

# Autoanticorpi anti-RNA polimerasi III: un nuovo test diagnostico per la sclerodermia

R. Tozzoli<sup>a</sup>, G. Kodermaz<sup>a</sup>, G. Morozzi<sup>b</sup>, V. Codullo<sup>c</sup>, S. Platzgummer<sup>d</sup>, E. Tonutti<sup>e</sup>, M. Tampoia<sup>f</sup>,  
D. Bassetti<sup>g</sup>, N. Bizzaro<sup>h</sup>, A. Ruffatti<sup>i</sup>, G. Valesini<sup>l</sup>, A. Tincani<sup>m</sup>, G. De Leopardi<sup>n</sup>, O. De Pità<sup>o</sup>

<sup>a</sup>Dipartimento dei Servizi, Laboratorio Analisi, Ospedale di Latisana (UD)

<sup>b</sup>Reumatologia, Università di Siena

<sup>c</sup>Reumatologia, Università di Pavia

<sup>d</sup>Laboratorio Centrale, Ospedale di Merano (BZ)

<sup>e</sup>Immunopatologia e Allergologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Udine

<sup>f</sup>Laboratorio di Patologia Clinica I, Policlinico di Bari

<sup>g</sup>Laboratorio di Patologia Clinica II, Azienda Ospedaliera di Trento

<sup>h</sup>Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale di Tolmezzo (UD)

<sup>i</sup>Reumatologia, Università di Padova

<sup>l</sup>Reumatologia, Università La Sapienza di Roma

<sup>m</sup>Reumatologia e Immunologia Clinica, Università di Brescia

<sup>n</sup>Dipartimento di Medicina Interna, Università di Firenze

<sup>o</sup>Laboratorio di Immunologia, Istituto Dermatologico dell'Immacolata di Roma

## Forum Interdisciplinare per la Ricerca nelle Malattie Autoimmuni (FIRMA)

### Riassunto

**Premesse.** La sclerodermia è patologia autoimmune caratterizzata dalla presenza di autoanticorpi specifici, anti-topoisomerasi I (anti-topo I) e anticentromero (ACA); tuttavia il 50% dei pazienti sclerodermici non presenta questi autoanticorpi, ma solo anticorpi nucleolari (anti-RNA-polimerasi, anti-PM/Scl, anti-Th/To, anti-fibrillarina) rilevabili con metodi non commerciali e a fini di ricerca. Gli scopi del presente lavoro sono stati: a) valutare la sensibilità di un nuovo test ELISA per la ricerca degli anticorpi anti-RNA polimerasi (RNAP) III in pazienti sclerodermici; b) valutare la sensibilità diagnostica degli anti-RNAP in soggetti sclerodermici sieronegativi per autoanticorpi maggiori; c) confrontare i risultati con quelli forniti dal metodo di riferimento (radio-immunoprecipitazione, RIPA) e d) correlare la loro presenza con i quadri clinici e di fluorescenza anti-nucleare, specifici della malattia.

**Metodi.** Sono stati studiati complessivamente 395 pazienti, di cui 207 affetti da sclerodermia e 188 pazienti di controllo. È stato impiegato un metodo immunoenzimatico in fase solida, che utilizza come antigene RNA polimerasi ricombinante. Come metodo di confronto è stato impiegato il metodo RIPA home-made con <sup>35</sup>S-metionina.

**Risultati.** Mediante l'analisi delle curve ROC,

sono stati definiti due valori soglia di positività: uno a 12 U/mL a cui corrisponde la miglior sensibilità diagnostica (sensibilità: 27.2%, specificità: 95%) e uno a 35 U/mL con migliore specificità diagnostica (sensibilità: 21.7%, specificità: 99%). Nessuno dei pazienti sclerodermici positivi per anticorpi maggiori è risultato positivo al test anti-RNA polimerasi; la presenza di questi autoanticorpi si conferma perciò mutuamente esclusiva rispetto agli autoanticorpi anti-topo I e ACA.

Il confronto con il metodo di riferimento effettuato su 91 pazienti ha prodotto una concordanza del 100%. La presenza di anti-RNA-polimerasi era associata prevalentemente con quadri fluoroscopici antinucleari di tipo granulare e nucleolare, e con la forma diffusa della malattia.

**Conclusioni.** Il test per anti-RNAP con metodo immunoenzimatico presenta un'elevata accuratezza analitica, paragonabile a quella del metodo di riferimento, e una specificità diagnostica adeguata. Con il nuovo metodo la ricerca di questa classe autoanticorpale diventa routinariamente possibile nel laboratorio clinico e consente di diagnosticare circa il 25% dei soggetti con sclerodermia sierologicamente negativi. Il valore soglia di positività emerso da questo studio è stato di 35 U/ml; valori compresi tra 12 e 34 U/mL vanno considerati dubbi ed i pazienti monitorati nel tempo.

## Summary

### Validation of a new ELISA method for the detection of RNAP III antibodies in systemic sclerosis

**Background.** Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune disease, characterized by the presence of specific autoantibodies, such as anti-topoisomerase I (anti-topo I) and anticentromere antibodies (ACA). However, about 50% of SSc patients have only anti-nucleolar antibodies (such anti-RNA-polymerase (anti-RNAP), anti-PM/Scl, anti-Th/To, antifibrillarin) which can be identified only by means of in-house methods. The aims of the present study were: a) evaluate the diagnostic accuracy of a new ELISA method for the detection of anti-RNAP in a group of SSc patients; b) evaluate the diagnostic sensitivity of anti-RNAP in patients who are negative for anti-topo I and ACA; c) estimate the concordance with the reference method (radio-immunoprecipitation assay, RIPA); and d) assess the analytical association with antinuclear fluorescence patterns and with the clinical subsets of the disease.

**Methods.** Sera from 207 patients with SSc and from 188 controls were assayed using a new ELISA method with a recombinant fragment containing the immunodominant epitope of RNA polymerase III. The

results were compared with those obtained by a home-made RIPA.

**Results.** Using the ROC curve analysis, two cut-off values were defined: 12 U/mL provided the best diagnostic sensitivity (sensitivity: 27.2%, specificity: 95%) and 35 U/mL the best nosographic specificity (sensitivity: 27.2%, specificity: 99%). None of SSc patients who were positive to anti-topo I or to ACA were also positive for anti-RNAP. The analytical concordance with the reference method was calculated in a group of 91 patients, and was 100%. High levels of anti-RNAP were associated with anti-nuclear speckled or nucleolar fluorescence patterns and with the diffuse cutaneous form of the disease.

**Conclusions.** The new anti-RNAP III ELISA method is analytically accurate and clinically specific. Testing for this type of autoantibody is now routinely available, and may help diagnosing about 25% of SSc patients who are negative to other SSc-related autoantibodies, using a positivity threshold of 35 U/mL.

**Key words:** RNA polymerase autoantibodies, Systemic sclerosis, Topoisomerase I autoantibodies, Centromere autoantibodies, ELISA, Radio-immunoprecipitation assay.

## Introduzione

La sclerodermia (sclerosi sistemica, SSc) è una severa patologia autoimmune caratterizzata da fibrosi cutanea e microvasculopatia diffusa. Segno distintivo della malattia, che contraddistingue il 90-95% dei pazienti affetti, è la presenza di autoanticorpi specifici, i principali dei quali sono costituiti dagli anticorpi anti-topoisomerasi I (anti-topo I) e anti-proteine centromeriche (ACA)<sup>1,2</sup>. Questi autoanticorpi maggiori, pur non presentando un accertato significato patogenetico<sup>3</sup>, sono utili per la diagnosi e la classificazione della malattia e vengono ampiamente utilizzati nella pratica clinica. Tuttavia la metà dei pazienti sclerodermici è sieronegativo a questi anticorpi, risultando positivo solo alla ricerca di anticorpi anti-nucleolo, tra i quali i più noti sono gli anti-Pm-Scl, gli anti-Th/To, gli anti-U3RNP/anti-fibrillarina e gli anti-RNA polimerasi (RNAP) I, II e III<sup>1,2,4</sup> (Tab. I).

Gli anticorpi anti-RNAP sono stati messi in evidenza nel siero dei pazienti sclerodermici per la prima volta nel 1983 da Stetler<sup>5</sup> e successivamente caratterizzati come immunoglobuline rivolte contro le tre classi di RNA-polimerasi presenti nelle cellule eucariotiche e umane<sup>6,7</sup>.

Le RNA polimerasi eucariotiche sono enzimi preposti alla sintesi di RNA e sono costituite da complessi macromolecolari rappresentati da numerose subunità (14 per RNAP I, 12 per RNAP II e 17 per RNAP III), due delle quali ad alto peso molecolare<sup>8</sup>; alcune di queste subunità sono specifiche per ciascuna RNAP, altre sono comuni e condivise tra RNAP I e III e tra RNAP

I, II e III. Gli anti-RNAP presenti nel siero di pazienti con sclerodermia sono eterogenei in termini di reattività verso le tre RNAP, ma presentano la comune caratteristica di riconoscere più subunità e di dimostrare cross-reattività tra le varie RNAP<sup>4,9</sup>. Il pattern di reattività più comune è quello diretto verso le RNAP I e III (anti-RNAP I/III).

Questi autoanticorpi sono considerati altamente specifici per la SSc<sup>5,6</sup>, sono i più frequenti nei pazienti sclerodermici di razza bianca e sono associati con la forma diffusa della malattia, con le crisi renali sclerodermiche e talora, con una prognosi infausta<sup>1,10</sup>.

A causa di limitazioni intrinseche connesse con i metodi immunologici più diffusi, rappresentati dall'immunofluorescenza indiretta (IFI), dall'immunodiffusione e dall'immunoblot, gli anticorpi anti-RNAP III sono dosabili solo con il metodo di radioimmunoprecipitazione (RIPA), tecnica complessa e indaginosa e non disponibile per indagini di routine. Per questo motivo questa classe autoanticorpale non viene abitualmente ricercata nei laboratori clinici a scopo diagnostico<sup>4</sup>.

Recentemente è stato identificato un epitopo immunodominante principale sulla subunità Hs-RPC155 della RNAP III, mediante tecniche di biologia molecolare<sup>11</sup> ed è stato messo a punto un metodo immunoenzimatico (ELISA) per la ricerca di anticorpi diretti contro questo epitopo<sup>12</sup>. Scopo del presente lavoro è stato di valutare l'accuratezza diagnostica e clinica di un test ELISA commerciale per la ricerca degli anti-RNAP III in pazienti sclerodermici sieronegativi per autoan-

**Tabella I.** Autoanticorpi specifici nella sclerodermia (ACA: anti-centromero; Anti-topo I: anti-topoisomerasi I; Anti-RNAP: anti-RNA polimerasi; AFA: anti-fibrillarina).

<i>Autoanticorpo</i>	<i>Frequenza (%)</i>	<i>Quadro clinico associato</i>
ACA	20-30	CREST, lcSSc
Anti-topo I	20-43	dcSSc
Anti-PM-Scl	3-8	Overlap miosite/SSc
Anti-Th/To	2-5	lcSSc
Anti-RNAP	4-25	dcSSc
AFA	2-4	dcSSc

**Tabella II.** Positività per anticorpi anti-RNAP III nei diversi gruppi di pazienti e nei controlli.

<i>Pazienti</i>	<i>Numero</i>	<i>Anti-RNAP III positivi</i>
Sclerosi sistemica		
Sclerosi sistemica anti-topo I/ACA negativi	169	46
Sclerosi sistemica anti-topo I/ACA positivi	38	0
Controlli		
Altre malattie reumatiche (LES, AR, SS, UCTD)	100	0
Malattie infettive	17	0
Soggetti sani	71	0

ticorpi maggiori, di confrontare i risultati con quelli forniti dal metodo RIPA e di correlare la loro presenza con quadri fluoroscopici e clinici specifici della malattia.

## Materiali e metodi

Lo studio è stato condotto sotto l'egida del FIRMA (Forum Interdisciplinare per la Ricerca nelle Malattie Autoimmuni) e ha interessato pazienti provenienti da otto centri italiani (Cliniche di Reumatologia delle Università di Pavia, Siena, Padova, Brescia e La Sapienza di Roma, Dipartimento di Medicina Interna dell'Università di Firenze, Istituto Dermopatico dell'Immacolata di Roma, Laboratori del Gruppo di Studio in Autoimmunologia della SIMeL).

Sono stati studiati complessivamente 395 pazienti, di cui 207 affetti da sclerodermia e 188 pazienti di controllo (Tab. II). I 207 pazienti affetti da sclerodermia (169 negativi e 38 positivi per anti-topo I e ACA) erano di razza bianca, provenivano da regioni del Nord e del Centro d'Italia (34 dal Triveneto, 98 dalla Lombardia, 33 dalla Toscana, 42 dal Lazio) ed erano stati diagnosticati secondo i criteri dell'American College of Rheumatology<sup>13</sup>. Tra i pazienti di controllo, 100 erano affetti da malattie autoimmuni (31 lupus eritematoso sistemico, 32 artrite reumatoide, 9 sindrome di Sjögren e 28 miscellanea), 17 da malattie infettive e 71 erano clinicamente sani. I pazienti affetti dalle principali malattie reumatiche erano stati classificati secondo i criteri internazionali<sup>14-16</sup>.

E' stato impiegato un metodo immunoenzimatico in fase solida (Anti-RNA Polymerase III ELISA kit, MBL, Nagoya, Giappone), che utilizza come antigene

un frammento ricombinante della subunità Hs-RPC155 della RNAP III. Nella procedura del saggio, 100 µL di campione di siero diluito vengono dispensati nei micropozzetti di una piastra di polistirene, sensibilizzati con polipeptidi ricombinanti che contengono l'epitopo immunodominante principale localizzato nella subunità RPC155<sup>11</sup>. Dopo una prima incubazione di 60 minuti e un primo lavaggio, vengono aggiunti 100 µL di anticorpo coniugato con perossidasi di rafano e lasciati reagire per ulteriori 60 minuti; al termine della seconda incubazione viene effettuato un secondo lavaggio e quindi vengono addizionati 100 µL di substrato (TMB) e incubato per ulteriori 30 minuti. Dopo l'aggiunta della soluzione bloccante (acido solforico), viene effettuata una lettura spettrofotometrica a 450 nm.

I risultati ottenuti sono espressi in unità arbitrarie (U/mL), utilizzando in parallelo alcuni calibratori costituiti da siero umano positivo per anticorpi anti-RNAP III.

Come metodo di confronto è stato impiegato un metodo RIPA home-made con estratto antigenico di cellule HeLa marcato con <sup>35</sup>S-metionina, come descritto in precedenza<sup>17</sup>. Con questo secondo metodo sono stati valutati 91 pazienti affetti da sclerodermia sul totale dei 207 considerati.

Su tutti i sieri dei pazienti sclerodermici è stata effettuata la ricerca degli anticorpi anti-nucleo (ANA) con metodo di immunofluorescenza indiretta (IFI), mediane l'impiego di diversi kit commerciali.

## Risultati

Mediante l'analisi delle curve ROC (Fig. 1), sono stati definiti due valori soglia di specificità: uno corrispondente al 95% (12 U/mL) e uno al 99% (35 U/mL). Al

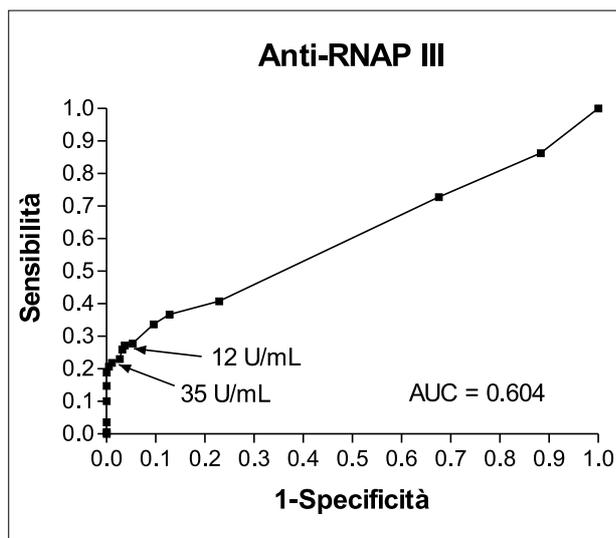


Figura 1. Curva ROC per anticorpi anti-RNAP III.

primo livello sono risultati positivi per anticorpi anti-RNAP III 46 pazienti su 169 (sensibilità diagnostica: 27.2%) e al secondo, 37 su 169 (sensibilità diagnostica: 21.9%) (Fig. 2).

Il confronto con il metodo di riferimento su 91 pazienti sclerodermici ha prodotto una concordanza del 100%, utilizzando la soglia a massima specificità (35 U/mL). Tutti i pazienti con valori superiori a tale soglia (20/91) sono risultati positivi anche al test RIPA; i pazienti con valori compresi tra 12 e 35 U/mL (6/91) sono risultati negativi al test RIPA.

Tutti i 38 pazienti sclerodermici positivi alla ricerca degli anticorpi maggiori (anti-topo I, ACA), risultavano negativi alla ricerca di anti-RNAP III, utilizzando il valore soglia di 35 U/mL (Fig. 2).

41 pazienti positivi al test anti-RNAP III (ELISA) sono risultati positivi al test ANA-IFI, con quadro fluoroscopico granulare, nucleolare, omogeneo, misto (granulare-nucleolare, granulare-omogeneo). La concentrazione media di anti-RNAP è risultata significativamente diversa nei quattro gruppi, più elevata per il pattern granulare, più bassa per il pattern omogeneo (Tab. III).

La presenza di anti-RNAP III era correlata prevalentemente con la forma diffusa della malattia (65.9%), con il fenomeno di Raynaud (95%), con l'impegno polmonare (65.9%) ed esofageo (43.9%) (Tab. IV).

## Discussione

I risultati del presente studio confermano sensibilità e specificità del metodo ELISA per il dosaggio degli anti-RNAP III nella sclerodermia già evidenziate con metodi home-made<sup>11,12,18</sup>. Utilizzando il livello soglia di positività a 35 U/L la sua accuratezza diagnostica è paragonabile a quella del metodo RIPA di riferimento, del quale può essere considerato un valido sostituto. Diversamente dal metodo RIPA, complesso e indaginoso, il nuovo metodo ELISA può essere facilmente

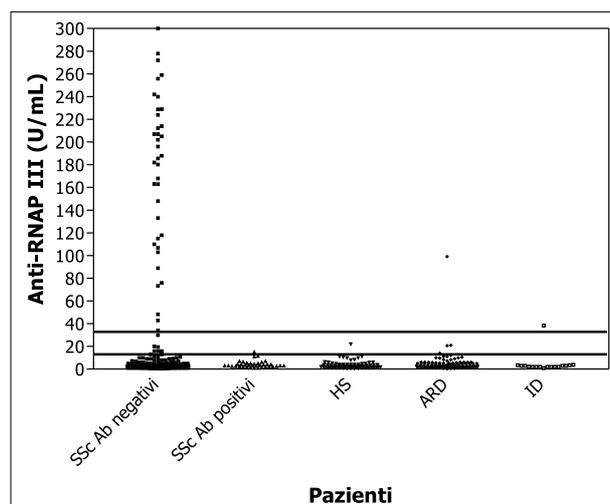


Figura 2. Distribuzione dei valori di anticorpi anti-RNAP III nei pazienti studiati (SSc, sclerodermie; HS, soggetti sani; ARD, malattie reumatiche autoimmuni; ID, malattie infettive).

introdotto nella pratica di laboratorio ad affiancare i metodi consolidati per la determinazione del profilo autoanticorpale nei pazienti con sospetta SSc.

Con il nuovo metodo la ricerca di questa classe autoanticorpale consente di diagnosticare circa il 25% dei soggetti con sclerodermia sierologicamente negativi agli anticorpi maggiori; considerando che questi pazienti costituiscono circa la metà dei pazienti sclerodermici, è verosimile che la frequenza di positività di questa classe anticorpale possa essere stimata attorno all'11-13% nei pazienti italiani. Tale dato risulta sovrapponibile al valore (8% circa) osservato in precedenza nel Regno Unito<sup>19</sup> in Giappone<sup>20</sup> e in Italia<sup>17</sup> con metodo RIPA e in una posizione intermedia rispetto a quelli riscontrati negli Stati Uniti (25%)<sup>2</sup>, in Svezia (22%)<sup>20</sup>, in Canada (20%)<sup>21</sup> e in Francia (4%)<sup>2</sup>.

A conferma di un dato ampiamente noto in letteratura<sup>2,7,22-24</sup>, anche nel nostro studio gli anticorpi anti-RNAP III risultano mutuamente esclusivi rispetto agli altri anticorpi maggiori SSc-specifici: 38 pazienti sclerodermici ACA o anti-topoisomerasi I positivi sono risultati negativi al test ELISA, utilizzando la soglia a massima specificità (35 U/mL). Uno solo tra questi presentava una concentrazione anticorpale compresa tra 12 e 35 U/mL. Occasionali presenze di doppia positività a basse concentrazioni sono infatti state dimostrate anche in altri studi<sup>2</sup>.

Nell'iter diagnostico della sclerodermia il test va effettuato dopo la ricerca degli ANA. Al riguardo va precisato che il quadro fluoroscopico ANA-IFI nei pazienti con anticorpi anti-RNAP non è caratteristico<sup>4</sup>. Nella nostra esperienza infatti solo 1/3 circa dei pazienti anti-RNAP positivi presenta un quadro ANA granulare, mentre i rimanenti pazienti evidenziano un quadro nucleolare o misto (per lo più granulare/nucleolare) (Tab. III).

Se il quadro nucleare (granulare e/o omogeneo) è

**Tabella III.** Quadri fluoroscopici anti-nucleari (ANA) e concentrazione di anti-RNAP III in 41 pazienti affetti da sclerodermia.

Pattern ANA	Positivi		Anti-RNAP		
	(No)	(%)	Media (U/mL)	DS (U/mL)	P
Granulare	15	36.6	196.5	.79.9	
Misto	9	21.9	112.2	100.7	<0.05
Nucleolare	12	29.3	110.9	.88.9	<0.05
Omogeneo	5	12.2	102.1	.62.3	<0.05

**Tabella IV.** Quadri clinici in 41 pazienti affetti da sclerodermia anti-RNAP III positivi.

Quadro Clinico	RNAPAb + (n)	RNAPAb (%)	RNAPAb - (n)	RNAPAb - (%)	p
Forma diffusa (dcSSc)	27/41	65.9	65/166	39.2	0.01
Forma limitata (lcSSc)	14/41	34.1	101/166	60.8	0.01
Fenomeno di Raynaud	39/41	95.1	157/166	94.6	ns
Impegno polmonare	27/41	65.9	94/166	56.7	ns
Impegno renale	6/41	14.6	11/166	6.5	0.05
Impegno cardiaco	13/41	31.7	40/166	24.1	ns
Impegno esofageo	18/41	43.9	70/166	42.1	ns

atteso, data la localizzazione nucleare della RNA polimerasi III<sup>4</sup>, più complesse risultano le motivazioni della presenza del quadro nucleolare presente da solo o associato al quadro granulare. Per quanto riguarda il pattern nucleolare da solo, i nostri dati confermano esperienze precedenti<sup>6,7,10,18,20</sup>, in cui esso viene evidenziato in media nel 37% dei casi (range:17%-57%). Tale fenomeno è spiegato dalla presenza di autoanticorpi diretti verso subunità delle RNAP condivise da RNAP I e III, la prima delle quali presenta localizzazione nucleolare<sup>25</sup>. Il pattern misto è invece determinato dalla presenza di anticorpi anti-RNAP I/III e dalla frequente coesistenza di anticorpi anti-RNAP II, enzima che presenta, analogamente a RNAP I, localizzazione nucleolare<sup>26</sup>.

Si conferma nel nostro studio l'associazione prevalente della positività degli anti-RNAP III con la forma diffusa della SSc<sup>1,7,10,22,26,27</sup>, con il fenomeno di Raynaud, con il coinvolgimento polmonare ed esofageo. Contrariamente ad altri<sup>1,7</sup>, non abbiamo dimostrato un particolare coinvolgimento renale nei pazienti anti-RNAP III positivi: nessuno dei pazienti indagati presentava infatti gravi forme ipertensive o crisi renali sclerodermiche.

## Conclusioni

Per la sua elevata specificità nosografica e la semplicità di esecuzione, il dosaggio degli anti-RNAP III con metodo ELISA rappresenta un nuovo test diagnostico per la diagnosi di sclerodermia. La presenza di questa classe autoanticorpale si conferma mutuamente esclusiva rispetto agli autoanticorpi maggiori, e la loro ricerca può essere inserita in un profilo autoanticorpale specifico per i pazienti sclerodermici a scopo diagnostico, che prevede la determinazione di anti-topo I, anti-

CENP-B, anti-RNAP III.

Il test va eseguito dopo la ricerca degli ANA in IFI, indipendentemente dal quadro fluoroscopico evidenziato (spesso eterogeneo).

Per quanto riguarda il valore soglia di positività, vanno utilizzati due livelli decisionali a 12 U/mL (massima sensibilità) e 35 U/mL (massima specificità); l'intervallo compreso tra 12 e 35 U/mL va considerato come 'zona grigia'. I pazienti con valori in zona grigia vanno monitorati nel tempo, perché possono sviluppare in seguito la malattia (valore predittivo autoanticorpale).

La positività del test è associata alla forma cutanea diffusa di SSc, al coinvolgimento polmonare ed esofageo. Vista l'elevata associazione con il fenomeno di Raynaud, il test va impiegato inoltre nel caso di pazienti con fenomeno di Raynaud isolato e assenza di anticorpi SSc-specifici con significato predittivo, per identificare i soggetti a maggior rischio di evoluzione in SSc.

## Bibliografia

1. Steen VD. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2005; 35:35-42.
2. Meyer OC, Fertig N, Lucas M, Somogyi N, Medgser TA Jr. Disease subsets, antinuclear antibody profile and clinical features in 127 French and 247 US adult patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2007; 34:104-9.
3. Senecal JL, Hénault J, Raymond Y. The pathogenic role of autoantibodies to nuclear autoantigens in systemic sclerosis (scleroderma). *J Rheumatol* 2005; 32:1643-9.
4. Tozzoli R, Villalta D. Anti-RNA Polymerase antibodies. In: Shoenfeld Y, Gershwin ME, Meroni PL, eds. *Autoantibodies*. 2<sup>nd</sup> Edition. Amsterdam: Elsevier Science BV, 2006; pp. 247-54.
5. Stetler DA, Rose KM, Wenger ME, Berlin CM, Jacob ST. Antibodies to distinct polypeptides of RNA polymerase

- I in sera from patients with rheumatic autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:7499-503.
6. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Tojo T, Homma M. Autoantibody reactive with three classes of RNA polymerases in sera of patients with systemic sclerosis. *J Clin Invest* 1993; 91:1399-404.
  7. Okano Y, Steen VD, Medsger TA. Autoantibody reactive with RNA polymerase III in systemic sclerosis. *Ann Intern Med* 1993; 119:1005-13.
  8. Roeder RG. Nuclear RNA polymerase: role of general initiation factors and cofactors in eukaryotic transcription. *Methods Enzymol* 1996; 273:165-71.
  9. Kuwana M, Okano Y, Kaburaki J, Medsger T, Wright TM. Autoantibodies to RNA polymerases recognize multiple subunits and demonstrate cross-reactivity with RNA polymerase complexes. *Arthritis Rheum* 1999; 42:275-84.
  10. Kuwana M, Kaburaki J, Okano Y, Tojo T, Homma M. Clinical and prognostic associations based on serum anti-nuclear antibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1994; 37:75-83.
  11. Kuwana M, Kimura K, Kawakami Y. Identification of an immunodominant epitope on RNA polymerase III recognized by systemic sclerosis sera: application to an enzyme-linked immunosorbent assay. *Arthritis Rheum* 2002; 46:2742-7.
  12. Kuwana M, Okano Y, Pandey JP, Silver RM, Fertig N, Medsger TA Jr. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of anti-RNA polymerase III antibody. *Arthritis Rheum* 2005; 52:2425-32.
  13. Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23:581-90.
  14. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40:1725.
  15. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987; 31:315-24.
  16. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002; 61:554-8.
  17. Bardoni A, Rossi P, Salvini R, Bobbio-Pallavicini F, Caporali R, Montecucco C. Autoantibodies to RNA-polymerases in Italian patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheum* 2003; 21:301-6.
  18. Yamasaki Y, Honkanen-Scott M, Hernandez L, Ikeda K, Barker T, Bubb MR, et al. Nucleolar staining cannot be used as a screening test for the scleroderma marker anti-RNA polymerase I/III antibodies. *Arthritis Rheum* 2006; 54:3051-6.
  19. Bunn CC, Denton CP, Shi-Wen X, Knight C, Black CM. Anti-RNA polymerases and other autoantibody specificities in systemic sclerosis. *Brit J Rheumatol* 1998; 37:15-20.
  20. Kuwana M, Pandey JP, Silver RM, Kawakami Y, Kaburaki J. HLA class II alleles in systemic sclerosis patients with anti-RNA polymerase I/III antibody: associations with subunit reactivities. *J Rheumatol* 2003; 30:2392-7.
  21. Santiago M, Baron M, Hudson M, Burlingame RW, Fritzler MJ. Antibodies to RNA polymerase in systemic sclerosis detected by ELISA. *J Rheumatol* 2007; 34:1528-34.
  22. Harvey GR, Butts S, Rands AL, Patel Y, McHugh NJ. Clinical and serological associations with anti-RNA polymerase antibodies in systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 1999; 117:395-402.
  23. Steen VD, Powell DL, Medsger TA. Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1988; 31:196-203.
  24. Ho KT, Reveille JD. The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. *Arthritis Res* 2003; 5:80-93.
  25. Jones E, Kimura H, Vigneron M, Wang Z, Roeder RG, Cook PR. Isolation and characterization of monoclonal antibodies directed against subunits of human RNA polymerases I, II, and III. *Exp Cell Res* 2000; 254:163-72.
  26. Hirakata M, Okano Y, Pati U, Suwa A, Medsger TA Jr, Hardin JA, et al. Identification of autoantibodies to RNA polymerase II: Occurrence in systemic sclerosis and association with autoantibodies to RNA polymerase I and III. *J Clin Invest* 1993; 91:2665-72.
  27. Chang M, Wang R, Yangco D, Sharp G, Komatireddy G, Hoffman R. Analysis of autoantibodies against RNA polymerases using immunoaffinity-purified RNA polymerase I, II, and III antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 89:71-8.