

Mieszana choroba tkanki łącznej – 40 lat historii

Mixed connective tissue disease: 40 years of history

Marzena Olesińska¹, Anna Felis-Giemza¹, Katarzyna Walkiewicz-Pielaszek¹, Zenobia Czuszyńska²

¹Klinika i Poliklinika Układowych Chorób Tkanki Łącznej Instytutu Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher, Warszawa

²Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Chorób Tkanki Łącznej i Geriatrii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Słowa kluczowe: mieszana choroba tkanki łącznej, przeciwciała anti-U1-RNP, historia.

Key words: mixed connective tissue disease, anti-U1-RNP antibodies, history.

Streszczenie

Historia mieszanej choroby tkanki łącznej rozpoczęła się przed 40 laty jako wynik wieloletniej obserwacji chorych z objawami przypominającymi toczą rumieniowatą układową, twardzinę oraz zapalenie wielomięśniowe i skórno-mięśniowe. U chorych tych stwierdzono ponadto wysokie miano przeciwciał przeciwko rozpuszczalnemu antygenom jądrowym (anti-ENA). W pracy przedstawiono kształtowanie się poglądów na obraz kliniczny choroby, rozwój metod diagnostycznych umożliwiających identyfikację antygenów zaangażowanych w rozwój procesu chorobowego, a także zastosowanie nowoczesnych metod badawczych do określenia mechanizmów patogenetycznych MCTD (tab. I). Obserwując rozwój wiedzy na temat MCTD, można prześledzić 40 lat rozwoju medycyny.

Choroby tkanki łącznej cechuje różnorodność przebiegu, obrazu klinicznego oraz zaburzeń immunologicznych. Większość z nich ma ustalone kryteria diagnostyczne lub klasyfikacyjne, które porządkują wiedzę o typowych cechach jednostek chorobowych, stwarzają możliwość porównań oraz opracowania optymalnej terapii. Część przypadków wymyka się jednak z ustalonych ram.

Już w 1958 r. E. Reicher pisała: „Różne cechy kliniczne jednostek chorobowych, należących do grupy chorób kolagenu, nieraz łączą się ze sobą, stwarzając powikłane obrazy chorobowe. Zdarza się to zwłaszcza w przebiegu przewlekłego, postępującego gośćca, który niejednokrotnie wykazuje pewne cechy sklerodermii, cechy *dermatomyositis*, cechy *lupus erythematosus disseminatus*...” [1, 2].

Podobne spostrzeżenia poczynił zespół amerykańskich badaczy z uniwersytetu w Stanford, kierowany przez

Summary

The history of mixed connective tissue disease (MCTD) started 40 years ago as a result of long-term observation of patients with features resembling systemic lupus erythematosus (SLE), scleroderma and poly- or dermatomyositis. A high titre of anti-extractable nuclear antigen antibodies (anti-ENA) in these patients was also revealed. This paper presents formation of views on clinical aspects of MCTD, development of diagnostic methods identifying antigens involved in disease initiation and modern technique appliance in defining pathogenic mechanisms (Table I). Looking at the growing knowledge on MCTD we can follow 40 years of medicine progress.

Sharpa. U obserwowanych od 8 lat 25 chorych stwierdzono współistnienie objawów typowych dla różnych chorób układowych: tocznia rumieniowatego układowego (*systemic lupus erythematosus* – SLE), zapalenia wielomięśniowego oraz twardziny. Taki obraz kliniczny określono mianem mieszanej choroby tkanki łącznej (*mixed connective tissue disease* – MCTD) [3].

Początki mieszanej choroby tkanki łącznej – doskonalenie metod diagnostycznych

Pierwszym impulsem skupiającym uwagę badaczy na tej grupie chorych było wysokie miano przeciwciał przeciwjądrowych oznaczanych w surowicy testem wiązania dopełniacza [3]. Specyfikacji przeciwciał dokonano opracowanym w tym czasie testem hemaglutynacji biernej

Adres do korespondencji:

dr n. med. Marzena Olesińska, Klinika i Poliklinika Układowych Chorób Tkanki Łącznej, Instytut Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher, ul. Spartańska 1, 02-637 Warszawa, tel. +48 22 844 57 26, faks +48 22 646 78 94, e-mail: marzena.olesinska@vp.pl

Praca wpłynęła: 27.07.2011 r.

(PHA), który pozwalał na jednoczesne wyodrębnienie różnych typów przeciwciał. Stosowana dotychczas metoda immunofluorescencji nie dawała takich możliwości.

Test PHA u chorych na MCTD i SLE wykazał obecność przeciwciał przeciw dwuniciowemu DNA (anty-nDNA) oraz przeciw nowo wykrytemu rozpuszczalnemu antygenowi jądrowemu (anty-ENA). Anty-ENA występowały u połowy chorych na SLE, najczęściej w niskich mianach. U wszystkich chorych na MCTD stwierdzono bardzo wysokie miana anty-ENA, które utrzymywały się pomimo leczenia glikokortykosteroidami i osiągnięcia przez chorych remisji [4].

Prowadzone następnie badania enzymatyczne wykazały, że u chorych na MCTD przeciwciała anty-ENA są skierowane przeciw wrażliwym na działanie RNazy i trypsyny składnikom ENA, tzn. przeciw jądrowej rybonukleoproteinie (anty-nRNP). Northway i Tan wykazali, iż w teście immunofluorescencji przeciwciała te mają ziarnisty typ świecenia [5]. U większości chorych na SLE stwierdzono przeciwciała anty-ENA, określane później jako anty-Sm, które są odporne na działanie RNazy i częściowo trypsyny. Uznano także wartość diagnostyczną wysokiego miana przeciwciał anty-RNP dla rozpoznania MCTD oraz anty-Sm dla rozpoznania SLE. W wyniku późniejszych badań uściślono, że ENA są mieszaniną wielu antygenów jądrowych, znaczenie w diagnostyce chorób tkanki łącznej ma zaś wykrycie przeciwciał dla następujących antygenów: SSA (Ro), SSB (La) oraz wspomnianych RNP i Sm [6].

Ewolucja poglądów na temat obrazu choroby

W 1972 r. Sharp i wsp. dokonali prezentacji MCTD jako odrębnej jednostki chorobowej, której towarzyszą specyficzne przeciwciała przeciw rozpuszczalnemu antygenowi jądrowemu [7]. W komentarzu do charakterystyki 25 przypadków autorzy wymienili najważniejsze cechy wyróżniające MCTD z grona innych chorób układowych. Było to współistnienie objawów spotykanych w SLE (niedoforujące zapalenie stawów, wysypki skórne, gorączka, hepato- i splenomegalia, hipergammaglobulinemia, leukopenia, anemia), w twardzinie (objaw Raynauda i upośledzenie motoryki przetyku) oraz w zapaleniu wielomięśniowym i skórno-mięśniowym (typowe zmiany skórne, osłabienie mięśni proksymalnych, wzrost stężenia enzymów mięśniowych, charakterystyczne zmiany w EMG i biopsji mięśnia). Drugą cechą MCTD był opisany powyżej znamieny obraz zaburzeń serologicznych. Autorzy podkreślili wysoką skuteczność glikokortykoterapii (*excellent response*), łagodny przebieg choroby, bez zajęcia narządów wewnętrznych oraz pomyślne rokowanie w MCTD [7].

Od 1969 r. zespół Sharpa kontynuował swoją pracę na uniwersytecie w Missouri, gdzie realizowano perspektywne

długoterminowe badanie obejmujące 34 chorych z MCTD. Wykazało ono, że w początkowej fazie choroby rzadko występują wszystkie objawy kliniczne, natomiast ujawniają się one w dalszym jej przebiegu. Zwrócono także uwagę na poważne problemy kliniczne, wśród których najczęstszymi były: śródmiąższowa choroba płuc i nadciśnienie płucne. Były one powodem zgonu 4 chorych. Podkreślono konieczność wykonywania przesiewowo mechaniki oddychania i/lub badania radiologicznego klatki piersiowej, których wyniki były nieprawidłowe u większości chorych bez klinicznych objawów choroby płuc [8].

W 1999 r. Sharp i wsp. ponownie opublikowali wyniki swojej wieloletniej, trwającej już trzy dekady obserwacji 37 chorych [9]. Wykazano, że obraz kliniczny MCTD rozwija się w czasie, a nie ewoluuje w SLE czy twardzinę. W trakcie leczenia objaw Raynauda i zaburzenia funkcji przetyku z czasem ulegają osłabieniu, natomiast utrzymują się nadciśnienie płucne, zaburzenia funkcji płuc i objawy neurologiczne. Ponadto u chorych na MCTD znacznie rzadziej niż w SLE dochodzi do zajęcia nerek. Pomyślny przebieg choroby obserwowano u 62% chorych (z czego u 17 osób uzyskano remisję choroby), natomiast przebieg postępujący lub zgon (najczęściej w przebiegu nadciśnienia płucnego lub zespołu antyfosfolipidowego) wystąpił u 38% chorych.

Badania nad antygenem ENA: RNP

Reaktywność ENA została dokładniej scharakteryzowana przez zespół badaczy z uniwersytetu Yale testem immunoprecypitacji z użyciem jądrowych ekstraktów z komórek znakowanych ³²P i ³⁵S [10]. Przeciwciała anty-RNP reagowały z bogatym w urydinę kompleksem małych rybonukleoprotein jądrowych – U1snRNP (*uridine-rich small nuclear ribonucleoprotein*), stąd ewolucja nazwy przeciwciał na anty-U1-RNP, anty-nRNP lub anty-U1snRNP [10].

Ten sam zespół badaczy 5 lat później opublikował pracę kluczową dla dalszych studiów nad naturą kompleksów snRNP i Sm [11]. Metodami immunoprecypitacji i Western-blotting wykryli oni 3 proteiny: U1-70K, U1-A oraz U1-C, będące determinantami antygenowymi U1-RNP. Stwierdzili ponadto, że w kompleksie Sm taką funkcję pełnią białka Sm-B/B', Sm-D i w mniejszym zakresie Sm-E.

W latach 80. ubiegłego wieku podjęto także badania z zastosowaniem testu immunoenzymatycznego (*enzyme-linked immunosorbent assays* – ELISA) do wykrywania przeciwciał przeciw oczyszczonym metodą powinowactwa antygenom ENA: RNP, Sm, Ro (SSA) i La (SSB) [6]. Test ELISA wykazał wyższą czułość w stosunku do wcześniejszych metod laboratoryjnych. Stwierdzono ponadto, że daje on możliwości ilościowej oceny miana przeciwciał i określenia ich klasy, jest szybki, łatwy do wykonania i może być przeprowadzany automatycznie [6]. Obecnie, tak jak i test Western-blotting, jest to metoda najczęściej stosowana w diagnostyce serologicznej.

U1-snRNP jako składnik spliceosomu

W 1980 r. zespół badaczy z uniwersytetu Yale jako pierwszy postawił tezę, że snRNP uczestniczą w procesie splicingu [12]. Jest to proces usuwania sekwencji niekodujących (intronów) z prekursorowego pre-mRNA oraz dołączania kodujących eksonów. W ten sposób powstaje dojrzały mRNA, będący matrycą do syntezy białek (translacji). Splicing jest katalizowany przez spliceosom, kompleks rybonukleoprotein. Dwie podjednostki spliceosomu odgrywają istotną rolę w rozwoju zjawisk autoimmunogennych: małe jądrowe nukleoproteiny (U1-, U2-, U4-, U5-, U6-snRNP) oraz heterogenne jądrowe nukleoproteiny (hnRNP) [13].

W ostatnim czasie dokonano istotny postęp w identyfikacji struktury spliceosomu i jego składników, snRNP. Szczególnie zaawansowane są badania nad kompleksem U1-snRNP. Analiza jego architektury w mikroskopie elektronowym [14–16], uzupełniona obrazem rentgenografii strukturalnej [17], dostarczyła informacji na temat funkcji i rozmieszczenia przestrzennego poszczególnych składników kompleksu i możliwości ich interakcji. Pozwoliła także prześledzić mechanizm potranslacyjnych modyfikacji cząsteczki w procesie apoptozy, inicjujących zjawiska immunogenne [18].

Badania nad patogenezą mieszanej choroby tkanki łącznej

Prowadzone przez lata kliniczne badania obserwacyjne oraz badania na modelach zwierzęcych pozwoliły wyodrębnić pewne zagadnienia, które mogą mieć znaczenie dla patogenezы MCTD. Podobnie jak w innych chorobach układowych, należy brać pod uwagę predyspozycję genetyczną, działanie stymulujące czynników środowiskowych oraz zaburzenia w regulacji immunologicznej.

W latach 90. XX w. wykazano związek pomiędzy obecnością przeciwciał anti-U1-70K, obrazem klinicznym MCTD a antygenem HLA-DR4. Badania prowadził zespół Sharpa z Hoffmanem na czele, nawiązując później współpracę z japońskim naukowcem Kaneoką. Następne lata przyniosły potwierdzenie tych wyników przez ośrodki z Europy, Stanów Zjednoczonych, Meksyku i Japonii [19–24].

Badania asocjacyjne całego genomu (*genome-wide association*) oraz analizy sprzężeń wskazały u chorych rasy kaukaskiej na związek między immunizacją anti-RNP i polimorfizmem pojedynczego nukleotydu (SNP) na długim (region 3q25–26) i krótkim ramieniu (region 3q23–24) chromosomu 3 [25, 26].

Przeprowadzone badania wykazały złożony mechanizm zmian w odpowiedzi immunologicznej: modyfikacje struktury antygeny RNP w procesie apoptozy, aktywację komórek immunologicznych za pośrednictwem TLR (*Toll-like receptor*), pobudzenie limfocytów B i syntezę autoprzeciwciał przeciw różnym składnikom spliceosomu, udział limfocy-

tów T (CD4, CD8, regulatorowych), komórek dendrytycznych [27, 28].

Istotny wkład w wiedzę na temat patogenezы MCTD wniosło badanie Greidingera i wsp. na modelu zwierzęcym: myszy transgenicznej z genem podatności HLA-DR4 [29]. W opublikowanej w 2006 r. pracy przedstawiono rozwój typowych dla MCTD zmian płucnych i przeciwciał anti-70K U1-RNP jako reakcji na immunizację antygenem U1-70K lub U1RNA. W podobnym doświadczeniu przeprowadzonym u myszy pozbawionej TLR-3 poza indukcją anti-70K U1-RNP doszło do rozwoju typowego dla SLE kłębuszkowego zapalenia nerek, a zmiany w płucach były nieobecne.

Kryteria klasyfikacyjne mieszanej choroby tkanki łącznej

Nie opracowano dotąd jednolitych, powszechnie akceptowanych kryteriów klasyfikacyjnych tej choroby. W 1986 r. na międzynarodowym sympozjum dotyczącym MCTD i przeciwciał przeciwjądrowych w Tokio 3 autorów przedstawiło swoje propozycje kryteriów diagnostycznych: Sharp [30], Alarcon-Segovia/Villareal [31] i Kasukawa [32]. Dwa ostatnie wykazały w badaniach porównawczych przewagę w specyficzności dla MCTD, a dwa pierwsze wysoką czułość [33].

Po upływie kolejnych 5 lat badacze francuscy opublikowali swoje kryteria [34], które w badaniu porównującym wartość wszystkich 4 kryteriów wypadły najlepiej obok kryteriów autorstwa Alarcon-Segovii/Villareala [35].

Kryteria Sharpa składają się z 5 dużych i 11 małych kryteriów. Jako jedyne dopuszczają możliwość prawdopodobnego rozpoznania choroby, w przypadku której anti-U1-RNP może być nieobecne, oraz stawiają warunek nieobecności anti-Sm. Dla ustalenia rozpoznania MCTD wg Alarcon-Segovii/Villareala konieczne jest spełnienie 3 z 5 kryteriów klinicznych oraz kryterium serologicznego. Podobne są kryteria Kahna, zawierają jednak 4 kryteria kliniczne. Kasukawa uwzględnił objawy wspólne (objaw Raynauda i obrzęk palców rąk), kryterium serologiczne oraz objawy takich chorób układowych, jak SLE, twardzina układowa i zapalenie wielomięśniowe.

W ubiegłym roku na łamach czasopisma *Lupus* brazylijscy badacze zaproponowali zestaw kryteriów do oceny aktywności MCTD. Algorytm ten opiera się na kryteriach klinicznych, zróżnicowanych na objawy główne i dodatkowe, oraz na kryteriach laboratoryjnych [36]. Właściwa ocena wartości tych kryteriów wymaga dalszych badań.

Kontrowersje wokół natury mieszanej choroby tkanki łącznej

Już pierwsze publikacje o MCTD, jako nowej odrębnej jednostce z kręgu chorób układowych tkanki łącznej, zainicjowały dyskusję na temat jej charakteru. Krytyka opu-

blikowanej w 1972 r. koncepcji Sharpa [7] zogniskowała się na dwóch zagadnieniach. Pierwszym była wątpliwość co do prawdziwości pierwotnego opisu choroby. Wieloletnia obserwacja chorych na MCTD wykazała cięższy przebieg choroby, niż wstępnie sądzono. Okazało się, że najważniejszymi powikłaniami są nadciśnienie płucne oraz choroba śródmiąższowa płuc. Reakcja na glikokortykoterapię, wcześniej opisywana jako doskonała, w rzeczywistości jest zależna od rodzaju i nasilenia zmian chorobowych.

Drugim powodem krytyki koncepcji MCTD była teza, że jest to zdefiniowana odrębna od innych choroba tkanki łącznej. Argumenty za i przeciw tej koncepcji przedstawiono w tabeli I.

W 2008 r. opublikowano analizę porównawczą objawów klasyfikujących MCTD i SLE przy użyciu matematycznego modelu Rascha [43, 44]. Wykazano odrębność obu jednostek chorobowych oraz określono czynniki ryzyka wskazujące rozpoznanie. W przypadku MCTD były to: obecność przeciwciał anty-RNP, refluks żołądkowo-przetykowy, obrzęk rąk w wywiadzie, objaw Raynauda i sklerodaktylia. Dla SLE wytypowano: rumień w kształcie motyla, proteinurię, obecność przeciwciał anty-nDNA, nadwrażliwość na promienie ultrafioletowe i gorączkę.

Polskie badania na temat mieszanej choroby tkanki łącznej

Mieszana choroba tkanki łącznej była także szeroko omawiana przez polskich autorów. Powstało wiele prac oryginalnych oraz opisów przypadków prezentujących własne doświadczenia w diagnozowaniu i leczeniu tej choroby [45–50]. Dotyczyły one zarówno osób dorosłych, jak i dzieci [51, 52].

W Polsce opracowano liczne prace pogładowe przedstawiające szerokiemu gronu czytelników stan wiedzy na temat MCTD [53–57]. Prace powstawały zarówno w ośrodkach reumatologicznych, jak i dermatologicznych [58, 59].

Obecnie w Instytucie Reumatologii im. prof. E. Reicher w Warszawie we współpracy z Kliniką Chorób Wewnętrznych, Chorób Tkanki Łącznej i Geriatrii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz innymi ośrodkami reumatologicznymi prowadzone są wspólne badania obejmujące dużą grupę chorych na MCTD.

Podsumowanie

Obserwacja rozwoju wiedzy na temat MCTD to okazja do prześledzenia 40 lat rozwoju medycyny. Początki to badania obserwacyjne, gromadzące dane o obrazie klinicznym

Tabela I. Argumenty za i przeciw koncepcji MCTD jako odrębnej jednostki chorobowej
Table I. Arguments for and against the concept of MCTD as a distinct clinical entity

Przeciw	Za
obraz kliniczny MCTD jest podobny do SLE, twardziny i PM/DM	<p>w MCTD rzadko dochodzi do zajęcia nerek i ośrodkowego układu nerwowego, typowo zaś w SLE [9]</p> <p>w MCTD i twardzinie występuje nasilony objaw Raynauda, ale w przeciwieństwie do twardziny obraz pętli naczyniowych w MCTD jest zazwyczaj niespecyficzny [37]</p> <p>w badaniu histopatologicznym tkanek w MCTD stwierdza się waskulopatię z przerostem błony wewnętrznej i środkowej naczyń różnego kalibru i z obecnością złogów IgG i IgM oraz dopełniacza w ścianach naczyń; występuje także włóknienie okołonaczyniowe, które jest w stosunku do twardziny znacznie mniej nasilone [38]</p>
przeciwciała anty-U1-snRNP obecne są także w innych CTD	<p>miano przeciwciał anty-U1-snRNP u chorych na MCTD jest wielokrotnie wyższe niż w innych CTD [39]</p> <p>u chorych z rozpoznaniem UCTD i z wysokim mianem przeciwciał anty-U1-snRNP w ciągu 2 lat rozwija się MCTD; jeśli miano tych przeciwciał jest niskie, najczęściej rozwija się inna choroba tkanki łącznej [40]</p> <p>przeciwciała anty-U1-snRNP u chorych na SLE występują w klasach IgG i IgM, a u chorych na MCTD tylko w klasie IgG [41]</p>
HLA-DR4 występuje także w RZS	<p>zapalenie stawów w MCTD rzadko ma charakter destrukcyjny [42]</p> <p>występowanie SLE jest związane z HLA-DR2 i DR3, twardziny z HLA-DR5, a PM/DM z HLA-DR3 [24]</p>

CTD – choroba tkanki łącznej, MCTD – mieszana choroba tkanki łącznej, PM/DM – zapalenie wielomięśniowe i skórno-mięśniowe, SLE – toczeń rumieniowaty układowy, UCTD – niezróżnicowana choroba tkanki łącznej

i wczesny etap diagnostyki serologicznej. Następnie opracowano kryteria wyodrębniające tę jednostkę chorobową z kręgu innych. Wraz z doskonaleniem technik laboratoryjnych pogłębiano analizę do poziomu molekularnego. Dynamiczny rozwój genetyki oraz metod wizualizacji procesów komórkowych i pozakomórkowych umożliwiły wgląd w patomechanizm choroby. I dopiero ten etap badań pozwala na rozpoczęcie poszukiwań skutecznej terapii, nakierowanej na najistotniejsze patomechanizmy.

Mimo że dla MCTD takiej terapii jeszcze nie ma, zgodnie z opinią Sharpa charakter tej choroby stawia wiele wyzwań dla badaczy i jest stymulatorem rozwoju badań nad chorobami autoimmunologicznymi [60].

Piśmiennictwo

- Reicher E. Choroby kolagenu. *Pol Arch Med Wewn* 1958; 6: 917-929.
- Cieślak T. Czy prof. Eleonora Reicher wyodrębniła i opisała na kilkanaście lat przed Sharpem zespół Sharpa? *Arch Hist Fil Med* 1992; 55: 323-326.
- Sharp GC. Specific antibody to the extractable nuclear antigen (ENA) in the mixed connective tissue disease syndrome. *J Lab Clin Med* 1969; 74: 1010-1011.
- Sharp GC, Irvin WS, LaRoque RL, et al. Association of autoantibodies to different nuclear antigens with clinical patterns of rheumatic disease and responsiveness to therapy. *J Clin Invest* 1971; 50: 350-358.
- Northway JS, Tan EM. Differentiation of antinuclear antibodies giving speckled staining patterns in immunofluorescence. *Clin Immunol Immunopathol* 1972; 1: 140-147.
- Maddison PJ, Skinner RP, Vlachoyiannopoulos P, et al. Antibodies to nRNP, Sm, Ro(SSA) and La(SSB) detected by ELISA: their specificity and inter-relations in connective tissue disease sera. *Clin Exp Immunol* 1985; 62: 337-345.
- Sharp GC, Irvin WS, Tan EM, et al. Mixed connective tissue disease – an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Am J Med* 1972; 52: 148-159.
- Sullivan WD, Hurst DJ, Harmon CE, et al. A prospective evaluation emphasizing pulmonary involvement in patients with mixed connective tissue disease. *Medicine* 1984; 63: 92-107.
- Burdett MA, Hoffman RW, Deutscher SL, et al. Long-term outcome in mixed connective tissue disease: longitudinal clinical and serologic findings. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 899-909.
- Lerner MR, Steitz JA. Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 5495-5499.
- Pettersson I, Hinterberger M, Mimori T, et al. The structure of mammalian small nuclear ribonucleoproteins. Identification of multiple protein components reactive with anti-(U1)ribonucleoprotein and anti-Sm autoantibodies. *J Biol Chem* 1984; 259: 5907-5914.
- Lerner MR, Boyle JA, Mount SM, et al. Are snRNPs involved in splicing? *Nature* 1980; 283: 220-224.
- Will CL, Lührmann R. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3: [e-pub].
- Kastner B, Lührmann R. Electron microscopy of U1 small nuclear ribonucleoprotein particles: shape of the particle and position of the 5'RNA terminus. *EMBO J* 1989; 8: 277-286.
- Kastner B, Kornstädt U, Bach M, et al. Structure of the small nuclear RNP particle U1: identification of the two structural protuberances with RNP-antigens A and 70K. *J Cell Biol* 1992; 116: 839-849.
- Stark H, Dube P, Lührmann R, et al. Arrangement of RNA and proteins in the spliceosomal U1 small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature* 2001; 409: 539-542.
- Pomeranz Krummel DA, Oubridge C, Leung AK, et al. Crystal structure of human spliceosomal U1 snRNP at 5.5 Å resolution. *Nature* 2009; 458: 475-480.
- Hof D, Cheung K, de Rooij DJ, et al. Autoantibodies specific for apoptotic U1-70K are superior serological markers for mixed connective tissue disease. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: R 302-R 307.
- Hoffman RW, Rettenmaier LJ, Takeda Y, et al. Human autoantibodies against the 70-kd polypeptide of U1 small nuclear RNP are associated with HLRDR4 among connective tissue disease patients. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 666-673.
- Kaneoka H, Hsu K-C, Takeda Y, et al. Molecular genetic analysis of HLA-DR and HLA-DQ genes among anti-U1-70-kd autoantibody positive connective tissue disease patients. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 83-94.
- Hoffman RW, Sharp GC, Deutscher SL. Analysis of anti-U1 RNA antibodies in patients with connective tissue disease: association with HLA and clinical manifestations of disease. *Arthritis Rheum* 1995; 38:1837-1844.
- Hoffman RW, Sharp GC. Is anti-U1-RNP autoantibody positive connective tissue disease genetically distinct? *J Rheumatol* 1995; 22: 586-589.
- Gendi NS, Welsh KI, van Venrooij WJ, et al. CM. HLA type as a predictor of mixed connective tissue disease differentiation: ten-year clinical and immunogenetic followup of 46 patients. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 259-266.
- Smolen JS, Steiner G. Mixed connective tissue disease. To be or not to be? *Arthritis Rheum* 1998; 41: 768-777.
- Ramos PS, Kelly JA, Gray-McGuire C, et al. Familial aggregation and linkage analysis of autoantibody traits in pedigrees multiplex for systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 2006; 7: 417-432.
- Cervino AC, Tsinoremas NF, Hoffman RW. A genome-wide study of lupus: preliminary analysis and data release. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1110: 131-139.
- Greidinger EL, Hoffman RW. Autoantibodies in the pathogenesis of mixed connective tissue disease. *Rheum Dis Clin N Am* 2005; 31: 437-450.
- Hoffman RW, Maldonado ME. Immune pathogenesis of mixed connective tissue disease: a short analytical review. *Clin Immunol* 2008; 128: 8-17.
- Greidinger EL, Zang YJ, Jaimes K, et al. A Murine Model of Mixed Connective Tissue Disease Induced With U1 Small Nuclear RNP Autoantigen. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 661-669.
- Sharp GC. Diagnostic criteria for classification of MCTD. In: Mixed connective tissue diseases and antinuclear antibodies Kasukawa R, Sharp GC (eds.). Elsevier; Amsterdam 1987; 23-32.
- Alarcon-Segovia D, Villareal M. Classification and diagnostic criteria for mixed connective tissue disease. In: Mixed connective tissue diseases and antinuclear antibodies. Kasukawa R, Sharp GC (eds.). Elsevier; Amsterdam 1987; 33-40.

32. Kasukawa R, Tojo T, Miyawaki S. Preliminary diagnostic criteria for classification of mixed connective tissue disease. In: *Mixed connective tissue diseases and antinuclear antibodies*, Kasukawa R, Sharp GC (eds.). Elsevier; Amsterdam 1987; 41-47.
33. Alarcon-Segovia D, Cardiel MH. Comparison between 3 diagnostic criteria for mixed connective tissue disease. *J Rheumatol* 1989; 16: 328-334.
34. Kahn MF, Appeboom T. Syndrome de Sharp. In: *Les maladies systemiques*. Kahn MF, Peltier AP, Meyer O, Piette JC, eds. 3th edition. Flammarion; Paris 1991: 545-556.
35. Amigues JM, Cantagrel A, Abbal M, et al. comparative study of 4 diagnosis criteria sets for mixed connective tissue disease in patients with anti-RNP antibodies. *Autoimmunity Group of the Hospitals of Toulouse. J Rheumatol* 1996; 23: 2055-2062.
36. Lage LV, Caleiro MT, Carvalho JF. Proposed disease activity criteria for mixed connective tissue disease. *Lupus* 2010; 19: 223-224.
37. Bellando-Randone S, Cutolo M, Czirjak L, et al. Mixed connective tissue disease, a roundabout to rheumatic diseases? *Curr Rheumatol Rev* 2009; 5: 133-140.
38. Singsen BH, Swanson VL, Bernstein BH. A histological evaluation of mixed connective tissue disease in childhood. *Am J Med* 1980; 68: 710-717.
39. Habets WJ, de Rooij DJ, Hoer RM, et al. Quantitation of anti-RNP and anti-Sm antibodies In MCTD and SLE patients by immunoblotting. *Clin Exp Immunol* 1985; 59: 457-465.
40. Piirainen HI. Patients with arthritis and anti-U1-RNP antibodies: a 10 year follow up. *Br J Rheumatol* 1990; 29: 345-348.
41. Vlachoyiannopoulos PG, Goules A, Tzioufas G, Moutsopoulos HM. Predominance of IgM anti-U1RNP polypeptide A with systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 1996; 35: 534-541.
42. Ramos-Niembro R, Alarcon-Segovia D, Hernandez OJ. Articular manifestations of mixed connective tissue disease. *Arthritis Rheum* 1979; 22: 43-51.
43. Perkins K, Hoffman RW, Bezruczko N. A Rasch analysis for classification of systemic lupus erythematosus and mixed connective tissue disease. *J Appl Meas* 2008; 9: 136-150.
44. Tennant A, Conaghan PG. The Rasch measurement model in rheumatology: what is it and why use it? when should it be applied, and what should one look for in a Rasch paper? *Arthritis Rheum* 2007; 57: 1358-1362.
45. Chwalińska-Sadowska H, Jedryka-Góral A, Małdykowska H, Rdułtowska H. [Mixed connective tissue disease. Clinico-immunological studies in 12 patients]. *Reumatologia* 1983; 21: 221-229.
46. Mazurek K, Kuch J, Lubiszewska B, Serwecińska T. [Variability of disease picture during successive exacerbations in mixed collagen disease]. *Wiad Lek* 1982; 35: 671-674.
47. Zimmermann-Górska I, Potocka-Michajluk U, Stepczyńska M, Mickiewicz A. [2 cases of mixed connective tissue disease]. *Pol Arch Med Wewn* 1979; 61: 75-82.
48. Plamieniak Z, Głębowska-Halawa H, Miklaszewska M i wsp. [A case of mixed connective tissue disease with involvement of the nervous system]. *Pol Tyg Lek* 1987; 42: 229-231.
49. Panaszek B, Matolepszy J, Wrzyszczyk M i wsp. [Mixed connective tissue disease in a male patient chronically exposed to toxic chemicals]. *Pol Tyg Lek* 1993; 48: 430-432.
50. Prokop J, Zietkiewicz E, Słomski R. [Occurrence of autoantibodies and the clinical course of mixed connective tissue disease, systemic scleroderma, dermatomyositis, polymyositis and Sjögren's syndrome]. *Przegl Dermatol* 1986; 73: 327-331.
51. Wilkoszewski E, Małdyk E, Wesółowska H i wsp. [Diagnostic difficulties in a case of systemic connective tissue disease in a 10-year-old boy]. *Reumatologia* 1971; 9: 399-406.
52. Wesółowska H, Rostropowicz-Denisiewicz K, Siemieńska-Rywik S i wsp. [Mixed connective tissue disease in children in the light of our observations]. *Pediatr Pol* 1988; 63: 473-478.
53. Fiedorczyk M, Rojewska J, Kowal-Bielecka O i wsp. [Interstitial lung disease related to systemic connective tissue diseases]. *Przegl Lek* 2005; 62: 1471-1474.
54. Szczepański L. [Mixed connective tissue disease]. *Pol Arch Med Wewn* 1975; 54: 577-583.
55. Małdyk E. [Mixed connective tissue disease]. *Pol Tyg Lek* 1976; 31: 1101-1102.
56. Zdrojewicz Z, Budzyń-Kozioł E, Puławska J. [Mixed connective tissue disease - etiology, pathogenesis, clinical significance, treatment]. *Postepy Hig Med Dosw* 1999; 53: 751-766.
57. Kuch J, Mazurek K, Serwecińska T. [Mixed connective tissue diseases or systemic lupus erythematosus?]. *Wiad Lek* 1978; 31: 1163-1167.
58. Chorzelski T, Błaszczak M, Jabłońska S i wsp. [Diagnosis of the so-called mixed connective tissue disease (MCTD)]. *Przegl Dermatol* 1985; 72: 407-412.
59. Chorzelski T, Jabłońska S, Jarzabek-Chorzelska M i wsp. [Is mixed connective tissue disease a separate entity?]. *Przegl Dermatol* 1977; 64: 525-531.
60. Sharp GC. The origin of mixed connective tissue disease: a stimulus for autoimmune disease research. *Lupus* 2009; 18: 1031-1032.