

Gli anticorpi miosite specifici e miosite associati nelle miopatie infiammatorie idiopatiche: studio sierologico di 46 pazienti*

Myositis specific and myositis associated autoantibodies in idiopathic inflammatory myopathies: a serologic study of 46 patients

A. Ghirardello, S. Zampieri, L. Iaccarino, E. Tarricone, M. Tonello, R. Bendo, R. Rondinone, F. Cozzi, A. Doria

Cattedra e U.O.C. di Reumatologia, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università degli Studi di Padova

SUMMARY

Objective. To characterize serum autoantibody profiles of patients with idiopathic inflammatory myopathies (IIM) by searching for myositis-specific (MSA) and myositis-associated (MAA) antibodies with sensitive and specific laboratory tests.

Methods. We tested the sera from 46 Caucasian patients diagnosed as affected with IIM at the Division of Rheumatology of Padova University (21 polymyositis, PM; 22 dermatomyositis, DM; 3 myositis overlap syndrome). All patients had definite IIM according to the criteria of Bohan-Peter. MSA including anti-tRNA synthetase (anti-Jo-1 and others) and anti-Mi-2 were determined by RNA immunoprecipitation and a modified immunoblot test, respectively. MAA (-U1RNP, -U2RNP, RoRNP, PM/Scl, Ku) were detected by counterimmunoelectrophoresis and immunoblot.

Results. Serum MSA and/or MAA were found in 30/46 (65%) patients with IIM. Twenty-three patients (50%) were positive for at least one MSA: anti-Jo-1 in 15 (33%), anti-Mi-2 in 6 (13%), and other anti-tRNA synthetase in 3 (6%). One patient was anti-Jo-1/Mi-2 positive. Moreover, 18 patients (39%) were positive for at least one MAA: anti-Ro/SSA in 13 (28%), anti-U1RNP in 4 (9%), anti-PM/Scl in 1 (2%) and anti-Ku in 1 (2%). Coexisting MSA and MAA were observed in 8 patients (17%), anti-Jo-1/SSA positive in most cases. Anti-Jo-1 was predominantly associated with PM (57% in PM vs 14% in DM), whereas anti-Mi-2 was exclusively found in DM patients (27%). Anti-synthetase antibodies were closely associated with interstitial lung disease and polyarthritis; anti-Mi-2 positive DM patients did not have lung involvement. Notably, anti-Ro/SSA antibody was frequently observed and almost equally detected in either PM or DM (about 30%); in more than 50% of cases the antibody was associated with one MSA.

Conclusions. By means of analytically reliable methods, MSA was detected in 50% of our IIM patients. Searching for MSA in patients with IIM is recommended because of its diagnostic and prognostic value.

INTRODUZIONE

Le miositi o miopatie infiammatorie idiopatiche sono malattie reumatiche sistemiche ad eziologia sconosciuta che colpiscono elettivamente il

tessuto muscolare scheletrico. Clinicamente si manifestano con astenia muscolare ingravescente ai cingoli e aumentati livelli sierici degli enzimi muscolari (creatinchinasi, aldolasi, lattico deidrogenasi). Queste manifestazioni sono accompagnate da alterazioni elettromiografiche ed istopatologiche caratteristiche (1, 2). Si distinguono tre forme di miosite idiopatica: la polimiosite (PM), la dermatomiosite (DM) e la miosite da corpi inclusi (2). Nella DM, oltre all'impegno muscolare, si osservano lesioni cutanee patognomoniche o caratteristiche, quali ad esempio le papule di Gottron, il segno di Gottron, il rash eliotro-

*Lavoro premiato al XL Congresso SIR, Udine 2003.

Indirizzo per la corrispondenza:

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

Tabella I - Gli autoanticorpi nelle miositi.

Miosite-specifici	Miosite-associati
<ul style="list-style-type: none"> • Anti-Jo-1 (istidil-tRNA sintetasi) • Altri anti-aminoacil tRNA sintetasi • Anti-Mi-2 • Anti-SRP 	<ul style="list-style-type: none"> • Anti-RoRNP • Anti-PM/Scl • Anti-U1snRNP • Anti-Ku

po periorbitale, le teleangiectasie periungueali (3). Da segnalare che la DM può talvolta esordire senza segni di miosite e che all'esordio della malattia le manifestazioni cutanee possono non essere specifiche (3, 4).

Le caratteristiche istopatologiche e l'alta frequenza di autoanticorpi nel siero dei pazienti suggeriscono che l'autoimmunità possa giocare un ruolo importante nella PM e nella DM; viceversa, si ritiene che la risposta immune nella miosite da corpi inclusi sia secondaria ad alterazioni degenerative delle fibre muscolari, dimostrate dalla presenza di vacuoli citoplasmatici, contenenti proteine quali la β -amiloid e l'apolipoproteina E.

Autoanticorpi sierici non-organo specifici si rinvencono nell'60-80% dei pazienti affetti da PM/DM. Tali anticorpi non sono diretti verso antigeni propri dei tessuti muscolari, bensì verso complessi intracellulari ubiquitari, nucleari o citoplasmatici. Essi riconoscono epitopi altamente conservati e talvolta possono inibire *in vitro* la funzione biologica del target antigenico.

Gli anticorpi clinicamente più importanti vengono distinti in due gruppi in base alla loro specificità per la diagnosi di miosite: gli anticorpi miosite-specifici (MSA) e miosite-associati (MAA) (Tab. I). I MSA sono appunto specifici per le miositi idiopatiche; i MAA si associano alle miositi idiopatiche, secondarie o in overlap con altre connettiviti, ma non sono specifici essendo riscontrabili anche in altre connettiviti senza impegno muscolare infiammatorio (5-7).

Globalmente i MSA sono descritti in più del 40% dei pazienti con PM/DM e comprendono anticor-

pi diversi per caratteristiche di specificità antigenica e significato clinico. La classificazione dei pazienti con miosite autoimmune sulla base del profilo degli MSA proposta recentemente da Love LA et al. (8) permette di identificare gruppi di pazienti con caratteristiche cliniche, sierologiche ed immunogenetiche simili (Tab. II) (9). I principali autoantigeni target della risposta anticorpale miosite-specifica appartengono a tre distinti gruppi proteici: le aminoacil-tRNA sintetasi, la proteina nucleare Mi-2 e il complesso proteico denominato "Signal Recognition Particle" (5, 10, 11) (Tab. I).

A tutt'oggi, per la diagnosi di PM e DM, si utilizzano ancora i criteri proposti da Bohan e Peter nel 1975 (1), ma il rilievo sierico dei MSA o dei MAA rappresenta un valido aiuto per la diagnosi, classificazione e in alcuni casi prognosi di queste malattie (8, 12, 13). Il loro riscontro consente inoltre di distinguere in fase precoce le miositi primitive o secondarie ad altre connettiviti, da quelle paraneoplastiche (14).

Per tutte queste ragioni è importante lo sviluppo, il perfezionamento e la diffusione di metodiche di laboratorio per l'identificazione dei MSA, da impiegare nella diagnostica delle miositi.

Scopo dello studio è stato di caratterizzare il profilo autoanticorpale dei pazienti affetti da miopatia infiammatoria idiopatica con l'applicazione di metodiche immunochimiche analiticamente sensibili e specifiche, e di verificarne l'utilità clinica.

PAZIENTI E METODI

Lo studio è stato condotto su una coorte di 46 pazienti affetti da miopatia infiammatoria idiopatica e seguiti presso la Cattedra e U.O.C. di Reumatologia dell'Università di Padova. Di questi, 21 avevano una diagnosi di PM, 22 di DM e 3 di miosite in connettivite da sovrapposizione secondo i criteri di Bohan e Peter (1). Si trattava di 31 donne e 15 uomini, età mediana 51 anni (range 18-80), durata

Tabella II - Sindromi associate agli anticorpi miosite specifici.

Anticorpi	Quadro clinico
Anti-Jo-1 e altri anti-sintetasi	<i>Sindrome antisintetasi</i> : esordio acuto, interstiziopatia polmonare, febbre, Raynaud, artrite, "mechanic's hands"; risposta moderata alla terapia
Anti-Mi-2	<i>Dermatomiosite</i> : esordio acuto, rash cutaneo; prognosi favorevole e buona risposta alla terapia
Anti-SRP	<i>Polimiosite severa</i> : esordio acuto, astenia importante, impegno cardiaco; scarsa risposta alla terapia

mediana di malattia dall'esordio 60 mesi (range 1-264 mesi). Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad esame elettromiografico e biopsia muscolare. Nei pazienti con DM l'impegno cutaneo era rappresentato da: rash eliotropo, placche e/o segno di Gottron o altre forme di eritema. In 19 pazienti (41%) erano presenti segni di pneumopatia interstiziale sulla base di reperti radiologici e/o funzionali.

I MSA anti-tRNA sintetasi (-Jo-1 e altri) sono stati determinati su siero mediante immunoprecipitazione di RNA. In aggiunta, l'anti-Jo-1 è stato ricercato anche con la controimmunolettroforesi (15) su estratto di timo di coniglio e l'immunoblotting su estratto citoplasmatico di cellule Raji (16). L'MSA anti-Mi-2 è stato determinato con una metodica di immunoblotting modificata. Gli MAA (-U1RNP, -U2RNP, -Ro/SSA, -La/SSB, -PM/Scl, -Ku) e altri anticorpi antinucleo diretti contro antigeni proteici sono stati ricercati con la controimmunolettroforesi su estratto di timo di coniglio e milza umana e l'immunoblotting su estratti nucleare e citoplasmatico di cellule Raji (17, 18).

Determinazione degli anticorpi anti-aminocil tRNA sintetasi

Gli anticorpi anti-tRNA sintetasi sono stati rilevati nel siero attraverso l'immunoprecipitazione indiretta del tRNA bersaglio secondo il metodo descritto da Forman MS. et al. (19) con alcune modifiche. Cellule Jurkat (linea continua umana T linfoide) sono state lisate in tampone Tris/0,5% Nonidet P-40 (NP-40) (20) e l'RNA è stato immunoprecipitato con il siero dei pazienti precedentemente legato a biglie di sefariosio coniugate alla proteina-A (protein A Sepharose CL-4B, Amersham Biosciences Europe GmbH, Cologno Monzese, MI). In particolare, per ogni immunoprecipitazione sono stati usati 20 µl di siero e 10 µl di biglie di proteina A-sefariosio risospese al 50% in PBS. L'incubazione è avvenuta per un'ora a temperatura ambiente in rotazione testa-coda in tampone di immunoprecipitazione IPP 500 (10 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl, 0,05% NP-40). Dopo i lavaggi in tampone IPP 500, l'anticorpo coartato alle beads è stato incubato con il lisato cellulare ottenuto come descritto. Per ogni immunoprecipitazione è stato usato un volume di lisato cellulare pari a 9×10^6 cellule. L'incubazione è avvenuta per due ore a 4°C, in rotazione testa-coda in tampone di immunoprecipitazione IPP 150 (10 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0,05% NP-40). Dopo i lavaggi in IPP 150, il tRNA immunoprecipitato è stato quindi estratto con una miscela di fe-

nolo/cloroformio/alcool isoamilico (ratio 25:24:1) (Sigma Chemical Company, Sigma-Aldrich, Milano) e successivamente precipitato con Na Acetato 0.3 M ed etanolo assoluto a -20°C in overnigh. Gli immunoprecipitati sono stati risolti mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide al 7% ed Urea 8M e la reazione visualizzata tramite colorazione del gel con Nitrato d'Argento secondo il metodo descritto da Merrill C. et al. (21) e modificato da Salviati G. et al (22). Sensibilità e specificità analitica del metodo sono state valutate con sieri di riferimento anti-sintetasi fornitoci dal Prof. WJ van Venrooij dell'Università di Nijmegen, The Netherlands.

Determinazione dell'anticorpo anti-Mi-2

L'anticorpo anti-Mi-2 è stato ricercato su siero con una metodica di Western immunoblotting opportunamente modificata, utilizzando come antigene estratto nucleare di cellule Raji (linea continua umana B linfoide) e valutando la sensibilità e specificità analitica del metodo con un siero di riferimento fornitoci dal Prof. WJ van Venrooij.

Le cellule sono state coltivate in terreno RPMI 1640 completo, addizionato con siero fetale di vitello scomplementato, penicillina e streptomycina. I tamponi usati per l'estrazione proteica contenevano una miscela di inibitori delle proteasi (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Dopo due lavaggi con tampone fosfato (PBS, Na fosfato 10mM, NaCl 150 mM, pH 7,4), le cellule sono state risospese in tampone fosfato ipotonico (Na fosfato 10mM, NaCl 10 mM, pH 7,4) contenente 0,5% Triton X-100 (100×10^6 cellule/ml), per 10-15 minuti in ghiaccio. Quindi i nuclei sono stati pellettati per centrifugazione (5000 rpm, 15 min., 4°C) e il surnatante eliminato. I nuclei isolati sono stati risospesi in tampone fosfato ipertonico freddo (Na fosfato 10mM, NaCl 350 mM, pH 7,4) (10^8 nuclei/ml), lasciati in ghiaccio per 10-15 minuti e quindi sottoposti a sonicazione (6 pulse da 40 watt per 10 secondi). Il materiale nucleare è stato pellettato per centrifugazione (5000 rpm, 15 min., 4°C) e il supernatante, corrispondente alla frazione arricchita in proteine nucleari, raccolto e conservato a -20°C fino al momento dell'utilizzo.

L'estratto proteico nucleare è stato separato mediante elettroforesi denaturante su gel di poliacrilamide (SDS-PAGE, running gel 12x12x0,15 cm) al 7% (range ottimale di pesi molecolari risolti 70-250 kDa) caricando 2×10^6 equivalenti cellulari/cm di lunghezza del gel. Dopo separazione, le proteine sono state elettrotrasferite su nitrocellulosa me-

dante Western blotting overnight a corrente costante. A trasferimento avvenuto, la nitrocellulosa è stata tagliata in strip lungo il senso di migrazione proteica e queste saturate con soluzione proteica blocking (5% latte in polvere in tampone PBS/0,1% NP-40) per almeno 1 ora a T ambiente. Dopodiché, ciascuna strip è stata incubata con il siero del paziente diluito 1/1000 in tampone blocking (3 ore a T amb.), sottoposta quindi a tre lavaggi da 5 minuti ciascuno con tampone blocking, e quindi incubata (1 ora, T amb.) con antisiero anti-IgG umane coniugato con perossidasi (Sigma-Aldrich) diluito 1/5000 in tampone blocking. Dopo altri tre lavaggi, l'anticorpo legato è stato visualizzato mediante chemiluminescenza.

Analisi statistica

I dati sono stati analizzati statisticamente mediante il test esatto di Fisher. Valori di $p < 0,05$ sono stati considerati significativi.

RISULTATI

Le figure 1 e 2 mostrano l'immunoprecipitazione di RNA applicata alla identificazione degli anticorpi anti-tRNA sintetasi. La figura 3 è rappresentativa di un test in immunoblotting impiegato per la ricerca dell'anticorpo anti-Mi-2 sui sieri di 16 pazienti: 4 di essi sono risultati anti-Mi-2 positivi. Anticorpi sierici MSA e/o MAA sono stati trovati in 30/46 pazienti (65%). In particolare, i MSA erano presenti in 23 pazienti (50%), i MAA in 18 (39%). Tra i MSA ricercati, l'anti-Jo-1 era presente in 15 casi (33%), altri anti-tRNA sintetasi in 3 (6%), l'anti-Mi-2 in 6 (13%). Un paziente era positivo per anti-Jo-1 e anti-Mi-2.

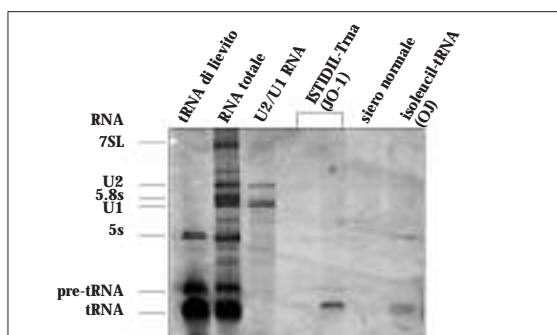


Figura 1 - Immunoprecipitazione di RNA.

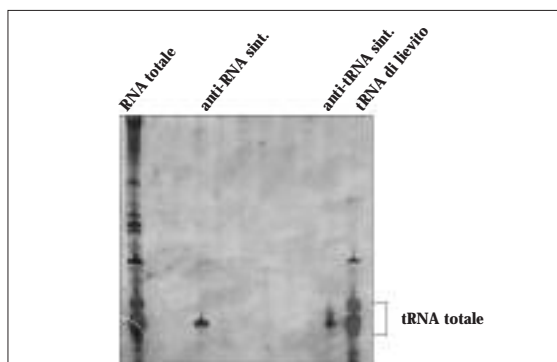


Figura 2 - Immunoprecipitazione di RNA: determinazione degli anticorpi anti-aminoacil tRNA sintetasi.

Tra gli MAA, l'anti-Ro/SSA era presente in 13 pazienti (28%), l'anti-U1RNP in 4 (9%) di cui uno anti-U1/U2RNP positivo e un altro anti-U1RNP/Ku positivo, l'anti-PM/Scl in 1 (2%). I MSA erano presenti in associazione a MAA in 8/46 pazienti (17%): di questi 6 erano anti-Jo-1/SSA positivi, uno anti-tRNA sintetasi/SSA positivo e uno anti-Mi-2/SSA positivo. Dieci pazienti (21%) erano positivi solo per MAA. Le frequenze dei MSA e MAA nelle varie forme

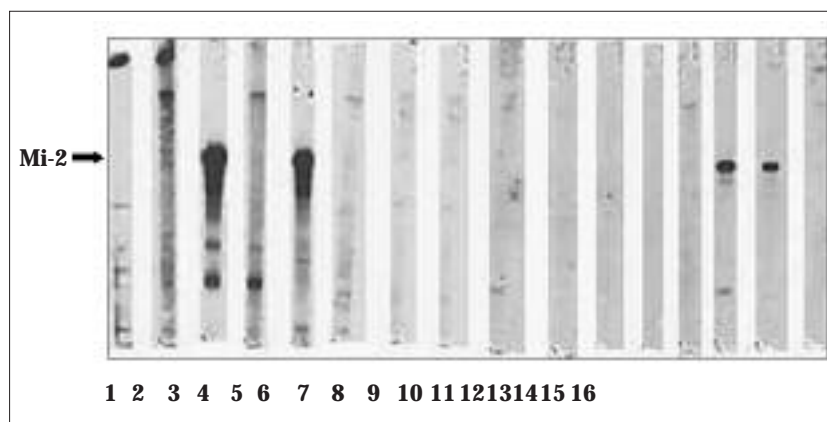


Figura 3 - Determinazione dell'anticorpo anti-Mi-2 all'immunoblotting nei sieri di 16 pazienti. Le strip nr. 3, 5, 14 e 15 corrispondono ai sieri di 4 pazienti anti-Mi-2 positivi.

Tabella III - Frequenza (%) dei MSA e MAA nelle varie forme di miopatia infiammatoria idiopatica (PM, DM, overlap).

Test	Paz. Totali (n=46)	Percentuale di pazienti		
		PM (n=21)	DM (n=22)	Overlap (n=3)
ANA	56	39	67	100
Anti-Jo-1	33	57	14	0
Altri antisintetasi	6	9	4	0
Anti-Mi-2	13	0	27	0
Anti-Ro/SSA	28	38	23	0
Anti-PM-Scl	2	0	0	33
Anti-U1RNP	9	5	4	67
Anti-Ku	2	0	0	33

ANA: anticorpi antinucleo; IFI: immunofluorescenza indiretta; IB: immunoblotting; IP: immunoprecipitazione di RNA; CIE: controimmunolettroforesi

di miosite sono riportate in tabella III. L'anticorpo anti-Jo-1 era più frequente nei pazienti con PM ($p=0,004$, odds ratio 8,444, 95% CI 1.886-37.602), l'anti-Mi-2 è risultato esclusivo di DM. L'anticorpo anti-Ro/SSA è stato trovato in circa il 30% dei casi, sia tra i casi con PM che tra quelli con DM; tranne due pazienti anti-U1RNP positivi rispettivamente affetti da PM e DM, gli altri pazienti anti-U1RNP, -PM/Scl o anti-Ku positivi avevano un quadro di connettivite da sovrapposizione con miosite.

Gli anticorpi anti-tRNA sintetasi (anti-Jo-1 e altri) sono risultati significativamente associati ad interstiziopatia polmonare ($p=0,009$, odds ratio 9,533, 95% C.I. 2,4-37,5) e a poliartrite ($p=0,005$, odds ratio 11,96, 95% C.I. 2,9-49,1). Tutti i pazienti anti-Mi-2 positivi presentavano le manifestazioni cutanee specifiche di DM e nessuno aveva segni radiografici e/o funzionali di impegno polmonare.

DISCUSSIONE

La messa a punto di metodiche di laboratorio per la caratterizzazione della risposta autoimmune nelle miositi è un obiettivo di grande interesse sul piano clinico ed è anche utile per la comprensione di alcuni aspetti eziologici e patogenetici di tali malattie.

In questo lavoro descriviamo due tecniche di laboratorio, messe a punto allo scopo di incrementare l'utilità clinica delle indagini autoanticorpali nella diagnostica delle miositi.

Tra i MSA, l'unico determinabile con le tecniche impiegate nella routine diagnostica è l'anti-istidil-tRNA sintetasi (anti-Jo-1), di gran lunga il più frequente (20-30%) (5, 8) e associato preferenzial-

mente alla PM (23), e i nostri dati lo confermano. Tuttavia l'anticorpo anti-Jo-1 è solo uno dei 7 anticorpi anti-aminoacil tRNA sintetasi descritti (24), ben distinguibili per specificità antigenica e accomunati dal fatto di essere marker di miosite ed in particolare della cosiddetta "sindrome antisintetasi" (24, 25) (Tab. II). Gli altri anti-sintetasi sono al momento descritti nelle miositi con una frequenza molto più bassa (3-5%) (5) ma sono ugualmente importanti vista la loro specificità clinica.

Il metodo di riferimento per la determinazione degli anticorpi anti-tRNA sintetasi è l'immunoprecipitazione di RNA, metodica non automatizzabile e allestibile solo in laboratori di ricerca o di diagnostica avanzata. Tale metodica consente di rivelare le molecole di RNA immunoprecipitate da quegli anticorpi che, in fase liquida, legano complessi ribonucleoproteici. L'RNA può essere immunoprecipitato direttamente dall'anticorpo, per legame diretto di quest'ultimo all'acido ribonucleico, o indirettamente perché complessato all'antigene proteico target. Nella maggior parte dei casi i tRNA vengono immunoprecipitati indirettamente perché legati all'enzima tRNA sintetasi, l'antigene bersaglio.

Sulla base della nostra esperienza, l'immunoprecipitazione indiretta dei tRNA da estratto cellulare non radiomarcato, messa a punto per la determinazione degli anticorpi anti-tRNA sintetasi, ha dimostrato una sensibilità sovrapponibile a quella dei comuni metodi di screening per la determinazione degli anticorpi anti-Jo-1 con il vantaggio aggiuntivo di poter caratterizzare anche anticorpi diretti contro tRNA sintetasi non Jo-1 e di non richiedere l'impiego di radioisotopi. I nostri risultati confermano inoltre la stretta associazione degli anticorpi anti-sintetasi con le manifestazioni peculiari

della sindrome antisintetasi quali la miosite, l'interstiziopatia polmonare e la poliartrite.

Anche l'MSA anti-Mi-2 è un anticorpo molto importante nella diagnostica delle miositi ma poco ricercato e scarsamente conosciuto nella pratica clinica. L'antigene Mi-2 è una proteina nucleare costituita da 7 subunità, appartenente ad un complesso multi-proteico denominato NuRD che partecipa alla regolazione della trascrizione genica attraverso il rimaneggiamento dei nucleosomi nella cromatina (26, 27). I sieri anti-Mi-2 positivi immunoprecipitano 8 proteine di diverso peso molecolare (240, 200, 150, 72, 65, 63, 50 e 34 kDa) (28, 29). Di queste l'antigene immunodominante è il polipeptide di 240 kDa (28, 29).

Gli anticorpi anti-Mi-2 possono essere determinati con varie tecniche di laboratorio: immunoblotting, immunoprecipitazione di proteine da estratto radiomarcato, immunoblotting di immunoprecipitati, dot-blot o line immunoassay, ELISA (5, 26, 27). Si tratta di metodiche impiegate per ricerca e non validate per lo screening sierologico. La metodica di immunoblotting messa a punto presso il nostro laboratorio è stata opportunamente modificata per la ricerca degli anticorpi anti-Mi-2 e prevede una particolare estrazione dell'antigene nucleare Mi-2, seguita da una elettroforesi denaturante che consenta una ottimale separazione delle proteine nel range di peso molecolare di 70-250 kDa.

L'anticorpo anti-Mi-2 è marker specifico di DM con una sensibilità pari al 20% circa e si associa ge-

neralmente alle forme ad esordio acuto, prognosi favorevole e buona risposta alla terapia (5, 9, 30) (Tab. II). Il 95% circa dei pazienti anti-Mi-2 positivi presenta l'impegno cutaneo caratteristico della DM (30).

La frequenza degli anticorpi anti-Mi-2 trovata nella nostra coorte di pazienti con la metodica descritta è risultata sovrapponibile a quella riportata in letteratura; inoltre, i pazienti anti-Mi-2 positivi avevano tutti una diagnosi di DM e non presentavano segni di pneumopatia interstiziale, a conferma dell'alta specificità dell'anticorpo.

Per quanto riguarda i MAA, globalmente essi sono stati trovati con una frequenza inferiore a quella degli MSA e spesso in associazione ad un anticorpo miosite specifico. Quindi il loro significato clinico nella diagnostica delle miositi è considerevolmente minore, anche in virtù della loro bassa specificità. Degna di nota è la frequenza degli anticorpi anti-Ro/SSA che, sia nella PM che nella DM, si aggira intorno al 25-30%, ma il cui significato clinico resta da approfondire.

In conclusione, l'impiego di metodiche analiticamente sensibili e specifiche per la ricerca degli MSA aumenta l'utilità clinica della diagnostica sieroimmunologica nelle miositi autoimmuni. Infatti, l'approccio metodologico da noi proposto ha consentito di identificare gli anticorpi anti-sintetasi e anti-Mi-2 nel 50% dei pazienti con miosite autoimmune e di individuare subset di malattia con caratteristiche cliniche e prognostiche distinte.

RIASSUNTO

In questo lavoro descriviamo due metodiche per la caratterizzazione degli anticorpi miosite specifici anti-aminoacil-tRNA sintetasi e anti-Mi-2, messe a punto presso il nostro laboratorio allo scopo di incrementare l'utilità diagnostica delle indagini sieroimmunologiche nelle miopatie infiammatorie idiopatiche. Tale approccio analitico, applicato alla caratterizzazione del profilo anticorpale di 46 pazienti con miosite autoimmune, ci ha consentito di identificare anticorpi miosite specifici nel 50% dei pazienti e di individuare subset di malattia con caratteristiche cliniche e prognostiche distinte.

Parole chiave - Miosite, tRNA sintetasi, Mi-2, RNA immunoprecipitazione, immunoblotting.

Key words - *Myositis, tRNA synthetase, Mi-2, RNA immunoprecipitation, immunoblotting.*

BIBLIOGRAFIA

- Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis. *New Engl J Med* 1975; 13: 344-6.
- Dalakas MC. Polymyositis, dermatomyositis and inclusion body myositis. *N Eng J Med* 1991; 325: 1487-98.
- Euwer RL, Sontheimer RD. Dermatologic aspects of myositis. *Curr Opin Rheumatol* 1994; 6: 583-9.
- Rockerbie NR, Woo TY, Callen JP, Giustina T. Cutaneous changes of dermatomyositis precede muscle weakness. *J Am Acad Dermatol* 1989; 20: 629-32.
- Brouwer R, Hengstman GJ, Vree Egberts W, Ehrfeld H, Bozic B, Ghirardello A, et al. Autoantibodies profiles in the sera of European patients with myositis. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 116-23.
- Franceschini F, Cavazzana I, Generali D, Quinzanini

- M, Viardi L, Ghirardello A, et al. Anti-Ku antibodies in connective tissue diseases: clinical and serological evaluation of 14 patients. *J Rheumatol* 2002; 29: 1393-7.
7. Rutjes SA, Vree Egberts WTM, Jongen P, van den Hoogen F, Pruijn GJM, van Venrooij WJ. Anti-Ro52 antibodies frequently co-occur with anti-Jo-1 antibodies in sera from patients with idiopathic inflammatory myopathy. *Clin Exp Immunol* 1997; 109: 32-40.
 8. Love LA, Leff RL, Fraser DD, Targoff IN, Dalakas M, Plotz PH, et al. A new approach to the classification of idiopathic inflammatory myopathy: myositis-specific autoantibodies define useful homogeneous patient groups. *Medicine (Baltimore)* 1991; 70: 360-74.
 9. Plotz PH, Rider LG, Targoff IN, Raben N, O'Hanlon TP, Miller FW. NIH conference. Myositis immunologic contributions to understanding cause, pathogenesis and therapy. *Ann Intern Med* 1995; 122: 715-24.
 10. Targoff IN. Immune manifestations of inflammatory muscle disease. *Rheum Dis Clin North Am* 1994; 20: 857-80.
 11. Zampieri S, Ghirardello A, Rossini K, Iaccarino L, Gambari PF, Doria A. Autoantibodies in idiopathic inflammatory myopathies. *Basic Appl Myol* 2002; 12: 27-31.
 12. Targoff IN, Miller FW, Medsger TA Jr, Oddis CV. Classification criteria for the idiopathic inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatol* 1997; 9: 527-35.
 13. Hengstman GJ, Brouwer R, Egberts WT, Seelig HP, Jongen PJ, van Venrooij WJ, et al. Clinical and serological characteristics of 125 Dutch myositis patients. Myositis specific autoantibodies aid in the differential diagnosis of the idiopathic inflammatory myopathies. *J Neurol* 2002; 249: 69-75.
 14. Hill CL, Zhang Y, Sigurgeirsson B, Pukkala E, Mellemkjaer L, Airio A, et al. Frequency of specific cancer types in dermatomyositis and polymyositis: a population based study. *Lancet* 2001; 357: 96-100.
 15. Bunn CC, Gharavi AE, Hughes GRV. Antibodies to extractable nuclear antigens in 173 patients with DNA-binding positive SLE: association between antibodies to ribonuclear protein and Sm antigens observed by counterimmunoelectrophoresis. *J Clin Lab Immunol* 1982; 8: 13-20.
 16. Ghirardello A, Doria A, Zampieri S, Gerli R, Rapizzi E, Gambari P.F. Anti-ribosomal P protein antibodies detected by immunoblotting in patients with connective tissue diseases: their specificity for SLE and association with IgG anticardiolipin antibodies. *Ann Rheum Dis* 2000; 59: 875-81.
 17. Ghirardello A, Doria A, Vesco P, Vaccaro E, Bernardi C, Catani C, et al. Blotting patterns of IgG anti-(U1)RNP antibodies in mixed connective tissue disease. *Rheumatol Int* 1996; 16: 145-50.
 18. Zampieri S, Ghirardello A, Doria A, Tonello M, Bendo R, Rossini K, et al. The use of Tween 20 in immunoblotting assays for the detection of autoantibodies in connective tissue diseases. *J Immunol Methods* 2000; 239: 1-11.
 19. Forman MS, Nakamura M, Mimori T, Gelpi C, Hardin J. Detection of antibodies to small nuclear ribonucleoproteins and small ribonucleoproteins using unlabeled extracts. *Arthritis Rheum* 1985; 28: 1356-61.
 20. Zampieri S, Degen W, Ghirardello A, Doria A, van Venrooij WJ. Dephosphorylation of autoantigenic ribosomal P proteins during Fas-L induced apoptosis: a possible trigger for the development of the autoimmune response in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 72-6.
 21. Merrill C, Goldman D, Sedman S, Ebert M. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variations in cerebrospinal fluid proteins: *Science* 1981; 211: 1437-8.
 22. Salviati G, Betto R, Danieli Betto D. Polymorphism of myofibrillar proteins of rabbit skeletal-muscle fibers. An electrophoretic study of single fibers. *Biochem J* 1982; 207: 261-72.
 23. Reichlin M, Arnett Jr FC. Multiplicity of antibodies in myositis sera. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 1150-6.
 24. Imbert-Masseau A, Hamidou M, Agard C, Grolleau J-Y, Cherin P. Antisynthetase syndrome. *Joint Bone Spine* 2003; 70: 161-8.
 25. Marguerie C, Bunn CC, Beynon HL, Bernstein RM, Hughes JM, So AK, et al. Polymyositis, pulmonary fibrosis and autoantibodies to aminoacyl-tRNA synthetase enzymes. *Q J Med* 1990; 77: 1019-38.
 26. Seelig HP, Moosbrugger I, Ehrfeld H, Fink T, Renz M, Genth E. The major dermatomyositis-specific Mi-2 autoantigen is a presumed helicase involved in transcriptional activation. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 1389-99.
 27. Zheng Y, LeRoy G, Seelig HP, Lane WS, Reinberg D. The dermatomyositis-specific autoantigen Mi-2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell* 1998; 95: 279-89.
 28. Nilasena DS, Trieu EP, Targoff IN. Analysis of the Mi-2 autoantigen of dermatomyositis. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 123-8.
 29. Ge Q, Nilasena DS, O'Brien CA, Frank MB, Targoff IN. Molecular analysis of a major antigenic region of the 240-Kd protein of Mi-2 autoantigen. *J Clin Invest* 1995; 96: 1730-7.
 30. Targoff IN, Reichlin M. The association between Mi-2 antibodies and dermatomyositis. *Arthritis Rheum* 1985; 28: 796-803.