípids i la vimentina comparteixen epitops comuns. En el cas dels fosfolípids aquest epitop és probablement una estructura que conté fosfodiester fosfat (131), però en el cas de la vimentina aquest epitop és desconegut (9). S'han descrit també altres reaccions encreuades que s'enumeren conjuntament amb les formulades:

a) RNA (35) i hnRNA (43).

b) Fosfolípids (ex: cardiolipina, 74, 131). La reactivitat encreuada es deu als grups fosfodiester fosfat, que mimetitzen l'esquelet sucre-fosfat del DNA (35).

c) Glucosaminoglicans (ex: sulfat d'heparan). S'ha suggerit (35) que la reactivitat encreuada té lloc perquè aquestes molècules contenen grups carregats negativament que es repeteixen (com en el cas del DNA).

d) Estructures polianióniques (ex: sulfat de dextrà, 35).

e) Estructures en les superfícies cel·lulars (ex: cèl·lules Raji, T i B). Els autors suggereixen la intervenció dels fosfolípids de les membranes (35).

Hi ha autors que suggereixen que les poblacions d'anticossos monoclonals que donen reaccions encreuades són de baixa afinitat (132).

1.3. Àcid ribonucleic (amb reacció amb els anticossos anti-RNA)

No es coneix massa sobre l'estructura dels determinants antigènics en el RNA. S'ha descrit que els anticossos anti-RNA tenen especificitat per seqüències G, C i G, C, U (31).

1.4. Histones

S'ha descrit una forta freqüència d'anticossos anti-histones associada amb el LED (41, 144). S'ha descobert (53) que aquests anticossos reaccionen contra les histones H1 i H2B purificades, i més concretament contra determinants en la zona N-terminal (residus 1-59) de la histona H2B i la zona C-terminal de la histona H1 (residus 106-217). Altres autors han demostrat que els anticossos contra histones no reaccionen amb els pèptids límit obtinguts per tractament de les histones totals amb proteases (44). Estudis de la reacció d'aquests anticossos contra el nucleosoma, han posat en evidència que els anticossos reaccionen amb la zona N-terminal de les histones del nucleosoma i amb la zona C-terminal de

les histones H2A i H3. Com que aquestes últimes zones no són massa antigèniques quan s'empren les histones purificades com immunògens, se suggereix que els immunògens actius en el LED puguin més aviat ésser les histones unides a cromatina que no les histones lliures (147).

2. Antígens nucleolars

De les característiques d'aquests antígens de localització nucleolar no se'n sap massa. Un d'ells ha estat descrit com un RNA de baix pes molecular, entre 4-5S, on l'activitat antigènica és destruïda per l'acció de la fosfodiesterasa de melsa (111).

3. Proteïnes nuclears no histones

3.1. RANA (antigen nuclear associat amb l'Artritis Reumatoide)

Un percentatge important de malalts amb Artritis Reumatoide tenen els anticossos anomenats anti-RNA. L'antigen RANA s'ha descrit, per transferència proteica a paper de nitrocel·lulosa en cèl·lules Wil 2 i emprant sèrums anti-RNA, com una proteïna de 80 kDa; és, a més a més, termoestable i unidora de DNA. S'ha suggerit l'associació de la presència de l'antigen RANA amb una infecció anterior amb el virus Epstein-Barr, i, fins i tot, que el RNA sigui un dels antígens que s'expressen com a conseqüència de la infecció (11).

3.2. Centròmer

Els sèrums anti-centròmer es detecten en un percentatge elevat de malalts que pateixen la malaltia d'esclerodèrmia CREST.

L'antigen contra el qual reacciona el sèrum del malalt es troba principalment en el centriol. Ha estat detectat, per estudis

d'immunoprecipitació i per transferència proteica a papers de nitrocel·lulosa, que aquests sèrums poden reaccionar amb proteïnes de 14, 20, 23 i 34 kDa de nuclis i cromosomes de cèl·lules HeLa. Aquests polipèptids, gràcies al seu pI àcid es diferencien molt bé de les proteïnes presents en la cromatina (25, 47, 50).

3.3. *Scl-70 i Scl-86 (anti-esclerodèrmia 70 i 86 kDa)*

L'antigen Scl-70 és reconegut per un 20 % de sèrums de malalts d'Esclerodèrmia. Aquest antigen és una proteïna bàsica de 70 kDa (29). Alguns autors han descrit (50) que tots els sèrums classificats com anti-Scl-70 per immunodifusió, reaccionen amb un polipèptid de 86 kDa per transferència proteica a papers de nitrocel·lulosa, la qual cosa suggereix que la proteïna de 70 kDa pot ser una degradació de la de 86 kDa. Altres treballs han descrit fins i tot un pes molecular superior, de 95 kDa (47). Recentment s'ha demostrat que l'antigen Scl-70 és l'enzim nuclear DNA-Topoisomerasa I (130).

3.4. *PCNA (antigen nuclear de cèl·lules en proliferació)*

Ha estat demostrada, en un petit percentatge de pacients de LED, la presència d'autoanticossos contra un antigen nuclear de cèl·lules en proliferació (PCNA). Es tracta d'un antigen que no es detecta per immunofluorescència en cèl·lules diferenciades o en estat de repòs (com per ex: les cèl·lules glomerulars), però sí que es detecta en cultius cel·lulars continus (com pot ser el cas de les cèl·lules Wi1 2).

L'antigen, que s'ha purificat a partir del timus de conill, ha permès d'obtenir un polipèptid de 33 kDa que, per la tècnica de transferència proteica a papers de nitroce-

lulosa s'ha vist que és antigènic. L'antigenicitat és destruïda per l'acció de proteases però no per RNasa o DNasa. L'antigen, després de filtració en gel i ultracentrifugació en gradient de sacarosa té un pes molecular de 100 kDa, la qual cosa suggereix que possiblement es troba associat a altres proteïnes o a RNA petits (140).

3.5. *PM-1 (polimiositis-1)*

En un percentatge elevat de malalts amb polimiositis s'han trobat anticossos contra l'antigen PM-1. Aquest antigen s'ha descrit, en extret nuclear de timus de vedella, com a resistent a RNasa, DNasa i tractament a 37 °C durant 6 h, i en canvi sensible a la tripsina i al tractament tèrmic durant 1 h a 56 °C, dades que fan pensar que el determinant antigènic es troba en una proteïna (159).

3.6. *Ku (nom del malalt inicial)*

Els anticossos anti-Ku es detecten en un percentatge elevat de malalts amb superposició d'esclerodèrmia/polimiositis. L'antigen Ku de timus de vedella, que té un pes molecular de 300 kDa per filtració en gel i ultracentrifugació en gradients de sacarosa, és resistent a l'acció de la RNasa i DNasa, però és sensible a la tripsina i la temperatura (95).

3.7. *Mi-1 (miositis-1)*

L'antigen Mi-1 és una proteïna bàsica no histona que és reactiva contra sèrums de malalts de dermatomiositis. Mi-1 comparteix certes característiques d'immunoglobulina, inclosa l'habilitat de reaccionar amb anti-immunoglobulina bovina de conill, però s'ha demostrat que no es tracta del factor reumatoide (145).

3.8. MU i TM

Aquests dos antígens han estat descrits en un petit percentatge de pacients amb diverses malalties del teixit connectiu. L'antigen MU és sensible a la digestió amb RNasa i tripsina, i es detecta en el nucleol, porció extranucleolar del nucli i en el citoplasma. L'antigen TM és resistent a la digestió amb RNasa i tripsina i es localitza en el nucleol i porció extranucleolar del nucli (98).

4. Ribonucleoproteïnes

En aquest apartat es ressenyen autoantígens que han estat descrits com a complexos de RNA petits i proteïnes.

4.1. Jo-1 (nom del malalt inicial)

S'ha demostrat que un 30 % de malalts de poliomiiositis tenen anticossos anti-Jo-1. Jo-1 és una ribonucleoproteïna citoplasmàtica formada per (tRNA^{his}) i almenys un polipèptid antigènic de 50-54 kDa de punt isoelèctric neutre-bàsic. S'ha identificat que el component proteic de la ribonucleoproteïna és la histidil-tRNA sintetasa (34, 86, 124).

També s'han descrit, en un percentatge baix de malalts de miositis, anticossos contra les aminoacil-sintetases de la treonina (5 %) i l'alanina (1 %), anomenats anti-PL-7 i anti-PL-12 respectivament (50).

4.2. Sistema sm/RNP (Sm és el nom del malalt i RNP significa ribonucleoproteïna)

El sistema Sm/RNP és un dels més estudiats i conegut a causa del percentatge elevat de sèrums que contenen els autoanticossos contra els antígens Sm i RNP, i de

la possible implicació biològica dels antígens en el mecanisme de "splicing" (escissió dels introns) dels pre-mRNA.

Mitjançant estudis d'immunoprecipitació es va posar en evidència que els autoanticossos anti-RNP precipiten ribonucleoproteïnes nuclears (partícules snRNP) que contenen el RNA nuclear petit U1 (U1-snRNA), i que els anticossos anti-Sm immunoprecipiten partícules snRNPs que contenen els snRNAs U1, U2, U4, U5 i U6 (76). Una dada experimental important és que els autoanticossos contra RNP i Sm no precipiten els snRNA si s'extreuen les proteïnes dels extrems cel·lulars mitjançant fenolitzacions (76), la qual cosa suggereix que l'antigenicitat roman o bé que requereix la presència dels components proteics de la partícula snRNP. Els mateixos autors demostraren que la partícula U1-snRNP conté determinants antigènics tant per a anticossos anti-Sm com per als anti-RNP, i que les partícules U2, U4, U5 i U6-snRNP només en tenen per als anti-Sm, la qual cosa permet de concloure que l'antigen RNP és un subgrup de l'antigen Sm. Els autoanticossos anti-Sm i anti-RNP immunoprecipiten quantitativament les partícules U-snRNP respectives, la qual cosa demostra que els corresponents snRNAs es troben sempre en forma de partícula snRNP (76).

a. Component nucleic de les partícules Sm/RNP snRNP

Els U-snRNA tenen una grandària d'entre 100-200 nucleòtids. Són molt abundants en el nucli (1×10^5 - 10^6 còpies per cèl·lula), i contenen un gran nombre de residus d'uridina. El snRNA U3 té una localització nucleolar mentre que els altres U-snRNA són nucleoplasmàtics. Tots sis presenten una estructura de caperó ("cap") a l'extrem 5', els U1-U5 contenen un caperó de trimetilguanosa ($m_3, 2, 2, 7g$) i l'U6

en té un altre de diferent no descrit fins ara (17). Tots els snRNA són transcrits de la RNA polimerasa II. S'han trobat associacions entre els U1-U5 snRNA amb l'àcid ribonucleic nuclear d'alt pes molecular (hnRNA) i de l'U6-snRNA amb els grànuls pericromatínics (17, 36, 133, 166). Els snRNA U4 i U6 estan organitzats en un mateix complex snRNP (15, 57), i es troben aparellats per algunes bases en la partícula U4/U6 RNP (120).

Estudis de clons de DNA d'un nombre de gens dels U-snRNA indiquen que les seqüències codificadores per a les espècies U estan disperses en el genoma de mamífers (91). Dintre d'aquests locus genòmics hi trobem gens veritables i pseudogens. Els pseudogens es defineixen com els gens de DNA que són similars però no idèntics, amb la seqüència corresponent al U-snRNA (93). S'han identificat pocs gens veritables en base a la correspondència entre les seqüències de RNA i DNA i transcripció en nuclis d'oòcits de *Xenopus* per a produir U1-RNA madur. La relació entre pseudogens i gens veritables és aproximadament de 10:1 per l'U1 i l'U2 (91).

Els gens dels U-snRNA són transcrits de la RNA polimerasa II, però difereixen d'altres gens transcrits pel mateix enzim pel fet que no presenten introns; no hi ha certesa sobre la presència de la caixa "TATA" en aquests gens; el gen de l'U1 no conté el senyal de poliadenilació i fins ara hi ha molts dubtes sobre la manera com es transcriuen els U-snRNA (91).

Els estudis sobre els llocs d'unió de les proteïnes de les partícules snRNP als corresponents U-snRNA demostren que les proteïnes nucli (core) de les partícules snRNPs (D, E, F, i G segons s'indica en el paràgraf següent) protegeixen una seqüència de 23 a 35 nucleòtids de cadascun dels snRNA U1, U2, U4 i U5 d'ésser digerida per nucleasa. En tots els casos la zona protegida correspon a un element estructural molt conservat que es troba en aquests

snRNA. Aquest element consisteix en una seqüència A(U)_nG (on n=3-6), anomenada domini A, que conté una zona de cadena simple de l'U-snRNA. Aquesta seqüència primària s'ha proposat com la zona inicial on interaccionen les proteïnes nucli components de les partícules snRNP (81).

b. Composició proteica de les partícules Sm/RNP snRNP

Tal com s'ha comentat anteriorment, els snRNA U1, U2, U4-U6 es troben associats a un conjunt molt similar de proteïnes en forma de partícules snRNP. Cada snRNA es troba en una partícula discreta separada, exceptuant els U4/U6 que es localitzen en la mateixa partícula snRNP (76, 77, 120, 133, 153) i, les proteïnes són les que contenen els determinants antigènics (76).

Diversos estudis han posat de manifest que aquests autoanticossos reaccionen contra un nombre de proteïnes associades amb U1, U2, U5, U4/U6 (revisions 90, 138, 160). Aquests resultats s'esquematitzen a la taula II. Dos estudis corresponents a extrems marcats amb ³⁵S-metionina o ³H-leucina que foren immunoprecipitats amb autoanticossos, demostraren que els anticossos contra l'antigen RNP reconeixen les partícules U1-RNP que contenen el snRNA U1 associat amb set (76) o vuit (65) proteïnes de pesos moleculars aproximats entre 8-35 kDa (veure Taula II), mentre que els anticossos contra Sm reconeixen partícules snRNP que contenen U1, U2, U5, U4/U6 snRNA. Altres estudis de transferència proteica a paper de nitrocel·lulosa, han posat de manifest que el complex U1-snRNP conté una proteïna antigènica de 68 kDa (revisió 30, 49, 51, 91, 101, 118), la qual no sempre es detecta per immunoprecipitació (veure Taula II). Els polipeptíds obtinguts per cromatografies d'immunoafinitat, emprant anticossos contra el contingut nucleic, han posat de

TAULA II
Pesos moleculars de les proteïnes dels antígens RNP i Sm

Mètode	Pes molecular (kDa)	Ref.
<i>Immunoprecipitació amb</i>		
anti-(U1)RNP, Sm	33; 28; 22; 16; 13; 12; 11	(76)
anti-(U1)RNP	30; 23; 21,5; 17,5; 12,3; 10,2; 9,1; 8,5	(65)
anti-Sm	27; més totes les proteïnes reconegudes per anti-(U1)RNP	(65)
<i>Purificacions bioquímiques</i>		
Cromatografia d'afinitat amb anti-2,2,7-trimetilguanosina	75; 34; 32; 21; 16; 13; 12; 10	(14)
Cromatografia de filtració en gel i bescanvi iònic	68; 33; 28; 22; 16; 13; 12; 11	(118,160)
Cromatografia de bescanvi iònic	67; 30; 23; 21,5; 17,5; 12,3; 10,2; 9,1; 8,5	(66)

manifest un conjunt de proteïnes similar a l'obtingut amb els anticossos ANA (ref. 14 de la Taula II).

S'ha aconseguit purificar les partícules snRNP U1 i U2 per mitjans no immunològics desnaturalitzants, com és la filtració en gel, cromatografies de bescanvi iònic o columnes d'immunoafinitat contenint anticossos anti-m₃ G (14, 66, 118, 160 i Taula III). Els pesos moleculars de les proteïnes associades que es troben en aquests purificats es correlacionen amb els detectats inicialment per immunoprecipitació amb sèrums anti-Sm i anti-RNP a partir d'extrets nuclears crus (comparar Taules II

i III). Així l'anàlisi de les partícules U-snRNP, tant per mètodes immunològics com bioquímics, ha posat en evidència que contenen proteïnes comunes a totes les partícules snRNP i específiques de cadascuna; a més a més, la purificació de les partícules Sm-snRNPs (160) ha posat en relleu quines de les proteïnes porten els determinants antigènics reactius amb els sèrums anti-RNP (138).

Les proteïnes de la partícula U1-snRNP s'han classificat (66, 118, 160) segons el pes molecular: 70 kDa (70 kDa); A(34 kDa); B'(28 kDa); B(27 kDa); C(22 kDa); D(16 kDa); E(13 kDa); F(12 kDa) i

TAULA III
Proteïnes associades amb les RNPs U1 i U2

Específiques de la U1 RNP PM (kDa)	Ref.	Comunes a les RNP U1 i U2 PM (kDa)	Ref.	Específiques de U2 RNP PM (kDa)	Ref.
75/70/68/67	(14) (51,49,118) (65, 76, 138, 110, 163) (66)	23; 21,5	(65,66)	32/27	(96,160) (65,66)
34/33; 29/32/30/28	(49, 51, 118, 110) (160) (155) (65, 66) (14)	12,3; 10,2; 9,1; 8,5	(65,66)		
23; 22/22/21,5; 17,5	(51, 118, 138, 49, 110) (160) (14,65 49, 66, 110)	28; 16; 13; 12; 11	(160)		

Els pesos moleculars entre barres (/) corresponen a les cites entre parèntesi.

G(11 kDa), essent les de 70 kDa i A específiques de la partícula U1-snRNP mentre que les altres es poden trobar en totes les partícules U-snRNP (veure Taula III). S'ha descrit que les proteïnes, B, B' són comunes a totes les partícules snRNP (118). En una anàlisi per transferència proteica a paper de nitrocel·lulosa, emprant 30 sèrums anti-Sm i anti-RNP, es demostrà que els anti-U1(RNP) reaccionen primàriament amb una o més de les proteïnes úniques de la partícula U1-snRNP de la Taula III, mentre que els anti-Sm reconeixen proteïnes comunes a totes les partícules snRNP (138). En alguns casos, anticossos monoclonals anti-Sm (80) reaccionen amb més d'un component proteic de la U1 o de les altres partícules Sm-snRNP, suggerint que algunes proteïnes de les partícules snRNP poden estar immunològicament relacionades (138).

c. *Funció biològica de les partícules Sm/RNP snRNP*

Les partícules U-snRNP (U1, U2, U4/U6 i U5) es troben en el nucleoplasma i s'ha suggerit que poden intervenir en el procés de maduració del mRNA (77). Quan un gen de mamífer és transcrit a pre-mRNA en el nucli, aquesta molècula és molt més llarga que no el producte mRNA final, i en conjunt aquests precursors són anomenats hnRNA o bé partícules hnRNP quan es troben complexats a proteïnes. El pre-mRNA conté diversos segments de seqüència no codificadora de proteïnes, anomenats introns o seqüències IVS, que han d'ésser separades mitjançant el mecanisme anomenat "splicing", durant els passos que donen lloc al mRNA (revisió 102). El mecanisme de "splicing" ha d'ésser molt precís per a preservar l'activitat biològica del pre-mRNA. Les zones 5' i 3' dels exons-introns presenten seqüències

conservades que, en part, indiquen l'especificitat per la reacció de "splicing" (13, 129). S'ha suggerit la intervenció dels U-snRNA en el processament de l'hnRNA, hipòtesi que ha estat recolzada per una sèrie d'evidències experimentals:

a) existeix una complementarietat de bases entre la seqüència del terminal 5' i 3' dels exons-introns amb els terminals 5' i 3' del U1-snRNA (77).

b) les partícules U1-snRNP que no contenen la seqüència 5' de la partícula U1-snRNA no s'associen amb les partícules hnRNP (77).

c) el "splicing" de l'hnRNA d'adenovirus en nuclis de cèl·lules HeLa és inhibït pels anticossos anti-Sm i anti-RNP (165).

d) el complex U1-snRNP s'uneix selectivament al terminal 5' de l'exó-intró (94).

e) els U-snRNA es troben associats en les cèl·lules amb estructures com la matriu nuclear i partícules hnRNP, llocs on es creu que es porta a terme el processament del pre-mRNA (117).

f) s'ha descrit la complementarietat entre el U2-snRNA i zones properes a la unió exó-intró dels pre-mRNA (106).

g) l'U2-snRNA es pot aïllar entrecreuat amb l'hnRNA, suggerint que algunes seqüències de l'U2-RNA es poden aparellar amb l'hnRNA (19).

h) s'ha trobat complementarietat d'unes seqüències del U4-snRNA amb la seqüència senyal de poliadenilació (10).

i) s'ha demostrat que l'U1 i U2 són necessaris per al mecanisme de "splicing" del pre-mRNA *in vitro* (69).

j) s'ha suggerit que la partícula U5-snRNA pot unir-se a la zona 3' de l'intró (20).

4.3. *Sistema SS-A/SS-B*

El 1969 Clark i col. van descriure per primera vegada els anticossos anti-Ro (24), emprant extrems antigènics de melsa huma-

na. Posteriorment MATTIOLI i col. (1974) van publicar l'existència de malalts que presentaven en llurs sèrums uns anticossos, diferents dels anti-Ro, anomenats anti-La (89), que reaccionen amb extrems de timus de vedella. Dos anys després, el 1976, ALSPAUGH i col. (5) van fer notar que un percentatge de malalts que patien síndrome de Sjögren presentaven reacció immunològica contra extrems de cèl·lules humanes Wi12. Aquests autors van trobar tres sistemes diferents d'antigen-anticòs que van anomenar SS-A, SS-B i SS-C (SS per la malaltia). Al principi es va creure que els sistemes SS-A/SS-B i Ro/La eren diferents ja que presentaven característiques distintes de sensibilitat a temperatura i a tractaments enzimàtics, com per exemple que l'antigen Ro de melsa humana no és sensible a la tripsina mentre que l'SS-A de cèl·lules Wi12 sí que ho és, o que l'enzim RNasa inactiva l'antigen. La de timus de vedella però no l'antigen SS-B detectable en cèl·lules Wi12 (5, 24, 89). Una col·laboració entre laboratoris demostrà que l'SS-B és immunològicament idèntic a La o HA i que l'SS-A és idèntic al Ro (6, 113). Segons les característiques descrites pel SS-B i SS-A es creu que són idèntics al sistema SjT/SjD respectivament descrit el 1961 per ANDERSON i col. (8).

Tal com s'ha posat en evidència a la Taula I, els anticossos anti-SS-B es troben

en un 70 % de malalts de síndrome de Sjögren (91) i els anti-SS-A es troben en un 70 % en la mateixa malaltia i en un 30 % de malalts de lupus (5, 24). Hi ha moltes evidències que suggereixen que la majoria d'aquests sèrums contenen anticossos contra els dos antígens alhora (54, 89).

4.3.1. La partícula antigènica SS-A

L'antigen SS-A s'ha observat principalment en el citoplasma de les cèl·lules (24, 58), encara que també s'ha descrit com un antigen nuclear (55).

Diversos estudis d'immunoprecipitació posaren de manifest que els anticossos anti-SS-A reaccionen contra ribonucleoproteïnes formades per RNA citoplasmàtics petits (58, 79), la qual cosa permeté justificar que fos classificat com una partícula scRNP (ribonucleoproteïna citoplasmàtica petita).

L'antigen SS-A s'estudia en general en extrems totals o citoplasmàtics de teixits, i cal assenyalar que la melsa i les cèl·lules Wi12 humanes són bones fonts antigèniques (veure Taules IV i V). Diversos experiments sobre sensibilitat han demostrat que, des del punt de vista immunològic, l'antigen no és sensible, pràcticament en tots els casos descrits, a RNasa, DNasa o tripsina, ni tampoc a la temperatura (veure

TAULA IV
Sensibilitat de l'antigen SS-A a la temperatura i tractaments enzimàtics

Font	Tipus d'extrets		Tripsina	DNasa	RNasa	37 °C	56 °C	Altres	Ref.
	total	citoplasmàtic							
MH		+	NS	NS	NS	NS	30° a 50 °C	PMB Periodat	(24)
MH	+		NS	-	-	-	-	-	(34)
MH	+		NS	-	NS	-	NS (30°)	-	(151)
MH i Wi12	+		S	NS	NS	-	NS (30°)	-	(126)
Wi12	+		NS	NS	NS	NS	NS	-	(5)

Abreviatures: MH-melsa humana; Wi12-cèl·lules humanes en cultiu; NS-no sensible; S-sensible; ' - ', no determinat i PMB-parahidroximercuribenzoat.

Taula IV). Per tal d'estudiar l'antigen SS-A es preparen usualment extrems antigènics de teixit total sonicat en un tampó salí (com el PBS), els quals es clarifiquen per ultracentrifugació, i es purifiquen per diversos mètodes (5, 27, 82, 126, 151).

S'ha descrit que l'antigen SS-A té un pes molecular entre 100-150 kDa, per filtració en gel, en el cas de melsa humana (24), 154 kDa en el cas de cèl·lules Wi12 (126) i 100 kDa en el cas de timus de vedella (164). La grandària de la partícula és 7S en el cas de cèl·lules HeLa i de 9S en el cas de melsa humana (33, 162). El pI de la partícula oscil·la entre 4,3-6,2 (veure Taula V) segons els extrems.

S'ha demostrat que els scRNA SS-A d'extrems fenolitzats no són immunoprecipitats pels sèrums anti-SS-A, la qual cosa suggereix que els anticossos reconeixen determinants antigènics de la part proteica de la partícula scRNP (79).

a. Component nucleic de l'antigen SS-A

Els scRNA que són immunoprecipitats pels sèrums anti-SS-A no són tan conservats com els U-snRNA i poden variar en un nombre de 2-5 molècules diferents dependent de les espècies de mamífers (58). S'han descrit 5 SS-A RNA anomenats

hY1-hY5 (h per humà i Y per citoplasmàtic) en les partícules snRNP SS-A de cèl·lules HeLa (58, 160) i s'ha demostrat que l'hY2 deriva de l'hY1 (160); les cèl·lules de ratolí contenen només dos SS-A RNA, mY1 i mY2 (58, 160) i les cèl·lules de rata en tenen tres, rY1a, rY1b i rY2 (115). Els RNA SS-A varien en grandària entre 80-110 nucleòtids i s'hi troben entre $1-5 \times 10^5$ molècules de cadascun per cèl·lula (58).

Els gens dels RNA SS-A es transcriuen catalitzats per la RNA polimerasa III i es troben presents només en còpia única (160); són, doncs, un exemple de gens de mamífers únics que no codifiquen per proteïnes.

WOLIN i STEITZ van descriure que el RNA hY3, tret de l'extrem 3', no pot ésser precipitat pels anticossos anti-SS-A (160). Estudis posteriors dels mateixos autors posaren de manifest que les zones terminals 3' i 5' dels RNA hY1, hY3 i hY5 es troben protegides, en els immunoprecipitats de la digestió amb nucleasa. En les estructures secundàries proposades per aquests tres RNA s'ha descrit que els extrems 5' i 3' es troben aparellats entre ells per les bases, la qual cosa suggereix que aquesta zona és essencial per a la unió dels anticossos anti-SS-A, i per tant correspon a la zona d'unió de la proteïna de l'SS-A (161, 162).

TAULA V
Pesos moleculars i pI de l'antigen SS-A

Font	Tècnica	PM (kDa)	pI IEF/urea	Pi IEF/natiu	Ref.
Wi1 2	tppn	48	—	(polip. sol) 4,7	(83)
Wi1 2	Ipp ³⁵ S ³² P	43	—	—	(27)
Wi1 2	tppn	61	—	4,7	(82)
Wi1 2	tppn	60	—	—	(28)
MH	tppn	55	—	4,4	(151)
MH	tppn	57	bàsic	—	(34)
MH	tppn	57,50	—	4,3-5,5	(33)
MH	tppn	—	—	6,2	(68)
HeLa	tppn	59	—	—	(50)
HeLa	Ipp ³⁵ S	90,94	—	—	(39)

Abreviatures: PM- pes molecular; IEF- electroenfoq; tppn-transferència proteica a paper de nitrocel·lulosa; Ipp-immunoprecipitació; '—', no determinat Wi12 i HeLa són cèl·lules humanes en cultiu i MH- melsa humana.

b. Component proteic de l'antigen SS-A

El component proteic de l'antigen SS-A s'ha descrit en diversos teixits com una proteïna antigènica entre 43-94 kDa (més usualment al voltant de 60 kDa). Els diferents valors que es troben a la bibliografia es resumeixen a la Taula V. El complex SS-A té un pI àcid, mentre que el component proteic (almenys un polipèptid) té un pI bàsic (veure Taula V).

c. Funció biològica de l'antigen SS-A

Encara que la funció de les partícules scRNP SS-A no es coneix, s'ha suggerit que podrien tenir un paper en els processos relacionats amb la traducció. S'ha demostrat en humans, emprant gens clonats dels scRNAs SS-A, que les partícules snRNP SS-A són 10 vegades més abundants en el cervell i cor que no en el fetge. D'acord amb aquests experiments, es pot suggerir que l'antigen SS-A té un paper en la traducció d'un grup d'mRNA abundants en cor i cervell (162). És també rellevant que la presència d'anticossos anti-SS-A es pot correlacionar amb el lupus neonatal (38, 64, 152). En aquests estudis s'han trobat anticossos anti-SS-A en infants amb lupus neonatal, que són transferits per la mare via placenta que és en realitat el lloc on es produeixen. En aquests experiments

s'observà una correlació entre la incidència de bloqueig cardíac complet en aquests infants i la presència d'anticossos anti-SS-A (75, 127). Una predicció que explicaria aquesta correlació és que les cèl·lules del de nòdul atrioventricular, almenys en alguna etapa del desenvolupament, tindrien una gran concentració de partícules snRNP SS-A (162).

4.3.2. La partícula antigènica SS-B

L'antigen SS-B s'ha detectat principalment en els nuclis de les cèl·lules de mamífers, encara que un estudi quantitatiu ha demostrat que el 20 % de l'antigen total es localitza en el citoplasma (48). És una ribonucleoproteïna formada per un conjunt heterogeni de RNA petits i proteïna (79). Com en el cas de la partícula SS-A, s'ha demostrat que els components de RNA petits no són immunoprecipitats en absència de proteïna, la qual cosa suggereix que la unió de l'anticòs al determinant antigènic requereix el component proteic (79).

S'ha descrit que l'antigen és resistent a les nucleases i sensible al tractament tèrmic i a la tripsina (veure Taula VI). L'antigen SS-B s'ha estudiat en extrems totals, citoplasmàtics i nuclears de diversos teixits corresponents a diferents mamífers, essent el timus de vedella o conill i les cèl·lules HeLa les fonts més usuals (veure

TAULA VI
Sensibilitat de l'antigen SS-B a la temperatura i tractaments enzimàtics

Font	Total	Tipus d'extret		Tripsina	DNasa	RNasa	37 °C	56 °C	Ref.
		citoplasmàtic	nuclear						
TV		+		S	-	S	-	-	(89)
TV			+	S	NS	NS	NS	S (1 h)	(2)
TV			+	S	NS	NS	sensible a temp.		(3)
TC	+			S	-	NS	-	S (30')	(150)
TC	+			S	-	NS	-	-	(48)
TC	+			S	-	NS	sensible		(151)

Abreviatures: TV-timus de vedella; TC-timus de conill; S-sensible; NS-no sensible i '-'no determinat.

Taula IX). En l'actualitat s'empren preferentment extrems de cèl·lules HeLa, donat que es preparen fàcilment i donen menys problemes de degradació. Diferents autors han treballat directament amb extrems totals o nuclears de diverses procedències (46, 149); extrems totals purificats a través de columnes d'immunoafinitat anti-SS-B (89); extrems purificats de precipitació a saturació amb sulfat amònic (en general entre 60-80 %) en columnes d'immunoafinitat anti-SS-B (61, 150, 151); purificacions a partir de la fracció que precipita per saturació amb sulfat amònic per cromatografies a través de columnes de DEAE, de fosfocel·lulosa, d'heparina, de filtració en gel (2, 3, 27, 28, 40, 45, 82, 136). S'aconsegueixen graus superiors de puresa per electroforesi preparativa en gels d'acrilamida (27, 146) o bè, qual l'antigen està absent del component nucleic, per cromatografia a través de columnes de poli-U (136). Referent al comportament iònic de l'antigen, cal esmentar que, per una banda, el polipèptid antigènic és neutre i per aquesta raó s'uneix a columnes aniòniques com les d'heparina (en un determinat tampó), i que, per altra banda, el complex ribonucleic és àcid i, conseqüentment, s'uneix sense problemes a columnes catiòniques de DEAE. La unió a columnes de poli-U es deu a que el component proteic té afinitat per zones riques en uridina com s'esmentarà més endavant (136).

A la Taula VII es dona un llistat dels diferents valors trobats corresponents al punt isoelèctric per l'antigen SS-B en condicions natives i desnaturalitzants. Aquests valors posen de manifest el caràcter neutre que té el polipèptid i el caràcter àcid que té la partícula snRNP SS-B. S'ha descrit, per filtració en gel, un pes molecular entre 50-150 kDa per a la partícula RNP SS-B (3).

a. Component nucleic de l'antigen SS-B

La Taula VIII posa de manifest els diferents sRNA que poden complexar-se al polipèptid antigènic SS-B. Com s'ha mencionat anteriorment, els scRNA SS-A també són immunoprecipitables pels anticossos anti-SS-B (58, 79).

Els anticossos anti-SS-B reaccionen també amb un grup de molècules d'sRNA, algunes de les quals són precursoras de 5S rRNA i tRNA (58, 79), que difereixen en grandària entre 80-300 nucleòtids (veure Taula VIII). De la mateixa manera que en el cas de les partícules scRNP SS-A, diferents RNA SS-B són immunoprecipitables a partir d'extrems cel·lulars de diverses espècies. Els RNA SS-B tenen una vida mitja inferior a la dels U-snRNA o dels scRNA SS-A i estan menys conservats entre els mamífers (58).

Els anticossos anti-SS-B també precipi-

TAULA VII
pI de l'antigen SS-B

Font	PM (kDa)	pI IEF/urea	pI IEF/natiu	N.º d'isoespècies	Ref.
HeLa	45	6-7	-	8	(40)
MH	43	-	4,2-4,8	7	(33)
MH	50	neutre-àcid	-	4	(34)
TV	-	-	4,5-4,9	-	(107)
TV	-	-	4,5-4,9	-	(108)
L-51784	48	-	4,7-4,9	-	(109)
KB	45	7,0-7,5	-	-	(112)

Abreviatures: IEF-electroenfoc; HeLa-línia de cèl·lules humanes; MH-melsa humana; TV-timus de vedella; L-51784-línia cel·lular murina; KB-línia en cultiu i '-'no determinat.

ten quatre RNA vírics petits: VAI i VAII, codificats per adenovirus; EBER 1 i EBER 2, codificats pel virus Epstein-Barr; i els RNA líders de virus d'estomatitis vesicular i del virus de la ràbia. Els experiments de reconstitució *in vitro* (39) han demostrat que els rRNA vírics només són precipitables pels anticossos anti-SS-B quan es troben units a proteïnes cel·lulars que portin el determinant antigènic SS-B, ja que el RNA sol no és reconegut pel sèrum anti-SS-B (123). Els estudis realitzats amb variants dels RNA VA indiquen que les seqüències que són reconegudes pel polipèptid antigènic SS-B es troben a prop dels extrems 3' i 5' de la molècula de RNA (39). La destrucció de l'extrem 3' amb diesterasa de verí se serp no permet la unió mentre que l'eliminació del terminal 5' fosfat no provoca cap efecte, la qual cosa suggereix que la seqüència 3' terminal és més important (39). Amb aquest mateix sistema també s'ha posat en evidència que és necessària una seqüència d'oligonucleòtids a l'extrem 3' per tal que es doni aquesta unió (87). REDDY i col. (114) han proposat que la regió terminal 3' rica en uridina CCACCUUUU(U)OH del RNA 4,5 S_I és essencial per a la unió del SS-B, i que si observem les estructures secundàries proposades per altres RNA SS-B, com el RNA EBER (123), hY5 (62), VA (92) i 4,5 S_I de ratolí (52), també es troben aquests possibles llocs d'unió a l'extrem 3'. També s'ha demostrat que el precursor del 5S rRNA, que s'uneix a la proteïna SS-B, conté uns residus uridina de més, respecte de la forma madura (119). Estudis de reconstitució *in vitro* entre el polipèptid SS-B purificat i adductes de tRNA també corroboren que els oligonucleòtids d'uridina a l'extrem 3' fan augmentar l'eficiència d'unió del polipèptid (136). No obstant això, hi ha altres autors que suggereixen que la presència de terminals d'uridina pot potenciar la unió del polipèptid, si bé aquesta propietat probablement no és suficient (157).

TAULA VIII
sRNA característics de l'antigen SS-B

<i>sRNA</i>	<i>Longitud (bases)</i>	<i>Ref.</i>
*Y1 ratolí	~ 110	(58, 160)
*Y2 ratolí	~ 95	(58, 160)
*Y1a rata	~ 95-110	(115)
*Y1b rata	~ 95-110	(115)
*Y2 rata	~ 95-110	(115)
*Y1 (Y2) humà	~ 110	(58, 160)
*Y3 humà	~ 100	(58, 160)
*Y4 humà	~ 95	(58, 160)
*Y5 humà	~ 90	(58, 160)
4,5 S _I ratolí	96	(79)
4,5 S _H ratolí	94	(79)
precursors de tRNA	80-110	(119)
pre-5S tRNA	~ 122	(119)
7S, 7-2 & 7-3 RNAs	~ 300	(21, 56)
<i>RNA virals</i>		
VAI	160	(79)
VAII	163	(79)
EBER1	167	(78)
EBER2	173	(78)
líder del virus VSV	44-46	(72)
líder del virus de la ràbia	58	(73)

*aquests RNA també són precipitats pels anticossos anti-SS-A.

Tots els sRNA són transcrits de la RNA polimerasa III a excepció dels RNA líders.

RINKE i STEITZ han posat de manifest en cèl·lules HeLa que una subclasse d'RNA U6 (10 %) i una altra d'U1 (0,1 %) són immunoprecipitables enfront de sèrums anti-SS-B. La subpoblació de molècules U6 identificades contenen espècies més grans que els U6-Sm-snRNA i tenen un extrem 3' heterogeni, aparentment ric en uridina (84, 121). S'ha suggerit que aquests RNA s'uneixen a la proteïna antigènica SS-B en estat de precursors (84, 121).

b. Component proteic de l'antigen SS-B

S'han descrit diversos pesos moleculars per al component proteic de l'antigen SS-B, que oscil·len entre 25 i 53 kDa, en diferents teixits i fent ús de diverses tècni-

ques resumides a la Taula IX. S'ha suggerit que alguns dels pesos moleculars inferiors a 47-50 kDa són productes de degradació per part de proteases endògenes (48, 30, 48, 101), encara que aquest fet no ha estat demostrat extensament. En general, els estudis d'immunoprecipitació total amb extrems marcats amb ^{32}P o ^{35}S indiquen l'existència d'un únic polipèptid antigènic entre 45-53 kDa (veure Taula IX).

El polipèptid antigènic SS-B té un pI neutre i s'ha descrit que és format per diverses isoespècies de pI diferent (veure Taula VII). S'ha demostrat, en el cas de cèl·lules HeLa, que algunes d'aquestes isospècies corresponen a una mateixa proteïna amb diferents graus de fosforilació (40). La serina és l'aminoàcid que es troba fosforilat de forma predominant en cèl·lules KB (112).

Els experiments de competició entre cèl·lules infectades amb adenovirus i cèl·lules no infectades indiquen que els anticossos s'uneixen més fortament a la proteïna SS-B en cèl·lules infectades (112).

El C-terminal del polipèptid antigènic SS-B ha estat seqüenciat, i s'ha predit que en aquesta zona pot trobar-se almenys un determinant antigènic (22).

c. Funció biològica de l'antigen SS-B

Tots els RNA SS-B descrits són transcrits de la RNA polimerasa III, a excepció dels VSV RNA i del líder del virus de la ràbia (veure Taula VIII). Diversos autors han proposat diferents funcions per a aquesta partícula RNP tenint en compte sobretot el paper dels snRNA que la formen.

Alguns autors suggereixen que la transcripció, si més no "in vitro", té lloc en absència de l'antigen, i que els RNA desproteïnitats poden unir antigen independentment de la transcripció (39). Aquests

resultats fan argumentar en contra la hipòtesi que indicaria que l'antigen SS-B té un paper en la síntesi de RNA. Similarment, l'existència d'interacció entre l'antigen i els precursors de RNA (119), indica que l'antigen no pot estar involucrat en processos de degradació. Cal suggerir, per tant, que el processament i el transport de RNA són els papers més probables per a la proteïna SS-B (87).

Un nombre creixent de treballs suggereix que l'antigen SS-B té un paper en el procés de transcripció per la RNA polimerasa III i un paper important relacionat amb la síntesi de RNA ribosomal. Aquests treballs fonamenten els punts següents: a) Existeixen evidències que indiquen que la proteïna SS-B es pot unir al precursor del rRNA 5S que és un producte ribosomal (119); b) Es demostra la unió a precursors de tRNA (119); c) Té lloc una distribució de l'antigen entre el nucleoplasma en la fase de no divisió cel·lular, i el nucleol en la fase S1 propera fins a la fase G1 tardana del cicle cel·lular en cèl·lules Wi12 (26). S'han publicat també altres treballs que demostren, per immunofluorescència amb anticossos anti-SS-B, una forta tinció nucleolar en subclasses de neurones humanes, cervell de rata i neurones de conills d'Indies i altres teixits (46).

El RNA VAI és necessari per a la iniciació del pas de traducció de mRNA cel·lulars i d'adenovirus en cèl·lules infectades (125, 148), i possiblement de mRNA de virus associats a adenovirus. Conseqüentment, l'antigen SS-B (que s'uneix a aquest RNA) pot tenir un paper en la traducció d'aquests mRNA (85, 99), així com en d'altres RNA petits que contenen terminals 3' rics en uridina (40).

S'havia suggerit que l'antigen SS-B podria ser un efector de la RNA polimerasa III (119). Experiments posteriors suggereixen que aquesta hipòtesi pot no ésser vàlida, ja que s'ha descrit que l'efector és una proteïna unidora del DNA constituent de

TAULA IX
Pesos moleculars del polipèptid SS-B en diferents teixits

<i>Font</i>	<i>Tècnica</i>	<i>PM (kDa)</i>	<i>Inhibidors</i>	<i>Ref.</i>
HeLa	PB, tppn	50,40	leupep, chymost. pepstatin	(136)
HeLa	tppn	50, 40, 25	0,5 mM PMSC	(48)
HeLa	tppn	50	0,2 mM PMSF	(45)
HeLa	Ipp (³⁵ S)	50	NE	(162)
HeLa	tppn	50	0,1 mM PMSF	(34)
HeLa	Ipp (³⁵ S), tppn, PB	45	NE	(40)
HeLa	Ipp (³⁵ S)	53, 45	NE	(88)
HeLa	Ipp (³⁵ S)	45	NE	(39)
HeLa	tppn	50, 46, 40	0,2 mM PMSF	(61)
HeLa	tppn	50	NE	(149)
HeLa	tppn	48, 43	1 mM PMSF	(23)
SS-B clonat de HeLa	Ipp (³⁵ S)	50	NE	(22)
Línies de cèl·lules humanes	tppn amb anticossos monoclonals	48	0,2 mM PMSF	(134)
WIL 2	tppn	45, 40, 29	NE	(151)
WIL 2	tppn	43	1 mM PMSF	(28)
MH, RC i TV	tppn	43	0,1 mM PMSF	(33)
MH	tppn	50, 43	0,1 mM PMSF	(34)
MH	tppn	42, 40	1,5 mM PMSF	(59)
Cervell humà	tppn	50, 43	NE	(46)
Nuclis TV	PB, Imm	43	NE	(2)
TV	tppn	52	1 mM PMSF	(30)
TV	tppn	41, 29	NE	(54)
TC	Imm	40, 29	NE	(150)
TC	tppn	50, 40, 25	0,5 mM PMSC	(48)
TC	tppn	50	0,2 mM PMSF	(45)
TC	tppn amb anticossos monoclonals	45, 40	0,2 mM PMSF	(134)
TC i TV	Imm	45, 40, 29	NE	(151)
TC	tppn	50, 46, 32, 27	0,2 mM PMSF	(61)
Melsa i cervell de gos	tppn	50	0,1 mM PMSF	(33)
Cervell de conill	tppn	50, 43	0,1 mM PMSF	(33)
Cèl·lules de ratolí	tppn amb anticossos monoclonals	45	0,2 mM PMSF	(134)
L-5178	PB	48	1 mM PMSF	(109)
Fetge i melsa de diversos mamífers	tppn	45, 40, 29	NE	(151)
KB	Ipp (³⁵ S) (³² P)	45	NE	(112)
Fetge rata	tppn	50, 46, 40	0,2 mM PMSF	(61)

Abreviatures: Inhibidors-ús d'inhibidors de proteases; NS-no especificat; PB-purificació bioquímica; tppn-transferència proteica a papers de nitrocel·lulosa; Imm-columnes d'immunoafinitat; Ipp-immunoprecipitació; HeLa-cèl·lules en cultiu humanes; WIL 2-cèl·lules en cultiu humanes; MH-melsa humana; RC-ronyó de conill; TV-timus de vedella; TC-timus de conill; L-5178-cèl·lules murines en cultiu; KB-cèl·lules en cultiu.

la partícula snRNP SS-B però diferent de l'antigen SS-B (29).

La unió de l'antigen SS-B al RNA 7S, el qual pot formar part de la partícula SRP

(partícula senyal de reconeixement) implicada en la síntesi de proteïnes, fa pensar en el possible paper de l'antigen SS-B en aquest mecanisme (21).

Finalment, s'ha suggerit que el paper de l'antigen SS-B podria tenir lloc en la replicació i transcripció de la cadena negativa de RNA virals (en el cicle viral VSV) en cèl·lules infectades, unint-se al RNA líder i permetent que es desacobli del sistema de transcripció, la qual cosa permetria la continuació d'aquest procés (63).

4.3.3. *Associació física de les partícules RNP corresponents a SS-A i SS-B*

Les partícules scRNP SS-A també són precipitades pels anticossos anti-SS-B (58, 79) així com pels anticossos anti-SS-A. Diversos experiments d'immunoprecipitació total han demostrat que tots els complexos SS-A contenen determinants SS-B però no tots els complexos SS-B contenen determinants anti-SS-A (156). Aquest mateix fet també s'ha posat en evidència en experiments de reconstitució (58). L'antigen SS-B copurifica amb l'antigen SS-A en experiments de cromatografia d'immunoafinitat anti-SS-A monoespecífica (151) i ambdós coexisteixen en diversos passos de purificació bioquímica (28, 82). Totes aquestes evidències suggereixen que els dos antigens estan associats, des del punt de vista molecular, d'una manera anàloga al sistema RNP/Sm, i que l'SS-A és una subclasse de les ribonucleoproteïnes SS-B que conté almenys determinants antigènics pels dos anticossos (58, 151, 156). En el cas que aquest suggeriment fos correcte quedarien explicades, almenys en part, les discrepàncies trobades respecte a la localització citoplasmàtica o nuclear de l'antigen SS-B (58), i la coexistència freqüent d'anticossos anti-SS-B i anti-SS-A en malalts de LED i síndrome de Sjögren (54, 58). Ara bé, cal fer menció que l'antigen SS-A també es pot detectar per immunodifusió en extrems de melsa humana lliure de determinants antigènics SS-B, juntament

amb partícules que tenen els dos determinants (32).

IV. CONCLUSIONS

Amb aquesta revisió queda patent la importància dels estudis que s'han realitzat sobre els antigens contra els quals reaccionen els sèrums de malalts reumàtics. Els autoanticossos han permès portar a terme correlacions amb la malaltia així com ésser emprats com a eina de detecció de les característiques moleculars dels corresponents autoantigens i de la seva possible funció. Caldria també fer constar que sense l'ús dels autoanticossos no s'hagués avançat amb tanta celeritat en l'estudi dels autoantigens, ja que fins aleshores la majoria eren desconeguts.

Agraïments

Aquest treball ha estat finançat per ajudes a la investigació de la CAICYT, Fundació M. Francisca Roviralta i Fondo de Investigaciones Sanitarias. M.B. fou becària pre-doctoral del C.S.I.C.

BIBLIOGRAFIA

1. AARDEN, L.A., DE GROOT, E.R., i FELTKAMP, T. (1975) Immunology of DNA III. *Chritidia luciliae*, a simple substrate for the determination of anti-ds-DNA with the immunofluorescence technique. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 254:505-571.
2. AKIZUKI, M., BOEHM-TRUIT, M.J. KASSAN, S.S., STEINBERG, A.D. i CHUSED, T.M. (1977) Purification of an acidic nuclear protein antigen and demonstration of its antibodies in subsets of patients with sicca syndrome. *J. Immunol.* 119:932-938.
3. AKIZUKI, M., POWERS, R. i HOLMAN, H.R. (1977) A soluble acidic protein of the cell nucleus which reacts with serum from patients with systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *J. Clin. Invest.* 59:264-272.
4. ALARCÓN-SEGOVIA, D. (1983) Antibodies to nuclear and other intracellular antigens in the con-

- nective tissue diseases. *Clin. Rheum. Dis.* 9:161-175.
5. ALSPAUGH, M.A., TALAL, N. i TAN, E.M. (1976) Differentiation and characterization of autoantibodies and their antigens in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 19:216-222.
 6. ALSPAUGH, M. i MADDISON, P. (1979) Resolution of the identity of certain antigen antibody systems in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome: an interlaboratory collaboration. *Arthritis Rheum.* 22:796-798.
 7. ALSPAUGH, M.A., HENLE, G., LENNETTE, E. i HENLE, W. (1981) Elevated levels of antibodies to Epstein-Barr virus antigens in sera and synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 67:1134-1140.
 8. ANDERSON, J.R., CRAY, K.G. i BECK, J.S. (1961) Precipitating autoantibodies in Sjögren's disease. *Lancet* ii:456-458.
 9. ANDRE-SCHWARTZ, J., DATTA, S.K., SHOENFELD, Y., ISENBERG, D.A., STOLLAR, B.D. i SCHWARTZ, R.S. (1984) Binding of cytoskeletal proteins by monoclonal anti-DNA lupus antibodies. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 31:261-271.
 10. BERGET, S.M. (1984) Are U4 small nuclear ribonucleoproteins involved in polyadenylation? *Nature* 309:179-182.
 11. BILLINGS, P.B., HOCH, S.O., WHITE, P.J., CARSON, D.A. i VAUGHAM, J.H. (1983) Antibodies to the EBV nuclear antigens and to rheumatoid arthritis nuclear antigen identify the same polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:7104-7108.
 12. BOMBARDIERI, S., AGELLI, M., SIRACUSANO, A. i IOPPOLO, S. (1980) Anti-DNA antibodies and anti-extractable nuclear antigens-methods for determination and diagnostic importance. *La Ricerca Clin. Lab.* 10:1-17.
 13. BREATHNOCH, R. i CHAMBON, P. (1981) Organization and expression of eucaryotic split genes coding for protein-mechanism of RNA splicing. *Ann. Rev. Biochem.* 50:349-383.
 14. BRINGMANN, P., RINKE, J., APPEL, B., REUTER, R. i LÜRMANN, R. (1983) Purification of snRNPs U1, U2, U4, U5 and U6 with 2,2,7-trimethylguanosine-specific antibody and definition of their constituent proteins reacting with anti-Sm and anti-(U1)RNP antisera. *EMBO J.* 2:1129-1135.
 15. BRINGMANN, P., APPEL, B., RINKE, J., REUTER, R., THEISSEN, H. i LÜHRMANN, R. (1984) Evidence for the existence of snRNAs U4 and U6 in a single ribonucleoprotein complex and for their association by intermolecular base pairing. *EMBO J.* 3:1357-1363.
 16. BURNHAM, T.K. (1975) Antinuclear antibodies II. The prognostic significance of nuclear immunofluorescence patterns in lupus erythematosus. *Arch. Dermatol.* 111:203-207.
 17. BUSCH, H., REDDY, R., ROTHBLUM, L. i CHOI, C. (1982) SnRNAs, SnRNPs, RNA processing. *Ann. Rev. Biochem.* 51:617-654.
 18. BUSTIN, M., REISCH, J., EINCK, L. i KLIPPEL, J.H. (1982) Autoantibodies to nucleosomal proteins: antibodies to HMG in autoimmune diseases. *Science* 215:1245-1247.
 19. CALVET, J.P., MEYER, L.M. i PEDERSON, T. (1982) Small nuclear RNA U2 is base-paired to heterogeneous nuclear RNA. *Science* 217:456-458.
 20. CHABOT, B., BLACK, D.L., LEMASTER, D.M. i STEITZ, J.A. (1985) The 3' splice site of pre-messenger RNA is recognized by a small nuclear ribonucleoprotein. *Science* 230:1344-1349.
 21. CHAMBERS, J.C., KURILLA, M. i KEENE, J.D. (1983) Association between 7S RNA and the lupus La protein varies among all types. *J. Biol. Chem.* 258:11438-11441.
 22. CHAMBERS, J.C. i KEENE, J.D. (1985) Isolation and analysis of cDNA clones expressing human lupus La antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:2115-2119.
 23. CHAN, E.K.L., FRANCOEUR, A.M. i TAN, E.M. (1986) Epitopes, structural domains, and asymmetry of amino acid residues in SS-B/La nuclear protein. *J. Immunol.* 136:3744-3749.
 24. CLARK, G.M., REINCHLIN, M. i TOMASI, T.B. (1969) Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 102:117-121.
 25. COX, J.V., SCHENK, E.A. i OLMSTED, J.B. (1983) Human anticentromere antibodies: distribution, characterization of antigens and effect on microtubule organization. *Cell* 35:331-339.
 26. DENG, J.S., TASAKAKI, Y. i TAN, E.M. (1981) Non-histone nuclear antigens reactive with autoantibodies immunofluorescent studies of distribution in synchronized cell. *J. Cell. Biol.* 91:654-660.
 27. DENG, J.S., SONTHEIMER, R.D. i GILLIAM, J.N. (1984) Molecular interaction of nuclear antigens SS-B/La and SS-A/Ro. *Arthritis Rheum.* 4:(Suplem.)S64.
 28. DENG, J.S., SONTHEIMER, R.D. i GILLIAM, J.N. (1985) Molar characteristics of SS-B/La and SS-A/Ro antigens. *J. Invest. Dermatol.* 84:86-90.
 29. DOUVAS, A.S., ACHTEN, M. i TAN, E.M. (1979) Isolation and characterization of nuclear ribonucleoprotein complexes using human antinuclear ribonucleoprotein antibodies. *J. Biol. Chem.* 254:10514-10522.
 30. DURAN, N., BACH, M., PUIGDOMÉNECH, P. i PA-

- LAU, J. (1984) Characterization of antigenic polypeptides of the RNP, Sm and SS-B nuclear antigens from calf thymus. *Mol. Immunol.* 21:731-739.
31. EILAT, D. i LOTAN, C.H. (1982) Reaction of human SLE antibodies with native single stranded RNA-Analysis of nucleotide sequence specificities and correlation with Sm and nRNP activities. *Clin. Exp. Immunol.* 49:283-289.
 32. EISENBERG, R.A. (1985) Association between the Ro and La antigen determinants: immunodiffusion analysis of human spleen extract. *J. Immunol.* 135:1707-1713.
 33. ELKON, K.B. i CULHARE, L. (1984) Partial immunochemical characterization of the Ro and La proteins using antibodies from patients with sicca syndrome and lupus erythematosus. *J. Immunol.* 132:2350-2356.
 34. ELKON, K.B. i JANKOWSKI, P.W. (1985) Fine specificities of autoantibodies directed against Ro, La, Sm, RNP and Jo-1 proteins defined by 2nd dimension polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting. *J. Immunol.* 134:3819-3824.
 35. FAABER, P., RIJKE, G.P.M., SNEENK, R.J.T., CAPEL, P.J.A., VAN DE PUTE, L.B.A. i BERDEN, J.H.H. (1985) Cross-reactivity of anti-DNA antibodies: a new clue for the pathogenesis of SLE? en "Protides of the Biological Fluids" (Ed. per Peeters, H.) *Pergamon Press* 33:pp. 305-308.
 36. FAKAN, S., LESER, G. i MARTIN, T.E. (1984) Ultrastructural distribution of ribonucleoproteins as visualized by immunochemistry on thin sections. *J. Cell Biol.* 98:358-363.
 37. FISCHER, D.E., REEVES, W.H., SNIWOLSKI, R.W. i BLOBEL, G. (1985) Small nuclear ribonucleoprotein particle assembly in vivo: demonstration of a 6 S RNA-free core precursor and post-translation modification. *Cell* 42:751-758.
 38. FRANCO, H.L., WESTON, W., PEEBLES, C., FORSTOT, S.L. i PHANUPHAK, P. (1981) Autoantibodies directed against sicca syndrome antigens in the neonatal lupus syndrome. *J. Amer. Acad. Dermatol.* 4:67-77.
 39. FRANCOEUR, A.M. i MATHEWS, M.B. (1982) Interaction between VA-RNA and the lupus antigen La- formation of a ribonucleoprotein particle in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6772-6776.
 40. FRANCOEUR, A.M., CHAN, E.K.L., GARRELS, J.I. i MATHEWS, M.B. (1985) Characterization and purification of lupus antigen La, and RNA binding protein. *Mol. Cel. Biol.* 5:586-590.
 41. FRITZLER, M.J. i E.M. TAN (1978) Antibodies to histones in drug-induced and idiopathic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 62: 560-567.
 42. FRITZLER, M.J., KINSELLA, T.D. i GARBUTT, E. (1980) The CREST syndrome: a distinct serologic entity with anticentromere antibodies. *Am. J. Med.* 69:520-526.
 43. FRITZLER, M.J. (1985) The detection of autoantibodies: an overview en "Protides of the Biological Fluids" (Ed. per Peeters, U.) *Pergamon Press* 33:377-380.
 44. GOHILL, J., AYER, L.M. i FRITZLER, M.J. (1985) Antihistone antibodies bind to restricted epitopes en "Protides of the Biological Fluids" (Ed. per Peeters, H.) *Pergamon Press* 33:191-194.
 45. GOTTESFELD, J.M., ANDREWS, D.L. i HOCH, S.O. (1984) Association of an RNA polymerase III transcription factor with a ribonucleoprotein complex recognized by autoimmune sera. *Nucl. Acid. Res.* 12:3185-3200.
 46. GRAUS, F., CORDON-CARDO, C., BONFA, E. i ELKON, K.B. (1985) Immunohistochemical localization of La nuclear antigen in brain-selective concentration of La protein in neuronal nucleoli. *J. Neuroimmunol.* 9:307-319.
 47. GULDNER, H.H., LAKOMEK, H.J., SZOZTECKI, C. i BAUTZ, F.A. (1985) Autoantibody-profiles in patients with SLE, scleroderma and overlap-syndromes en "Protides of the Biological Fluids" (Ed. per Peeters, H.) *Pergamon Press* 33:287-291.
 48. HABETS, W.J., DEN BROK, J.H., BOERBOOMS, A.M.Th., VAN DE PUTTE, L.B.A. i VAN VENROOIJ, W.J. (1983) Characterization of the SS-B (La) antigen in adenovirus-infected HeLa cells. *EMBO J.* 2: 1625-1631.
 49. HABETS, W.J., BERDEN, J.H.M., HOCH, S.O. i VAN VENROOIJ, W.J. (1985) Further characterization and subcellular localization of Sm and U1 RNP antigens. *Eur. J. Immunol.* 15:992-997.
 50. HABETS, W.J., HOET, M.H., VAN DE PAS, J. i VAN VENROOIJ, W.J. (1985) Characterization of nuclear and cytoplasmic autoimmune antigen, en "Protides of the Biological Fluids" (Ed. per Peeters, H.) *Pergamon Press* 33:199-204.
 51. HABETS, W., HOET, M., BRINGMANN, P., LÜRMANN, R. i VAN VENROOIJ, W. (1985) Autoantibodies to ribonucleoprotein particles containing U2 small nuclear RNA. *EMBO J.* 4:1545-1550.
 52. HARADA, F. i KATO, N. (1980) Nucleotide sequence of 4.5 S RNAs associated with poly(A)-containing RNAs of mouse and hamster cells. *Nucl. Acid. Res.* 8:1273-1285.
 53. HARDIN, J.A. i THOMAS, J.O. (1983) Antibodies to histones in SLE: localization of prominent autoantigens on histone H1 and H2B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:7410-7414.
 54. HARLEY, J.B., YAMAGATA, H. i REICHLIN, M. (1984) Anti-La/SS-B antibody is present in some normal sera and is coincident with anti-

- Ro/SS-A precipitins in systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 11:309-314.
55. HARMON, C.E., DEMG, J.S., PEEBLES, C.L. i TAN, E.M. (1984) The importance of tissue substrate in the SS-A/Ro antigen antibody system. *Arthritis Rheum.* 27:166-173.
 56. HASHIMOTO, C. i STEITZ, J.A. (1983) Sequential association of nucleolar 7-2 RNA with different autoantigens. *J. Biol. Chem.* 258:1379-1382.
 57. HASHIMOTO, C. i STEITZ, J.A. (1984) U4 and U6 coexist in a single small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nucl. Acid. Res.* 12:3283-3293.
 58. HENDRICK, J.P., WOLIN, S.L., RINKE, J., LERNER, M.R. i STEITZ, J.A. (1981) Ro small cytoplasmic ribonucleoprotein are a subclass of La ribonucleoproteins. Further characterization of the Ro and La small ribonucleoproteins from uninfected mammalian cells. *Mol. Cel. Biol.* 1:1138-1149.
 59. HERRERA-ESPARZA, R., PROVOST, T.T. i DIAZ, L.A. (1986) Molecular characterization of Ro (SS-A) and La (SS-B) proteins. *J. Rheumatol.* 13:327-330.
 60. HINTERBERGER, M., PETERSSON, I. i STEITZ, J.A. (1983) Isolation of small nuclear ribonucleoprotein containing U1, U2, U4, U5 and U6 RNAs. *J. Biol. Chem.* 258:2604-2613.
 61. HOCH, S.O. i BILLINGS, P.B. (1984) Characterization of the La (SS-B) antigen from several mammalian sources. *J. Immunol.* 133:1397-1403.
 62. KATO, N., HOSHINO, H. i HARADA, F. (1982) Nucleotide sequence of 4.5 S RNA (C8 or hY5) from HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108:363-370.
 63. KEENE, J.D., KURILLA, M.G., WILUSZ, J. i CHAMBERS, J.C. (1984) Interaction between cellular La protein and leader RNAs. En "Non Segmented Negative Strand Viruses" (5th International Symp. on the Mol. Biol., Alabama), pp. 103-108.
 64. KEPHART, D.C., HOOD, A.F. i PROVOST, T.T. (1981) Neonatal lupus serologic findings. *J. Invest. Dermatol.* 77:331-338.
 65. KINLAW, C.S., DUSING-SWARTZ, S.K. i BERGET, S.M. (1982) Human U1 and U2 snRNPs contain common and unique polypeptides. *Mol. Cel. Biol.* 2:1159-1166.
 66. KINLAW, C.S., ROBERSON, B.L. i BERGET, S.M. (1983) Fractionation and characterization of human small nuclear RNPs, containing U1 and U2 RNAs. *J. Biol. Chem.* 258:7181-7189.
 67. KOFFLER, D., CARR, R.I., AGNELLO, V., THORBURN, R. i KUNKEL, H.G. (1971) Antibodies to polynucleotides in human sera: antigenic specificity and relation to disease. *J. Exp. Med.* 131:294-312.
 68. KOHLEISEN, I., KALIES, K., KOLBE, K., i KALDEN, J.R. (1985) IP-heterogeneity of nuclear antigens detected in an isoelectric focusing-immunoblot system en "Protides of the Biological Fluids" (Ed. per Peeters, H.) Pergamon Press 33:195-198.
 69. KRAINER, A.R. i MANIATIS, T. (1985) Multiple factors including the snRNP U1 and U2 are necessary for pre-mRNA splicing in vitro. *Cell* 42:725-736.
 70. KUMAR, A. i ALI, R. (1984) Detection of anti-RNA antibodies in systemic lupus erythematosus by ELISA using nylon as solid support. *Immunol. Lett.* 7:293-296.
 71. KURATA, N. i TAN, E.M. (1976) Identification of antibodies to nuclear acidic antigens by counterimmunoelectrophoresis. *Arthritis Rheum.* 19:574-580.
 72. KURILLA, M.G. i KEENE, J.D. (1983) The leader RNA of vesicular stomatitis virus is bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies. *Cell* 34:837-845.
 73. KURILLA, M.G., CABRADILLA, C.D., HOLLOWAY, B.P. i KEENE, J.D. (1984) Nucleotide sequence and host La protein interactions of rabies virus leader. *J. Virol.* 50:773-778.
 74. LAFER, E.M., RAUCH, J., ANDREZEJWSKI, C., MUDO, D., FURIE, B., SCHWARTZ, R.S. i STOLLAR, B.D. (1981) Polyspecific monoclonal lupus autoantibodies reactive with both polynucleotides and phospholipids. *J. Exp. Med.* 153:897-909.
 75. LEE, L.A., HARMON, C., HUFF, J.C., NORRIS, D.A. i WESTON, W.L. (1985) The demonstration of SS-A/Ro antigen in human fetal tissues and in neonatal and adult skin. *J. Invest. Dermatol.* 85:143-146.
 76. LERNER, M.R. i STEITZ, J.A. (1979) Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5495-5499.
 77. LERNER, M.R., BOYLE, J.A., MOUNT, S.M., WOLIN, S.L. i STEITZ, J.A. (1980) Are snRNPs involved in splicing? *Nature* 283:220-224.
 78. LERNER, M.R., ANDREWS, N.C., MILLER, G. i STEITZ, J.A. (1981) Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:805-809.
 79. LERNER, M.R., BOYLE, J.A., HARDIN, J.A. i STEITZ, J.A. (1981) Two novel classes of small ribonucleoproteins detected by antibodies associated with lupus erythematosus. *Science* 211:400-402.
 80. LERNER, E.A., LERNER, M.R., JANEWAY, C.R. i

- STEITZ, J.A. (1981) Monoclonal antibodies to nucleic acid containing cellular constituents: probes for molecular biology and autoimmune diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2737-2741.
81. LIANTARD, J.P., SRI-WARADA, J., BRUNEL, C. i JEANTEUR, P. (1982) Structural organization of RNP containing snRNAs from HeLa cells. Proteins interact closely with a similar structural domain of U1, U2, U4 and U5 snRNAs. *J. Mol. Biol.* 162:623-643.
 82. LIEU, J.C., JIANG, M., STEINGERWALD, U. i TAN, E.M. (1984) Identification of the SS-A/Ro intracellular antigen with autoimmune sera. *J. Immunol. Meth.* 71:217-228.
 83. LIEU, J.C. i STEINGERWALD, U. (1984) Purification and identification of SS-A antigen (Ro) reacting with sera of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 4(suplem.):C37.
 84. MADORE, S.J., WIEBEN, E.D. i PEDERSON, TH. (1984) Eukaryotic small ribonucleoproteins. Anti-La human autoantibodies react with U1-RNA protein complexes. *J. Biol. Chem.* 259:1929-1933.
 85. MATHEWS, M.B. (1980) Binding of Adenovirus VA RNA to mRNA: a possible role in splicing. *Nature* 285:575-577.
 86. MATHEWS, M.B. i BERNSTEIN, R.M. (1983) Myositis autoantibodies inhibits histidyl-tRNA synthetase: a model for autoimmunity. *Nature* 304:177-179.
 87. MATHEWS, M.B. i FRANCOEUR, A.M. (1984) La antigen recognizes and binds to the 3'-oligouridyate tail of a small RNA. *Mol. Cel. Biol.* 4:1134-1140.
 88. MATTER, L., SHOPFER, K., WILHEM, J.A., NYFFENEGGER, T., PARISOT, R.F. i DE ROBERTIS, E.M. (1982) Molecular characterization of ribonucleoprotein antigens bound by antinuclear antibodies: a diagnostic evaluation. *Arthritis Rheum.* 25:1278-1283.
 89. MATTIOLI, M. i REICHLIN, M. (1974) Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 17:421-429.
 90. MCGILLIVRAY, A.J., CARROLL, A.R., DAHI, S., NAXAKIS, M.R., SADAIE, C.M., WALLIS, C.M. i JING, T. (1982) Comparison of the nuclear antigen Sm and RNP of human rheumatic and connective tissue diseases and the relevance of their autoantibodies as probe for RNA processing mechanism. *FEBS Lett.* 141:139-147.
 91. MCNEILAGE, L.J., WHITTINGHAM, S. i MACKAY, I.R. (1984) Autoantibodies reactive with small ribonucleoprotein antigens: a convergence of molecular biology and clinical immunology. *J. Clin. Lab. Immunol.* 15:1-17.
 92. MONSTEIN, H.J. i PHILIPSON L. (1981) The conformation of Adenovirus VAI RNA in solution. *Nucl. Acid. Res.* 9: 4239-4250.
 93. MONSTEIN, H.J., HAMMARTSTRÖM, K., WESTIN, G., ZABIELSKI, J., PHILIPSON, L. i PETERSSON, U. (1983) Loci for human U1 RNA: structural and evolutionary implications. *J. Mol. Biol.* 167:245-257.
 94. MOUNT, S.M., PETERSSON, I., HINTERBERGER, M., KARMAS, A. i STEITZ, J.A. (1983) The U1 snRNA-protein complex selectively binds a 5'splice site *in vitro*. *Cell* 33:509-518.
 95. MIMORI, T., AKIZUKI, M., YAMAGATA, H., INADA, S., YOSHIDA, S. i HOMMA, M. (1981) Characterizations of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis scleroderma overlap. *J. Clin. Invest.* 68:611-620.
 96. MIMORI, T., HINTERBERGER, M., PETERSSON, I. i STEITZ, J.A. (1984) Autoantibodies to the U2 small nuclear ribonucleoprotein in a patient with scleroderma-polymyositis overlap syndrome. *J. Biol. Chem.* 259:560-565.
 97. MIYACHI, K., FRITZLER, M.J. i TAN, E.M. (1978) Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J. Immunol.* 121:2228-2234.
 98. MIYAWAKI, S., KOHMOTO, K., KURATA, N. i OFUJI, T. (1978) Identification and characterization of two new soluble nuclear antigens reactive with sera of patients with connective tissue diseases. *Arthritis Rheum.* 21:803-810.
 99. MURRAY, V. i HOLLIDAY, R. (1979) Mechanism for RNA splicing of gene transcripts. *FEBS Lett.* 106:5-7.
 100. NAKAMURA, R.M. i TAN, E.M. (1983) Autoantibodies to non-histone nuclear antigens and their clinical significance. *Hum. Pathol.* 14:392-400.
 101. NAVARRO, E., BACH, M., DURAN, N., PUIGDOMÉNECH, P. i PALAU, J. (1986) A multiple sample immunoblotting system (MSIS) for the intrinsic detection of antinuclear autoantibodies. *J. Immunol. Meth.* 91:75-81.
 102. NEVINS, J.R. (1983). The pathway of eucaryotic mRNA formation. *Ann. Rev. Biochem.* 52:441-466.
 103. NISHIKAI, M. i REICHLIN, M. (1980) Purification and characterization of a nuclear non-histone basic protein (Mi-1) which reacts with anti-immunoglobulin sera and the sera of patients with dermatomyositis. *Mol. Immunol.* 17:1129-1141.
 104. NISHIKAI, M. i REICHLIN, M. (1980) Heterogeneity of precipitating antibodies in polymyositis and dermatomyositis. Characterization of the Jo-1 antibody system. *Arthritis Rheum.* 23:881-888.
 105. NOTMAN, D.D., KURATA, N. i TAN, E.M. (1975)

- Profiles of antinuclear antibodies in systemic rheumatic diseases. *Ann. Int. Med.* 83:464-469.
106. OHSMIMA, Y., ITOH, M., OKADA, N. i MIYATA, T. (1981) Novel models for RNA splicing that involve a small nuclear RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:4471-4474.
 107. OKARMA, T.B., KRUEGER, J.A. i HOLMAN, H.R. (1980) The intracellular localization of Sm and RNP antigens. *Clin. Res. U.S.A.* 28:356A.
 108. OKARMA, T.B., KRUEGER, J.A. i HOLMAN, H.R. (1982) Analysis of speckled fluorescent ANA test antisera using electrofocused nuclear antigen. *J. Clin. Invest.* 70:296-303.
 109. OKARMA, T.B., SCHRIER, W. i FEINBAUM, R. (1985) Isofocusing of antigenic snRNPs I. *Anal. Biochem.* 147:27-37.
 110. PETTERSSON, I., HINTERBERGER, M., MIMORI, T., GOTTLIEB, E. i STEITZ, J.A. (1984) The structure of mammalian snRNPs. Identification of multiple protein components reactive with anti(U1)-RNP and anti-Sm autoantibodies. *J. Biol. Chem.* 259:5907-5914.
 111. PINNAS, J.L., NORTHWAY, J.D. i TAN, E.M. (1973) Antinuclear antibodies in human sera. *J. Immunol.* 111:996-1004.
 112. PIZER, L.I., DENG, J.H., STENBERG, R.M. i TAN, E.M. (1983) Characterization of a phosphoprotein associated with the SS-B/La nuclear antigen in Adenovirus-infected and uninfected KB cells. *Mol. Cel. Biol.* 3:1235-1245.
 113. PROVOST, T.T. (1979) Subsets in systemic lupus erythematosus. *J. Invest. Dermatol.* 72:110-113.
 114. REDDY, R., HENNING, D., TAN, E. i BUSCH, H. (1983) Identification of a La protein binding site in a RNA polymerase III transcript (4.5 I RNA). *J. Biol. Chem.* 258:8352-8356.
 115. REDDY, R., TAN, E.M., HENNING, D., NOHGA, K. i BUSCH, H. (1983) Detection of a nucleolar 7-2 ribonucleoprotein and a cytoplasmic 8-2 ribonucleoprotein with autoantibodies from scleroderma. *J. Biol. Chem.* 258:1383-1386.
 116. REICHLIN, M. i MATTIOLI, M. (1976) Description of a serological reaction characteristic of polymyositis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 5:12-20.
 117. REUTER, R., APPEL, B., BRIGMANN, P., RINKE, J. i LÜHRMANN, R. (1984) 5'-terminal caps of snRNAs are reactive with antibodies specific for 2,2,7-trimethylguanosine in whole cells and nuclear matrices. *Exp. Cell. Res.* 154:548-560.
 118. REUTER, R., BRINGMANN, P., RINKE, J., APPEL, B. i LÜHRMANN, R. (1985) Immune response of genetically normal mice towards isolated native U1 small nuclear ribonucleoproteins: evidence that U-snRNPs may function as an immunogen during the anti-RNP/Sm autoantibody response. En "Protides of the Biological Fluids" (Ed. per Peeters, H.) *Pergamon Press* 33:257-260.
 119. RINKE, J. i STEITZ, J.A. (1982) Precursor molecules of both human 5 S ribosomal RNA and transfer RNAs are bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies. *Cell* 29:149-159.
 120. RINKE, J., APPEL, B., DIGWED, M. i LÜHRMANN, R. (1985) Localization of a base-paired interaction between small nuclear RNAs U4 and U6 in intact U4/U6 ribonucleoprotein particles by psoralen cross-linking. *J. Mol. Biol.* 185:721-731.
 121. RINKE, J. i STEITZ, J.A. (1985) Association of the lupus antigen La with a subset of U6 snRNA molecules. *Nucl. Acid. Res.* 13:2617-2629.
 122. RITCHIE, R.F. (1970) Antinucleolar antibodies: their frequency and diagnostic application. *N. Engl. J. Med.* 282:1174-1177.
 123. ROSA, M.D., GOTTLIEB, E., LERNER, M.R. i STEITZ, J.A. (1981) Striking similarities are exhibited by two small Epstein-Barr virus encoded ribonucleic acids and the Adenovirus-associated ribonucleic acids VAI and VAII. *Mol. Cel. Biol.* 1:785-796.
 124. ROSA, M.D., HENDRICK, J.P., LERNER, M.R. i STEITZ, J.A. (1983) A mammalian t-RNA-(his) containing antigen is recognized by the polymyositis-specific antibody anti-Jo-1. *Nucl. Acid. Res.* 11:853-870.
 125. SCHNEIDER, R.J., WEINBERGER, C. i SHENK, T. (1984) Adenovirus VAI RNA facilitates the initiation of translation in virus-infected cells. *Cell* 37:291-298.
 126. SCOPELITIS, E., BIUNDO, J. i ALSPAUGH, M. (1980) Anti-SS-A antibody and other antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 23:287-293.
 127. SCOTT, J.S., MADDISON, P.J., TAYLOR, P.V., ESSCHER, E., SCOTT, O. i SKINNER, R.P. (1983) Connective-tissue disease antibodies to ribonucleoprotein, and congenital heart block. *N. Engl. J. Med.* 309:209-212.
 128. SHARP, G.C., IRVIN, W.S., MAY, C.M., HOLMAN, H.R., MCDUFFIE, F.C., HESS, E.V. i SCHMID, F.C. (1976) Association of autoantibodies to RNP and Sm antigens with mixed connective tissue disease, systemic lupus erythematosus and other rheumatic diseases. *N. Engl. J. Med.* 295:1149-1154.
 129. SHARP, P.A. (1981) Speculation of RNA splicing. *Cell* 23:643-646.
 130. SHERO, J.H., BORDWELL, B., THFIELD, N.F.R. i EARNSHAW, W.C. (1986) High titers of autoantibodies to Topoisomerase I (Scl-70) in sera from scleroderma patients. *Science* 231:737-740.
 131. SHOENFELD, Y., RAUCH, J., MASSICOTTE, H.,

- DATA, S.K., SCHWARTZ, B.D., STOLLAR, B.D. i SCHWARTZ, R.S. (1983) Polyspecificity of monoclonal lupus autoantibodies produced by human hybridomas. *N. Engl. J. Med.* 308:414-420.
132. SMEENK, R., WESTGEEST, T., DUIN, T. i VAN DE BRINK, H. (1985) Crossreactivity of monoclonal antibodies to DNA: related to avidity? En "Protides of the Biological Fluids" (Ed. per Peeters, H.) *Pergamon Press* 33:237-240.
133. SMITH, J.H. i ELICEIRI, G.L. (1983) Association of small nuclear RNA in human cells. *J. Cell. Physiol.* 117:128-134.
134. SMITH, P.R., WILLIAMS, D.G., VENABLES, P.J.W. i MAINI, R.N. (1985) Monoclonal antibodies to the Sjögren's syndrome associated antigen SS-B (La). *J. Immunol. Meth.* 77:63-75.
135. STAINES, N.A., THOMPSON, H.S.G. i MORGAN, A. (1985) Diversity and multispecificity of autoantibodies reactive with DNA: some evolutionary implications. En "Protides of the Biological Fluids" (Ed. per Peeters, H.) *Pergamon Press* 33:241-244.
136. STEFANO, J.E. (1984) Purified lupus antigen La recognizes an oligourilylate stretch common to the 3' termini of RNA polymerase III. *Cell* 36:145-154.
137. STEITZ, J.A., BERG, C., GOTTLIEB, E., HARDIN, J.A., HASHIMOTO, C., HENDRICK, J.P., HINTERBERGER, M., KRIKELES, M., LERNER, M.R., MOUNT, S.M., PETERSSON, I., RINKE, J., ROSA, M.D., i WOLIN, S.L. (1982) Structure and function of small ribonucleoprotein from eucaryotic cells. En "Primary and Tertiary Structure of Nucleic Acids and Cancer Research" (Ed. per Miwa, M. i col.), *Japan Sci. Soc. Press Tokyo*, pp. 101-10.
138. STEITZ, J.A., WOLIN, S.L., RINKE, J., PETERSSON, I., MOUNT, S.M., LERNER, E.A., HINTERBERGER, M., i GOTTLIEB, E. (1982) Small ribonucleoprotein from eucaryotes: structures and roles in RNA biogenesis. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* 47:893-900.
139. STOLLAR, B.D. (1981) Anti-DNA antibodies. *Clin. Immunol. Allergy* 1:243-260.
140. TAKASAKI, Y., FISHWILD, D. i TAN, E.M. (1984) Characterization of proliferating cell nuclear antigen recognized by autoantibodies in lupus sera. *J. Exp. Med.* 159:981-982.
141. TAN, E.M. i KUNKEL, H.G. (1966) Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 96:464-471.
142. TAN, E.M. i LERNER, R.A. (1972) An immunobiological study of the fates of nuclear and nucleolar macromolecules during the cell cycle. *J. Mol. Biol.* 68:107-114.
143. TAN, E.M., RODMAN, G.P., GARCIA, I., MOROI, Y., FRITZLER, M.J. i PEEBLES, C. (1980) Diversity of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis: anticentromere antibody and its relationship to CREST syndrome. *Arthritis Rheum.* 23:617-625.
144. TAN, E.M. (1982) Autoantibodies to nuclear antigens (ANA) their immunobiology and medicine. *Adv. Immunol.* 33:167-240.
145. TARGOFF, I.N., RACHU, G. i REICHLIN, M. (1983) Antibodies to Mi-1 in SLE: relationship to other precipitins and reaction with bovine immunoglobuline. *Clin. Exp. Immunol.* 53:76-82.
146. TEPPO, A.M., GRIPENBERG, M., KURKI, P., BAKLIEN, K., HELVE, T. i WEGELIUS, O. (1982) Purification and characterization of a SS-B antigen. *Scand. J. Immunol.* 15:1-17.
147. THOMAS, J.O., WILSON, C.M. i HARDIN, J.A. (1984) The major core histone antigenic determinants in systemic lupus erythematosus are the trypsin-sensitive regions. *FEBS Lett.* 169:90-96.
148. TRIMMAPPAYA, B., WEIMBERGER, C., SCHNEIDER, R.M. i SHENK, T. (1982) Adenovirus VAI RNA required for efficient translation of viral mRNAs at late time after infection. *Cell* 32:543-551.
149. VAN VENROOIJ, W.J. i HABETS, W.J. (1985) Detection of nuclear antigens recognized by human autoantibodies. *Scand. J. Rheumatol.* 56:(suppl) 32-41.
150. VENABLES, P.J.W., CHARLES, P.J., BUCHANAN, R.R.C., TUNG, Y.I., MUMFORD, A., SCHRIEBER, L., ROOM, G.R.W. i MAINI, R.N. (1983) Quantitation and detection of isotypes of anti-SS-B antibodies by ELISA and FARR assays using affinity purified antigens. *Arthritis Rheum.* 26:146-155.
151. VENABLES, P.J.W., SMITH, P.R. i MAINI, R.N. (1983) Purification and characterization of Sjögren's syndrome A and B antigens. *Clin. Exp. Immunol.* 54:731-738.
152. WESTON, W.L.C., HARMON, C., PEEBLES, C., MANCHESTER, D., FRANCO, H.L., HUFF, J.C. i NORRIS, D.A. (1982) A serological marker for neonatal lupus erythematosus. *Brit. J. Dermatol.* 107:377-382.
153. WHITE, P.J. i HOCH, S.O. (1981) Definition of the antigenic polypeptides in the Sm and RNP ribonucleoprotein complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102:365-371.
154. WHITTINGHAM, S.F. (1983) A solid-phase radioimmunoassay for detection of antibodies to extractable nuclear antigens. *J. Immunol. Meth.* 61:73-81.
155. WIEBEN, E.D., MADORE, S.J. i PEDERSON, T. (1983) Protein bindings sites are conserved in

- U1snRNA from insects and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:1217-1220.
156. WILLIAMSON, G.G. i BOYLE, J.A. (1984) Antigenic relatedness of small ribonucleoprotein particles. *Biochim. Biophys. Acta* 798:149-155.
157. WILUSZ, J. i KEENE, J.D. (1984) Interactions of plus and minus strand leader RNAs of the New Jersey serotype of vesicular stomatitis virus with the cellular La protein. *Virology* 135:65-73.
158. WINN, D.M., WOLFE, F., HARMON, D. i SHARP, G.C. (1979) Characterization of a distinct nuclear acidic protein antigen (MA) and clinical findings in systemic lupus erythematosus patients with MA antibodies. *J. Clin. Invest.* 64:820-823.
159. WOLFE, J.F., ADELSTEIN, E. i SHARP, G.C. (1977) Antinuclear antibody with distinct specificity for polymyositis. *J. Clin. Invest.* 59:176-178.
160. WOLIN, S.L. i STEITZ, J.A. (1983) Genes for two small cytoplasmic Ro RNAs are adjacent and appear to be single copy in the human genome. *Cell* 32:735-744.
161. WOLIN, S.L. i STEITZ, J.A. (1983) The Ro small cytoplasmic ribonucleoprotein particles: structures and clues to function. *J. Cell. Biol.* 97:7a.
162. WOLIN, S.L. i STEITZ, J.A. (1984) The Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins: identification of the antigenic protein and its binding site on the Ro RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1996-2000.
163. WOOLEY, J.C., ZUKERBERG, L.R. i CHUNG, S.Y. (1983) Polypeptide components of human small nuclear ribonucleoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:5208-5212.
164. YAMAGATA, H., HARLEY, J.B. i REICHLIN, M. (1984) Molecular properties of the Ro/SS-A antigen and ELISA for quantitation of antibody. *J. Clin. Invest.* 74:625-633.
165. YANG, V.W., LERNER, M.R., STEITZ, J.A. i FLINT, S.J. (1981) A small nuclear ribonucleoprotein is required for splicing of adenoviral early RNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1371-1375.
166. ZIEVE, G. i PENMAN, S. (1976) Small RNA species of the HeLa cell: metabolism and subcellular localization. *Cell* 8:19-31.