

PROGETTO DI RICERCA:

“LA DIAGNOSI PRECOCE DELLA SCLERODERMIA” *“Genetica, ambiente, studio del microcircolo e del danno d’organo iniziale”*

SOTTOPROGETTO

Valutazione dei livelli sierici di molecole solubili HLA-G e delle espressione di HLA-G nella cute quali marcatori diagnostici nella sclerosi sistemica.

Unità operativa: Medicina Interna e Immunologia Clinica - DIMI – Genova

Responsabile Scientifico: Prof. Francesco Puppo, MD

Introduzione e scopo del lavoro

HLA-G

La molecola di istocompatibilità non-classica HLA-G fu individuata nel 1987 (Geraghty DE 1987), inizialmente a livello dell’interfaccia materno-fetale (citotrofoblasto extra-villoso). In tale microambiente essa svolge l’importante funzione di mantenere una tolleranza tra il sistema immunitario materno e le cellule fetali. Partendo da tale scoperta l’interesse per l’HLA-G è andato via via aumentando: ciò ha permesso di scoprirne l’implicazione in numerose condizioni, fisiologiche (a livello del citotrofoblasto, della cornea, della matrice ungueale, delle cellule β delle isole di Langherans e delle cellule staminali mesenchimali o dell’embrione) e patologiche (infezioni virali, neoplasie, malattie autoimmuni).

Il gene che codifica per l’HLA-G è localizzato sul cromosoma 6, insieme al complesso maggiore di istocompatibilità classico, ed è composto da 8 esoni e 7 introni. Mediante splicing alternativo dal trascritto primario si possono formare 7 isoforme diverse:

- Quattro isoforme legate alla membrana, HLA-G1, -G2, -G3, -G4;
- Tre isoforme solubili, HLA-G5, -G6, -G7.

Le forme più comunemente studiate sono l’isoforma HLA-G1 e la sua esatta controparte solubile, HLA-G5 che si genera a causa della presenza di un codone di stop nell’introne 4 che impedisce la traduzione della porzione transmembranaria. L’HLA-G1 può anche essere rilasciato mediante taglio proteolitico (shedding) da parte di metallo-proteasi. L’insieme di HLA-G1 solubile e HLA-G5 costituisce l’HLA-G solubile (sHLA-G).

Ad oggi si sa che l’HLA-G esplica le sue funzioni biologiche mediante legame con tre recettori principali a funzione inibitoria (G. S. Carosella ED 2011):

- ILT2;
- ILT4;
- KIR2DL4.

Attraverso il legame con tali recettori, la molecola HLA-G svolge funzioni modulatorie sul sistema immunitario ed è in grado di agire a diversi livelli:

- mediante meccanismi diretti cellula-cellula: inibizione dei linfociti NK (Park GM 2004) (Rouas-Freiss N 1997) e dei linfociti T (Fournel S 2000);
- mediante meccanismi indiretti favorendo la produzione di citochine a effetto inibitorio e l'induzione di cellule di tipo regolatorio: T CD4+HLA-G+ (Pankratz S 2014), cellule presentanti l'antigene HLA-G+ (G. S. Carosella ED 2011) e cellule dendritiche (Gregori S 2009).

Osservando quanto ampia sia la possibilità di azione dell'HLA-G, tale molecola è stata progressivamente indagata in varie condizioni patologiche, come i meccanismi di evasione tumorale e virale e le patologie autoimmuni. Tra le patologie autoimmuni è stata valutata sia nella sclerosi multipla (Wiendl H 2005), sia in patologie cutanee come il pemfigo e la psoriasi (Aractingi S 2001) (Sweeney C 2011).

Sclerodermia

La sclerodermia o sclerosi sistemica è una patologia cronica evolutiva ad eziologia sconosciuta. Dal punto di vista eziopatogenetico sembrano giocare un importante ruolo meccanismi di fibrosi eccessiva, alterazioni vascolari e anomalie del sistema immunitario.

Il danno vascolare, che teoricamente è presente in tutti gli organi, consiste in aumento degli spazi tra le cellule endoteliali con perdita di integrità dell'endotelio e vacuolarizzazione del citoplasma. Sono spesso presenti infiltrati perivascolari di cellule immunitarie mononucleate (con rari linfociti) nella parete vasale, lesioni obliterative micro-vascolari e diminuzione del numero dei capillari. Il depauperamento dei piccoli vasi in pazienti sclerodermici è una caratteristica degli stadi avanzati di malattia. Le cellule endoteliali, che costituiscono gli elementi precocemente colpiti dalla malattia, subiscono fenomeni di apoptosi e vengono sostituite da elementi cellulari provenienti dal midollo osseo, quali periciti e cellule muscolari lisce, che contribuiscono ad un progressivo ispessimento dei vasi.

I fibroblasti sembrano orchestrare la produzione, il deposito e il rimodellamento del collagene e degli altri componenti della matrice extracellulare, che causano la fibrosi caratteristica della malattia. I fibroblasti nella sclerodermia possono differenziare in miofibroblasti che esprimono numerose citochine come il transforming growth factor- β (TGF- β), la proteina chemiotattica per i monociti e il recettore per il TGF- β . Questi dati dimostrano il ruolo del sistema autocrino nel sostenere la reazione fibrotica. L'origine dei fibroblasti nella cute e negli organi interni di pazienti con sclerodermia è ancora dibattuto: essi possono derivare dall'attivazione locale o originare dai periciti residenti, dalle cellule staminali mesenchimali o dai loro progenitori reclutati dalla circolazione.

L'ultimo fattore, ma non per importanza, che sembra giocare un ruolo nell'eziopatogenesi della sclerodermia è l'anomalia del sistema immunitario, sia sul versante umorale sia cellulare. Gli infiltrati cellulari nelle lesioni precoci della sclerodermia consistono principalmente in macrofagi, mastcellule, linfociti B e linfociti T (principalmente linfociti T "helper" CD4+ attivati).

Una citochina particolarmente coinvolta nella patogenesi della sclerodermia sembra essere il TGF- β . Il TGF- β è il più potente induttore dei miofibroblasti e modula l'espressione di vari recettori per citochine tra cui il recettore per lo stesso TGF- β e il recettore per il "platelet derived growth factor" (PDGF). Nei fibroblasti sclerodermici, il TGF- β inoltre aumenta la sintesi del fattore di crescita per il tessuto connettivo (CTGF), che presenta un'attività biologica simile.

Oltre al TGF- β altri fattori solubili come l'endotelina-1 e il PDGF potrebbero giocare un ruolo sinergico nell'induzione della malattia (Gabrielli A 2009).

Dal punto di vista clinico la patologia può essere suddivisa in due forme, schematizzate come segue:

- Forma limitata, caratterizzata da fibrosi localizzata a livello di mani, viso, piedi e avambracci, presenza di anticorpi anti-centromero, presenza di ipertensione polmonare tardiva con o senza coinvolgimento dell'interstizio polmonare, calcificazioni, teleangectasie e fenomeno di Raynaud che può precedere di vari anni l'insorgenza della malattia.
- Forma diffusa, caratterizzata da fibrosi estesa al tronco, coinvolgimento degli organi interni (polmone, rene, tratto gastroenterico, miocardio), presenza di anticorpi anti-Scl70 e del fenomeno di Raynaud di recente insorgenza. (Silver 1991) (Wollheim 2005)

Alla luce degli innumerevoli effetti immunoregolatori della molecola dell'HLA-G, e considerando che ad oggi non esistono studi che ne indagano dettagliatamente il ruolo nell'eziopatogenesi della malattia, il presente studio ha l'obiettivo di determinare i livelli plasmatici di molecole HLA-G solubili (sHLA-G) in pazienti affetti da SSc mettendoli in relazione con i valori di IL-10, TGF- β , IL-4 e con i dati clinici (forma di malattia, pattern videocapillaroscopico, durata di malattia, etc.) e di valutare e quantificare la presenza dell'isoforma di membrana nelle biopsie cutanee e nelle cellule mononucleate provenienti dal sangue periferico.

Secondo Report

Si riporta sinteticamente l'attività svolta nel corso del secondo anno di attività relativamente al sottoprogetto intitolato: "Valutazione dei livelli sierici di molecole solubili HLA-G e delle espressioni di HLA-G nella cute quali marcatori diagnostici nella sclerosi sistemica".

Materiali e metodi

Casistica

Lo studio si svolge presso l'U.O. CLINICA DI MEDICINA INTERNA AD ORIENTAMENTO IMMUNOLOGICO dell'Ospedale San Martino – IST dove sono stati arruolati 44 pazienti. La diagnosi di SSc è stata effettuata e confermata secondo i criteri classificativi posti da EULAR/ACR (Van den Hoogen F 2013) secondo i quali un paziente è arruolabile con un punteggio ≥ 9 . La classificazione dei vari soggetti nelle due forme di malattia è stata effettuata secondo i criteri di LeRoy (LeRoy E C 1988).

Sono stati quindi arruolati 44 soggetti, con le seguenti caratteristiche:

	<u>SSc Diffusa</u>	<u>SSc Limitata</u>	<u>Totale</u>
<u>Maschi</u>	2	6	8
<u>Femmine</u>	13	23	36
<u>Totale</u>	15	29	44

Il dosaggio del titolo anticorpale ANA è risultato essere uguale o maggiore a 1:160 in tutti i casi. Per ogni paziente arruolato è stato successivamente creato un foglio elettronico dove raccogliere i dati clinici quali:

- Durata di malattia;
- Presenza e durata del fenomeno di Raynaud;
- Coinvolgimento del microcircolo mediante “pattern” video-capillaroscopico (Cutolo M 2010);
- Prove di funzionalità respiratoria con valutazione della DLCO;
- Motilità esofagea mediante manometria;
- Valore di Pressione Arteriosa Polmonare mediante ecografia cardiaca;
- Valore di Creatinina Plasmatica e Indice di Resistenza Renale.

Successivamente è stato allestito un gruppo di controllo costituito da 50 soggetti sani comparabili per sesso ed età.

Indagini di laboratorio eseguite

Valutazione fattori solubili

- Dosaggio dei livelli plasmatici di
 - o Molecole sHLA-G
 - o TGF-beta
 - o IL-10
 - o IL-4

Studio dei campioni ottenuti mediante biopsia cutanea.

La biopsia cutanea viene effettuata mediante tecnica “punch-biopsy” in una zona di cute patologica e in una zona di cute sana. Una parte del campione viene inclusa in paraffina e colorata con ematossilina ed eosina per una valutazione anatomopatologica standard (determinazione della fibrosi tipica quale conferma dell’appropriatezza del campione prelevato). Il resto del campione viene congelato per lo studio delle molecole di membrana mediante immunofluorescenza. In tal modo stiamo analizzando mediante tecnica di immunistoichimica:

- la presenza di HLA-G di membrana sulle cellule presenti nella cute.
- I fenotipi cellulari delle cellule HLA-G+, al fine di chiarire quale popolazione/i esprima/ano l’HLA-G.

Studio delle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC)

In tale contesto sono stati valutati:

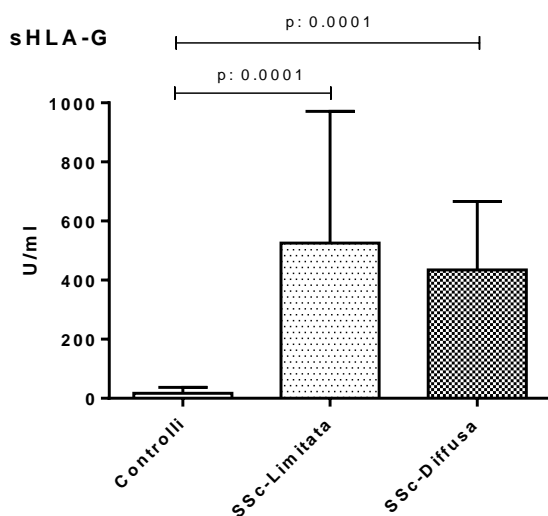
- Fenotipo linfocitario con percentuali e valori assoluti delle singole popolazioni;
- Percentuali di cellule attivate HLA-DR+ CD25+;
- Presenza di HLA-G su linfociti CD4+, linfociti CD8+ e su monociti.

Risultati e discussione

I risultati del presente studio possono essere sintetizzati come segue:

1. i livelli plasmatici di molecole sHLA-G sono significativamente più elevati nei pazienti con SSc diffusa e SSc limitata rispetto ai controlli sani

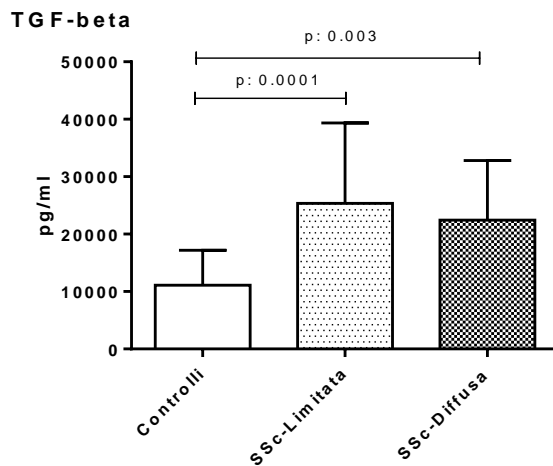
	Controlli	SSc Limitata	P	SSc Diffusa	P
sHLA-G (U/ml)	16,74 ± 20,58	525,83 ± 445,18	0.0001	434,95 ± 230,94	0.0001



Tale riscontro supporta la nostra ipotesi che prevede che la molecola dell'HLA-G possa essere coinvolta nell'eziopatogenesi della malattia. Sebbene non possiamo stabilire se l'aumento del sHLA-G giochi un ruolo diretto nell'induzione e nel mantenimento della malattia oppure rappresenti un epifenomeno della reazione infiammatoria innescata da altri meccanismi, un suo incremento così marcato suggerisce fortemente una disfunzione del sistema immunitario. Tale situazione è in accordo con quanto riscontrato in altre patologie autoimmuni, come la dermatite atopica e la sclerosi multipla, in cui comunque non è ancora stato possibile chiarire se l'aumentata sintesi di HLA-G sia dovuta a meccanismi intrinseci alla malattia o rappresenti una risposta ad un'eccessiva stimolazione immunitaria. (Khosrotehrani K 2001) (Menier C 2010). Per contro nella psoriasi sono stati riscontrati livelli diminuiti di sHLA-G: questo ha permesso di ipotizzare che una mancanza della molecola, caratterizzata da proprietà immunomodulanti a significato inibitorio, possa contribuire ad indurre uno stato pro-infiammatorio (Borghi A 2008). In altre patologie, come il LES, i risultati appaiono più controversi dove alcuni autori (R. Rizzo 2008) hanno rilevato una diminuzione dei livelli di sHLA-G mentre altri (Rosado S. 2008) ne hanno riscontrato un significativo aumento.

2. i livelli plasmatici di TGF- β sono significativamente più elevati nei pazienti con SSc diffusa e SSc limitata rispetto ai controlli sani ;

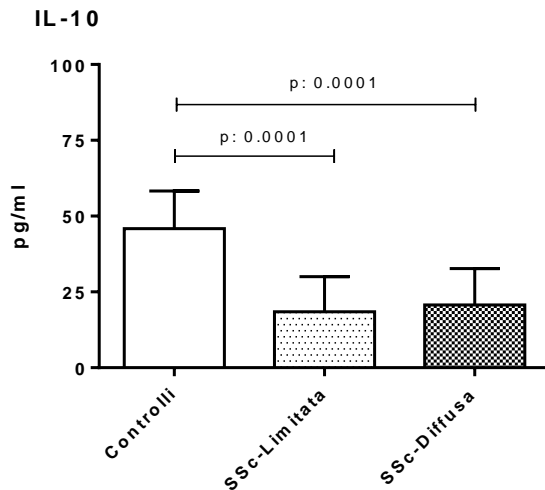
	Controlli	SSc Limitata	P	SSc Diffusa	P
TGF-β (pg/ml)	11099 \pm 6081	25351 \pm 14021	0.0001	22426 \pm 10377	0.003



Questo dato sembrerebbe essere in accordo con le attuali teorie patogenetiche della malattia, in cui il TGF- β risulterebbe la molecola pro-fibrotica maggiormente coinvolta nella patogenesi della malattia (Gabrielli A 2009).

3. i livelli plasmatici di IL-10 sono significativamente ridotti nei pazienti con SSc diffusa e SSc limitata rispetto ai controlli sani;

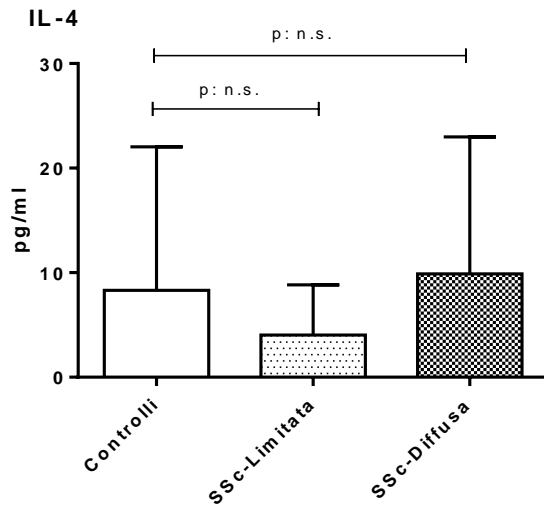
	Controlli	SSc Limitata	P	SSc Diffusa	P
IL-10 (pg/ml)	45,85 ± 12,44	18,46 ± 11,55	0.0001	20,72 ± 11,96	0.0001



L'IL-10 è una citochina che svolge un importante ruolo immuno-regolatorio in senso inibitorio. Il riscontro di una sua diminuzione è in accordo con i dati precedentemente pubblicati dal nostro gruppo secondo cui nella sclerodermia vi sarebbe un deficit quali-quantitativo di cellule regolatorie con una patologica espansione di cellule effettrici (Fenoglio D 2012) (B. F. Fenoglio D 2011). Inoltre, una diminuzione dei livelli di IL-10 è stata riscontrata anche in altre patologie autoimmuni come la psoriasi (Virgili 2008) e il LES (R. Rizzo 2008) nelle quali rappresenterebbe un segno della disfunzione del sistema immunitario in senso pro-infiammatorio (diminuzione delle cellule Treg).

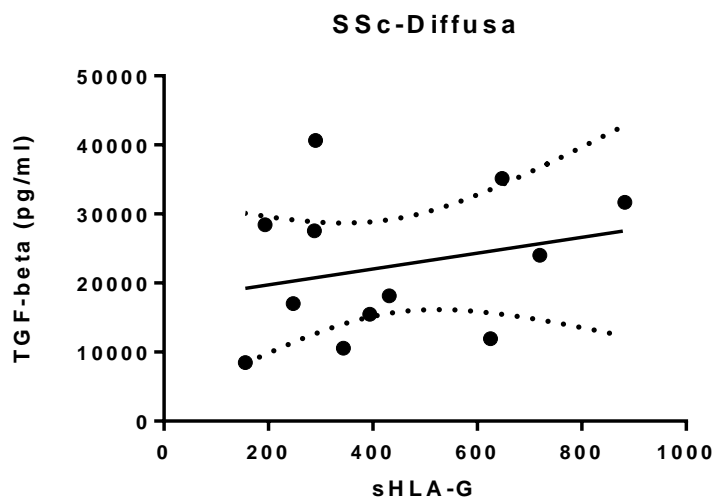
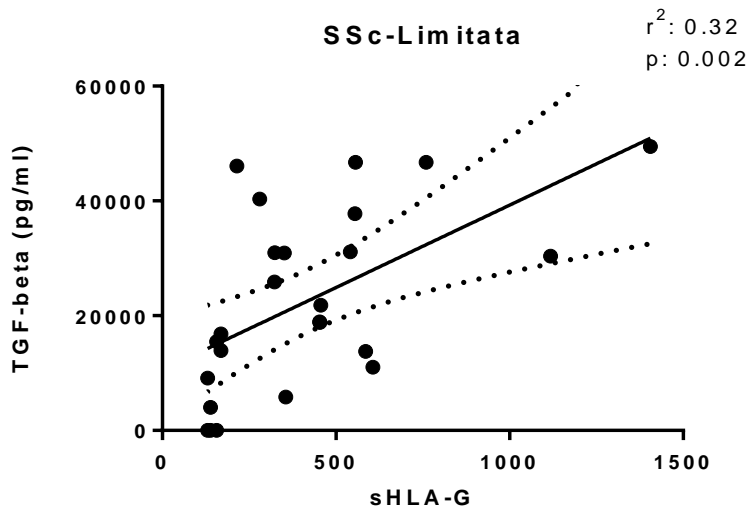
4. i livelli plasmatici di IL-4 non differiscono significativamente fra pazienti con SSc e controlli;

	Controlli	SSc Limitata	P	SSc Diffusa	P
IL-4 (pg/ml)	8,30 ± 13,73	4,03 ± 4,87	0.0001	9,88 ± 13,11	0.0001



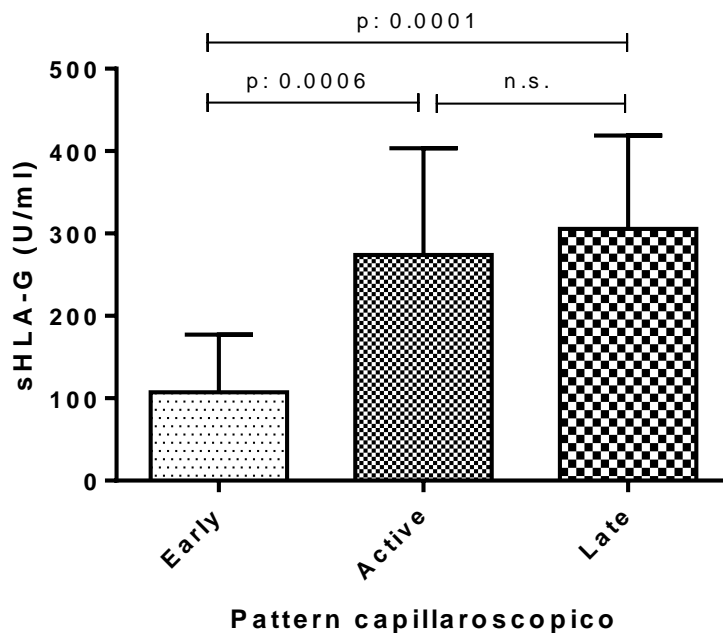
L'IL-4 è una citochina tipicamente associata alla polarizzazione Th2. Anche questo dato è in accordo con dati precedentemente pubblicati dal nostro gruppo che suggeriscono che la sclerodermia non sia una patologia a polarizzazione Th2/Th1 ma piuttosto sia correlata ad una iper-attivazione dei linfociti pro-infiammatori Th17 (B. F. Fenoglio D 2011) (Fenoglio D 2012).

5. nei pazienti affetti da SSc, specie in quelli con forma limitata, i livelli plasmatici di molecole sHLA-G correlano con quelli di TGF-beta ($r^2: 0.32 - p=0.002$);



Questo risultato sostiene l'ipotesi che l'HLA-G sia coinvolto nella patogenesi della malattia in quanto il suo aumento sembrerebbe correlare proprio con il TGF- β che è considerata la citochina chiave nella fibrosi sclerodermica. Non si può escludere che gli aumentati livelli di sHLA-G possano indurre un'iperproduzione di TGF-beta, o che, alternativamente, elevati livelli di TGF-beta inducano un'iper-secrezione di sHLA-g. Tale ipotesi è da approfondire e valutare con ulteriori studi a riguardo.

6. i pazienti con un pattern capillaroscopico “active” e “late”, indicativi di una fase più avanzata di malattia, presentano livelli plasmatici di molecole sHLA-G significativamente più elevati (rispettivamente, $273,9 \pm 129,8$ U/ml e $305,7 \pm 113,3$ U/ml – $p=0.0006$ e $p=0.0001$) in confronto ai pazienti con un pattern “early” ($107,3 \pm 69,8$ U/ml);



La correlazione tra la progressione capillaroscopica della sclerodermia e i livelli plasmatici di sHLA-G potrebbe suggerire l'utilizzo di tale molecola come marcatore surrogato di attività di malattia.

7. Abbiamo inoltre correlato i livelli di sHLA-G con la durata di malattia e del fenomeno di Raynaud, i valori di DLCO, la creatinina plasmatica e l'indice di resistenza renale. Tali comparazioni non hanno portato alcun riscontro significativo.

Programma di ricerca in atto

Attualmente è in corso l'esecuzione e la relativa analisi dei prelievi cutanei. In questo contesto stiamo valutando la presenza di HLA-G sui campioni biotici mediante tecniche di immunistochemica e i fenotipi delle cellule esprimenti tale molecola. I dati provenienti dall'analisi delle biopsie cutanee verranno correlati con i valori plasmatici di sHLA-G e TGF- β . Questa analisi dei prelievi biotici ci permetterà di capire quali siano le cellule implicate nella reazione infiammatoria direttamente a livello della sede dove la malattia si estrinseca, ovvero la cute. Nei soggetti sani l'HLA-G non è espresso a livello cutaneo ad eccezione della matrice ungueale dove sembra contribuisca al mantenimento di tale nicchia immunologica (Urosevic 2007). Tuttavia esistono esempi, quali la psoriasi, in cui la presenza di HLA-G a livello cutaneo suggerirebbe un ruolo di questa molecola nella patogenesi della malattia (Aractingi S 2001) (R.N. Cardili 2010). La sovra-espressione dell'HLA-G a livello cutaneo potrebbe giocare un ruolo diretto nell'induzione del danno cutaneo oppure, più probabilmente, potrebbe rappresentare un tentativo di risposta anti-infiammatoria contro l'infiltrato linfocitario pro-flogistico.

Oltre alla valutazione su campioni biotici cutanei, è in corso anche la determinazione dei livelli dell'isoforma di membrana dell'HLA-G sulle cellule mononucleate ottenute dal sangue periferico dei pazienti (PBMC, peripheral blood mononuclear cells). Tali dati vengono comparati con quelli ottenuti dall'analisi dei PBMC ricavati da soggetti sani. In particolare stiamo determinando il fenotipo linfocitario con percentuali e valori assoluti delle singole sottopopolazioni, la percentuale di cellule attivate (HLA-DR+ CD25+) e l'espressione di HLA-G sui linfociti CD4+ e CD8+ e sui monociti. Considerata l'esistenza di linfociti T CD4+HLA-G+ con proprietà immuno-regolatorie simili a quelle dei Treg CD4+CD25+ (Pankratz S 2014), valuteremo la presenza di tale sottopopolazione nei pazienti sclerodermici. Analogamente a quanto fatto con i campioni biotici i dati ottenuti verranno messi in relazione con i dosaggi citochinici, i dati clinici ed i pattern videocapillaroscopici.

Bibliografia

Abbas, Lichtman, Pillari. «Immunologia cellulare e molecolare.» *ELSEVIER*, 2012.

Amiot L, Ferrone S, Grosse-Wilde H, Seliger B. «Biology of HLA-G in cancer: a candidate molecule for therapeutic intervention?» *Cell Mol Life Sci*, 2011: 68(3):417-431.

Aractingi S, Briand N, Le Danff C et al. «HLA-G and NK receptor are expressed in psoriatic skin: a possible pathway for regulating infiltrating T cells?» *Am J Pathol*, 2001: 159:71-77.

Borghi A, Foglie E, Stignani M et al. «Soluble human leukocyte antigen-G and interleukin-10 levels in plasma of psoriatic patients: preliminary study on a possible correlation between generalized immune status, treatments and disease.» *Arch Dermatol Res*, 2008: 300:551-559.

Carosella ED, Favier B, Rouas-Freiss N, Moreau P, LeMaoult J. «Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule.» *Blood*, 2008: 111(10):4862-4870.

Carosella ED, Gregori S, LeMaoult J. «The tolerogenic interplay(s) among HLA-G, myeloid APCs, and regulatory cells.» *Blood*, 2011: 118(25):6499-505.

Carosella ED, Moreau P, Le Maoult J, Le Discorde M, Dausset J, Rouas-Freiss N. «HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance.» *Adv Immunol.*, 2003: 81:199-252.

- Cutolo M, Sulli A, Smith V. «Assessing microvascular changes in systemic sclerosis diagnosis and management.» *Nat. Rev. Rheumatol*, 2010: 6:578-587.
- Fainardi E, Castellazzi M, Stignani M, et al. «Emerging topics and new perspectives on HLA-G.» *Cell Mol Life Sci.*, 2011: 68(3):433-451.
- Fenoglio D, Battaglia F, Parodi A, Stringara S, Negrini S, Panico N, Rizzi M, Kalli F, Conteduca G, Ghio M, De Palma R, Indiveri F, Filaci G. «Alteration of Th17 and Treg cell subpopulations co-exist in patients affected with systemic sclerosis.» *Clin Immunol*, 2011: 139(3):249-57.
- Fenoglio D, Bernuzzi F, Battaglia F, Parodi A, Kalli F, Negrini S, De Palma R, Invernizzi P, Filaci G. «Th17 and regulatory T lymphocytes in primary biliary cirrhosis and systemic sclerosis as models of autoimmune fibrotic diseases.» *Autoimmun Rev*, 2012: 12(2):300-4.
- Fournel S, Aguerre-Girr M, Huc X, Lenfant F, Alam A, Toubert A, Bensussan A, Le Bouteiller P. «Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8+ cells by interacting with CD8.» *J Immunol*, 2000: 164(12):6100-4.
- Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. «Scleroderma.» *N Engl J Med.*, 2009 : 360(19):1989-2003.
- Geraghty DE, Koller BH, Orr HT. «A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment.» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987: 84(24):9145-9.
- Gonzalez A, Rebmann V, LeMaoult J, Horn PA, Carosella ED, Alegre E. «The immunosuppressive molecule HLA-G and its clinical implications.» *Crit Rev Clin Lab Sci.*, 2012: 49(3):63-84.
- Gregori S, Magnani CF, Roncarolo MG. «Role of human leukocyte antigen-G in the induction of adaptive type 1 regulatory T cells.» *Hum Immunol.*, 2009: 70(12):966-9.
- Khosrotehrani K, Le Danff C, Reynaud-Mendel B, Dubertret L, Carosella ED, Aractingi. «HLA-G expression in atopic dermatitis.» *J Invest Dermatol*, 2001: 117:750–2.
- Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R. «A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts.» *Science*, 1990: 248(4952):220-3.
- LeRoy E C, Black C, Fleischmajer R, et al. «Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis.» *J Rheumatol*, 1988: 15:202-5.
- Lin A, Zhang X, Xu HH, Xu DP, Ruan YY, Yan WH. «HLA-G expression is associated with metastasis and poor survival in the Balb/c nu/nu murine tumor model with ovarian cancer.» *Int J Cancer*, 2012: (in press).
- McMahan ZH, Hummers LK. «Systemic sclerosis - Challenges for clinical practice.» *Nat Rev Rheumatol.*, 2013: 9(2):90-100.
- McMaster MT, Librach C, Zhou Y, Lim KH, Janatpour MJ, DeMars R, Kovats S, Damsky C, Fisher SJ. «Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts.» *J Immunol*, 1995: 154(8):3771-8.

- Menier C, Rouas-Freiss N, Favier B, LeMaoult J, Moreau P, Carosella ED. «Recent advances on the non-classical major histocompatibility complex class I HLA-G molecule.» *Tissue Antigens*, 2010: 75:201–6.
- Morales PJ, Pace JL, Platt JS, Langat DK, Hunt JS. «Synthesis of beta(2)-microglobulin-free, disulphide-linked HLA-G5 homodimers in human placental villous cytotrophoblast cells.» *Immunology*, 2007: 122(2):179-88.
- Pankratz S, Bittner S, Herrmann AM, Schuhmann MK, Ruck T, Meuth SG, Wiendl H. «Human CD4+ HLA-G+ regulatory T cells are potent suppressors of graft-versus-host disease in vivo.» *FASEB J.*, 2014: 28,000-000.
- Park GM, Lee S, Park B, Kim E, Shin J, Cho K, Ahn K. «Soluble HLA-G generated by proteolytic shedding inhibits NK-mediated cell lysis.» *Biochem Biophys Res Commun.*, 2004: 313(3):606-11.
- R. Rizzo, T. V. F. Hviid, M. Govoni, M. Padovan, M. Rubini¹, L. Melchiorri, M. Stignani, S. Carturan, M. T. Grappa, M. Fotinidi, S. Ferretti, A. Voss, H. Laustrop, P. Junker, F. Trotta & O. R. Baricordi. «HLA-G genotype and HLA-G expression in systemic lupus erythematosus: HLA-G as a putative susceptibility gene in systemic lupus erythematosus.» 2008: 71:520–529.
- R.N. Cardili, T.G. Alves,* J.C.O.C. Freitas, C.P. Soares,* C.T. Mendes-Junior, E.G. Soares, E.A. Donadi C. Silva-Souza. «Expression of human leucocyte antigen-G primarily targets affected skin of patients with psoriasis.» *British Journal of Dermatology*, 2010: 163:769–775.
- Riteau B, Rouas-Freiss N, Menier C, Paul P, Dausset J, Carosella ED. «HLA-G2, -G3, -G4 isoforms expressed as nonmature cell surface glycoproteins inhibit NK and antigen-specific CTL cytotoxicity.» *J Immunol*, 2001: 166(8):5018-26.
- Rizzo R, Bortolotti D, Baricordi OR, Fainardi E. «New insights into HLA-G and inflammatory disease.» *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2012: 11(6):448-63.
- Rosado S., Gema Perez-Chacona, Inmaculada Sanchez-Vegazoc, Carmen Bellas-Menendez, Maria Jesus Citores, Ignacio Losada-Fernandez, Trinidad Martin-Donaire, Nerea Rebolleda, Paloma Perez-Aciego. «Expression of human leukocyte antigen-G in systemic lupus erythematosus.» *Human Immunology*, 2008: 69:9 –15.
- Rouas-Freiss N, Marchal RE, Kirzenbaum M, Dausset J, Carosella ED. «The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors?» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997: 94(10):5249-54.
- Silver, Richard M. «Clinical aspects of systemic sclerosis (scleroderma).» *Annals of the Rheumatic Diseases*, 1991: 50: 854-861.
- Sweeney C, Kirby B. «Does HLA-G prevent tissue destruction in psoriasis?» *Br. J. Dermatol.*, 2011: 164(5):1118-1119.
- Urosevic, Mirjana. «HLA-G in the skin—Friend or foe?» *Seminars in Cancer Biology* 17, 2007: 480–484.
- Van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, Matucci-Cerinic M, Naden RP, Medsger TA Jr, Carreira PE, Riemekasten G, Clements PJ, Denton CP, Distler O, Allanore Y, Furst DE,

Gabrielli A, Mayes MD, van Laar JM, Seibold JR, Czirja. «2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative.» *Arthritis Rheum.*, 2013: 65(11):2737-47.

Virgili, Alessandro Borghi · Emanuela Fogli · Marina Stignani Loredana Melchiorri · Ermete Altieri Olavio Baricordi · Roberta Rizzo · Annarosa. «Soluble human leukocyte antigen-G and interleukin-10 levels.» *Arch Dermatol Res*, 2008: 300:551–559.

Wastowski IJ, Sampaio-Barros PD, Amstalden EM, Palomino GM, Marques-Neto JF, Crispim JC, Biral AC, Rassi DM, Carosella ED, Moreau P, Donadi EA. «HLA-G expression in the skin of patients with systemic sclerosis.» *J Rheumatol.*, 2009: 36(6):1230-4.

Wiendl H, Feger U, Mittelbronn M et al. «Expression of the immune-tolerogenic major histocompatibility molecule HLA-G in multiple sclerosis: implications for CNS immunity.» *Brain*, 2005: 128:2689-2704.

Wollheim, F. A. «Classification of systemic sclerosis. Visions and reality.» *Rheumatology*, 2005: 44:1212–1216.

Zhu CB, Wang CX, Zhang X, Zhang J, Li W. «Serum sHLA-G levels: a useful indicator in distinguishing colorectal cancer from benign colorectal diseases.» *Int J Cancer*, 2011: 128:617-622.