

IL RUOLO DELLE CELLULE NATURAL KILLER NELLA SCLEROSI SISTEMICA

Dott.ssa Marta Cossu

Medico ricercatore

University Medical Center Utrecht

Laboratory of Translational Immunology

Department of Rheumatology & Clinical Immunology

Paesi Bassi

Supervisore: Prof. Dr. T.R.D.J. Radstake, MD, PhD

Relazione Intermedia - 25 Aprile 2012

Background scientifico:

La sclerosi sistemica (o sclerodermia, SSc) è una patologia complessa, caratterizzata da danno endoteliale e alterazioni del microcircolo, con fibrosi progressiva a carico della cute e degli organi interni.

Crescente importanza è ormai attribuita al ruolo del sistema immunitario nel processo patogenetico, con evidenze a carico di una disregolazione del compartimento T e B linfocitario e a carico delle cellule dendritiche, in particolare in risposta a stimolazione dei Toll-Like Receptors^{1,2,3,4,5}.

Uno dei punti di regolazione del sistema immunitario è rappresentato dalle cellule Natural Killer (NK). La capacità citotossica e il rapido rilascio di citochine che ne seguono l'attivazione consentono alle cellule NK di influenzare significativamente la risposta immunitaria verso patogeni, cellule tumorali e autoantigeni rilasciati durante fenomeni di morte cellulare, e di modulare finemente lo stato di maturazione e attivazione di cellule dendritiche e linfociti T o B autoreattivi.

Lo stato funzionale delle cellule NK è regolato dal bilancio tra i segnali che si sviluppano da un'ampia gamma di recettori polimorfici, attivatori e inibitori⁶: la famiglia dei KIR (Killer Immunoglobulin-like Receptors), i recettori di citotossicità (o NCR, NKp30, NKp44, NKp46), i recettori NKG2 (NKG2A, NKG2C e NKG2D), tra gli altri. La conformazione fenotipica dei recettori è influenzata a sua volta dai mediatori presenti nel microambiente tissutale e circolatorio (citochine, Danger-Associated o Pathogen-Associated Molecular Pattern Molecules) e dal legame con i relativi ligandi presenti sulle cellule bersaglio e sulle altre cellule del sistema immunitario.

Esiste un modesto numero di studi - tra loro in parte contraddittori - riguardanti l'enumerazione delle cellule NK circolanti in associazione con il *subset* di malattia nella sclerosi sistemica^{7,8,9}. Lo studio del gruppo di Horikawa suggerisce che la capacità citotossica delle cellule NK è ridotta nei pazienti sclerodermici, anche se l'espressione del marker di attivazione precoce CD69 risulta aumentato, identificando una popolazione cellulare attivata ma funzionalmente difettiva. Esistono, inoltre, dati che documentano l'associazione genetica tra determinati KIR e la sclerodermia^{10,11}.

Al momento attuale mancano dati riguardanti l'espressione fenotipica dei recettori NK che possano indirizzare una fine caratterizzazione funzionale di queste cellule e la determinazione del loro ruolo nella patogenesi della sclerosi sistemica e nell'estrinsecazione dell'aberrante risposta immunitaria che si osserva in questi pazienti.

Ipotesi:

La disregolazione del compartimento NK contribuisce a provocare l'aberrante attivazione del sistema immunitario osservata nella sclerosi sistemica.

Scopo della Ricerca:

Consapevoli del fatto che non è possibile fornire prove adeguate della nostra ipotesi in un solo anno, in questo progetto proponiamo un approccio *multi-step* per valutare la popolazione NK nei pazienti sclerodermici e fornire un terreno fertile per proseguire la ricerca.

In tale approccio la caratterizzazione fenotipica dei recettori delle cellule NK in un gruppo di pazienti sclerodermici, raffrontato ad un gruppo di controlli sani, rappresenta l'obiettivo primario; gli studi funzionali verranno successivamente impostati sulla base dei risultati ottenuti dall'analisi fenotipica.

Metodi:

Pazienti e Donatori sani:

Previa approvazione del comitato etico locale ed ottenimento di consenso informato, sono stati fino ad ora arruolati 16 pazienti consecutivi afferenti all'ambulatorio del dipartimento di Reumatologia dell'ospedale UMC St Radboud di Nijmegen, che soddisfano i criteri ARA per la diagnosi di sclerosi sistemica¹² (le caratteristiche cliniche dei pazienti inclusi sono descritte in Tabella 1), con forma limitata (ISSc) o diffusa (dSSc) di malattia¹³. Una storia anamnestica di cancro e/o di trapianto di midollo osseo hanno comportato l'esclusione dallo studio. 18 donatori sani correlati al gruppo di pazienti per etnia ed età sono stati inclusi nello studio.

Analisi citofluorimetriche:

I PBMC (Periferal Blood Mononuclear Cells) sono stati isolati da campioni di sangue periferico eparinato mediante ultracentrifugazione su gradiente di Ficoll-Paque (Amersham Bioscience). Dopo opportuni lavaggi, l'espressione dei recettori NK è stata analizzata incubando i PBMC con tre diverse combinazioni di anticorpi monoclonali (descritte nei pannelli in Tabella 2) a 4 gradi per 20 minuti al buio. I campioni sono stati quindi acquisiti con citofluorimetro Navios a 3 laser e 10 colori (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Previa ottimizzazione dei settaggi PMT, si è provveduto alla compensazione dell'interferenza di segnale mediante marcatura a singolo colore. La percentuale di cellule NK (CD56+CD3-) ed NKT (CD56+CD3+) positive per i diversi marker è stata definita nell'ambito della popolazione linfocitaria secondo le caratteristiche di FS/SS e la positività per l'antigene di superficie CD45. Popolazioni cellulari > 0.1% all'interno dei PBMC positivi per CD45 e con una soglia di almeno 1000 cellule sono state considerate attendibili; le popolazioni che non hanno soddisfatto tali criteri sono state escluse dalle analisi.

Le analisi sono state eseguite utilizzando il programma Kaluza 1.2 (Beckman Coulter).

Analisi statistiche:

La frequenza di espressione dei recettori NK è stata comparata tra pazienti e donatori sani ed all'interno del gruppo di pazienti suddivisi per caratteristiche cliniche mediante Mann-Whitney U test. Valori di p inferiori a 0.05 sono stati considerati significativi. I dati sono descritti come media \pm deviazione standard (DS) della media. Le analisi sono state eseguite con il programma GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Risultati preliminari:

1) La frequenza di NK ed NKT non differisce tra pazienti sclerodermici e donatori sani.

La frequenza di cellule NK nell'ambito dei PBMC appare ridotta nei pazienti sclerodermici rispetto ai controlli sani (Fig. 1A), in particolare nei pazienti con la forma diffusa di malattia (Fig. 1B), senza però che il trend raggiunga una significatività statistica.

Non sono apprezzabili differenze nella frequenza di NKT nei pazienti e nei donatori sani (Figg. 1A e 1B).

2) Aumento della frequenza di cellule NK positive per NKG2A/CD94 nei pazienti sclerodermici

La frequenza di NK che esprimono il recettore inibitorio NKG2A/CD94 risulta aumentata nei pazienti con SSc rispetto ai controlli sani (Fig. 2A; media $43.23 \pm 23.12\%$ vs $27.61 \pm 14.14\%$, $p=0.0261$ per NKG2A; media $57.95 \pm 22.04\%$ vs $40.75 \pm 16.74\%$, $p=0.0238$ per CD94), mentre la frequenza di cellule NK che esprimono la controparte attivatoria NKG2C è bassa ma non differisce dal gruppo dei controlli sani (Fig. 2A). La frequenza di NK che esprimono NKG2A/CD94 è aumentata rispetto ai donatori sani in particolare nei pazienti con dSSc (Fig. 2B; media $51.14 \pm 26.11\%$, $p=0.0211$ per NKG2A; media $63.56 \pm 24.16\%$, $p=0.0282$ per CD94) e nello stesso gruppo di pazienti la frequenza di NK che esprimono NKG2C risulta significativamente ridotta rispetto a quella nei controlli sani, seppur anch'essa bassa (Fig. 2B; media $1.813 \pm 1.585\%$ vs $5.261 \pm 5.003\%$, $p=0.0398$). La frequenza di NKG2A/CD94 nelle cellule NK dei pazienti con fibrosi polmonare (Fig. 2C; media $49.26 \pm 18.22\%$, $p=0.0370$ per NKG2A; media $62.70 \pm 18.48\%$, $p=0.0370$ per CD94) e nei pazienti con positività per gli autoanticorpi Scl70 (Fig. 2D; media $53.09 \pm 30.21\%$, $p=0.0455$ per NKG2A; media $66.63 \pm 24.98\%$, $p=0.0455$ per CD94) ed ANA (Fig. 2D; media $60.44 \pm 11.87\%$, $p=0.0032$ per NKG2A; media $76.62 \pm 8.462\%$, $p=0.032$) risulta anch'essa aumentata rispetto ai donatori sani.

Nessuna differenza è stata rilevata nella frequenza di cellule NKT che esprimono NKG2A/CD94 e NKG2C/CD94 tra pazienti sclerodermici e controlli sani (dati non mostrati).

3) Aumento della frequenza di cellule NK che esprimono NKG2D nei pazienti con fibrosi polmonare e della frequenza di cellule NKT che esprimono NKG2D nei pazienti sclerodermici

La frequenza di cellule NK che esprimono il recettore attivatorio NKG2D non differisce tra pazienti e controlli sani (Figg. 3A e 3B), ma risulta aumentata specificamente nei pazienti con fibrosi polmonare (Fig. 3C; media $94.94 \pm 0.975\%$ vs $88.32 \pm 8.856\%$, $p=0.0454$). Nella popolazione NKT, al contrario, la frequenza di cellule che esprimono NKG2D è aumentata nei pazienti rispetto ai controlli sani (Fig. 3A; media $86.14 \pm 6.168\%$ vs $74.00 \pm 13.54\%$, $p=0.0037$), in particolare nei pazienti con forma limitata di malattia rispetto ai pazienti con dSSc (Fig. 3B; media $90.71 \pm 4.263\%$ vs $81.58 \pm 3.955\%$, $p=0.003$) e rispetto ai controlli sani (Fig. 3B; media $90.71 \pm 4.263\%$, $p=0.003$), ma non nei pazienti con fibrosi polmonare (Fig. 3C). La frequenza di NKG2D risulta comunque molto alta in tutti i gruppi raffrontati e la rilevanza funzionale delle seppur significative differenze osservate necessita di essere approfondita. Ad ulteriore discriminazione si provvederà all'analisi dell'MFI.

4) Aumento della frequenza di cellule NK ed NKT positive per NKp30 e delle cellule NK positive per NKp44 nei pazienti sclerodermici

La frequenza di cellule NK ed NKT che esprimono il recettore NKp30 risulta aumentata nei pazienti sclerodermici rispetto ai controlli sani (Fig. 4A; media $44.46 \pm 20.92\%$ vs $28.05 \pm 14.52\%$, $p=0.0324$ nella popolazione NK; media $17.22 \pm 15.23\%$ vs $7.900 \pm 5.998\%$, $p=0.0306$ nella popolazione NKT), in particolare nel subset ISSc (Fig. 4B; media $54.35 \pm 22.78\%$, $p=0.0157$ nella popolazione NK; media $26.24 \pm 19.90\%$, $p=0.0073$ nella popolazione NKT) e nei pazienti con fibrosi polmonare (Fig. 4C; media $59.00 \pm 14.83\%$, $p=0.0073$ nella popolazione NK; media $24.10 \pm 4.101\%$, $p=0.0376$ nella popolazione NKT).

Nella popolazione NK anche il recettore NKp44 risulta aumentato nei pazienti sclerodermici rispetto ai controlli sani (Fig. 5A; media $0.3933 \pm 0.4605\%$ vs $0.1056 \pm 0.1984\%$, $p=0.0266$), in particolare nei pazienti con ISSc (Fig. 5B; media $0.5250 \pm 0.5523\%$, $p=0.0294$) e nei pazienti con fibrosi polmonare (Fig. 5C; media $0.4000 \pm 0.2160\%$, $p=0.0203$); ma la frequenza risulta comunque molto bassa e l'eventuale rilevanza funzionale della seppur aumentata frequenza di espressione rimane da approfondire.

Nessuna differenza è stata riscontrata nella frequenza di NKp46 tra pazienti e donatori sani (dati non mostrati).

5) Diminuita frequenza delle cellule NK positive per CD158ah ed aumentata frequenza delle cellule NKT positive per CD158b1b2j nei pazienti sclerodermici

La frequenza di cellule NK che esprimono CD158ah (il recettore inibitorio KIR2DL1 o la controparte attivatoria KIR2DS1) non differisce tra pazienti e controlli sani (Fig. 6A), ma è invece chiaramente diminuita quando si guarda al subset diffuso di malattia rispetto alla forma limitata (Fig. 6B; media $12.10 \pm 12.17\%$ vs $29.11 \pm 13.22\%$, $p=0.0054$) e rispetto ai donatori sani (Fig. 6B; media $12.10 \pm 12.17\%$ vs $26.85 \pm 13.25\%$, $p=0.0098$). Gli anticorpi utilizzati non permettono di discriminare se l'espressione diminuita sia a carico del recettore inibitorio o di quello attivatorio, in quanto la porzione extracellulare riconosciuta dall'anticorpo risulta identica; per discriminare tra recettore attivatorio ed inibitorio occorrerà caratterizzare genotipicamente e funzionalmente i singoli individui.

Non sono riscontrabili differenze significative nella popolazione NKT per CD158ah tra pazienti e donatori sani.

La frequenza di cellule NKT che esprimono CD158b1b2j (KIR2DL2/KIR2DL3/KIR2DS2) appare aumentata nei pazienti rispetto ai controlli sani, ma senza che sia raggiunta alcuna significatività statistica. Nessuna differenza è apprezzabile tra pazienti e controlli sani a carico di CD158b1b2j nel compartimento NK (dati non mostrati).

Vi è solo un trend verso un'aumentata frequenza di cellule NK ed NKT che esprimono CD158i (il recettore attivatorio KIR2DS4) nei pazienti con ISSc rispetto ai pazienti con la forma diffusa di malattia e ai controlli sani, ma la differenza non è statisticamente significativa (dati non mostrati).

Nessuna differenza è apprezzabile tra pazienti e donatori sani a carico di CD158e1e2 (dati non mostrati).

Inoltre, nessuna differenza è stata riscontrata nella frequenza di cellule NK ed NKT che esprimono CD16 e nella frequenza di cellule NK ed NKT che esprimono CD244 tra pazienti sclerodermici e controlli sani.

Conclusioni e Piani futuri:

Le analisi fino ad ora attuate consentono di effettuare una prima sintetica discriminazione tra il fenotipo espresso nelle cellule NK/NKT dei pazienti con dSSc e dei pazienti con ISSc.

Nella forma diffusa sembra prevalere una popolazione cellulare immatura, caratterizzata dall'aumentata frequenza del recettore inibitorio NKG2A/CD94 e dalla diminuita frequenza di CD158ah¹⁴.

Nella forma limitata, invece, l'aumentata frequenza di NKp30 depone per un fenotipo attivato ed orientato verso la lisi di cellule bersaglio e cellule dendritiche immature¹⁵.

Nei prossimi mesi si procederà ad:

- 1) incremento del numero di pazienti (fino ad un totale di 30, egualmente ripartiti tra forma limitata e diffusa di malattia) e controlli sani (fino ad un totale di 30) da includere nelle analisi fenotipiche e completamento delle correlazioni tra caratteristiche cliniche ed espressione fenotipica
- 2) ampliamento delle analisi fenotipiche, con particolare riferimento ad
 - a) analisi delle sottopopolazioni CD56^{bright}/CD16^{dim} e CD56^{dim}/CD16^{bright} per ottenere indicazioni rispetto allo stato di maturazione e al profilo citotossico/immunoregolatorio della popolazione NK/NKT
 - b) analisi della Mean Fluorescence Intensity, dove opportuno (recettori NCRs, NKG2), per meglio definire le variazioni di frequenza riscontrate
 - c) analisi dei pattern di co-espressione secondo i pannelli descritti in Tabella 2
- 3) raccolta di siero per analisi dei ligandi recettoriali circolanti (B7-H6 per NKp30, tra gli altri) e DNA per la caratterizzazione genotipica dei KIR da pazienti e controlli sani che verranno inclusi.

Tablelle:

Tabella 1: Caratteristiche cliniche dei pazienti inclusi:

| Caratteristiche: | ISSc | dSSc |
|-------------------------------------------------------------|-------------------|------------------|
| Numero | 8 | 8 |
| Donne (n, %) | 6 (75) | 6 (75) |
| Durata di malattia (anni, media \pm DS) | 8 (\pm 6) | 7.4 (\pm 4.6) |
| Età all'esordio (media \pm DS) | 45.3 (\pm 9.1) | 43.4 (\pm 13) |
| Positività per ANA* (n, %) | 8 (100) | 8 (100) |
| per Scl70 (n, %) | 2 (25) | 2 (25) |
| per ACA (n, %) | 2 (25) | 1 (12.5) |
| Fibrosi polmonare (n, %) | 2 (25) | 2 (25) |
| Ipertensione polmonare (n, %) | 1 (12.5) | 1 (12.5) |
| Terapia in corso all'inclusione (n, %): | | |
| Ciclofosfamide** | 0 (0) | 2 (25) |
| Metotrexato | 3 (37.5) | 3 (37.5) |
| Azatioprina | 2 (25) | 2 (25) |
| Micofenolato Mofetile | 0 (0) | 1 (12.5) |
| Idrossiclorochina | 1 (12.5) | 0 (12.5) |
| Prednisone > 15 mg/die | 0 (0) | 0 (0) |
| Prednisone < 15 mg/die | 1 (12.5) | 2 (25) |

ANA = anticorpi antinucleo; ACA = anticorpi anticentromero.

* = per 4 pazienti con positività ANA (2 = ISSc e 2 = dSSc), caratterizzazione ENA ancora in corso al momento delle analisi. Questi pazienti sono stati esclusi dalle analisi fenotipiche riguardanti la discriminazione anticorpale e verranno inclusi ad indagini ultimate.

** = entrambi i pazienti hanno ricevuto cicli di ciclofosfamide i.v. che si sono conclusi nell'anno precedente all'inclusione nello studio, nessuna terapia con ciclofosfamide in corso al momento dell'inclusione.

Tabella 2: Pannelli di combinazioni anticorpali per la determinazione fenotipica delle cellule NK mediante citofluorimetria a 10 colori.

| Pannello | FL1-FITC | FL2-PE | FL3-ECD | FL4-PE cy5.5 | FL5-PE Cy7 | FL6-APC | FL7-APC700 | FL8-APC750 | FL9-PB | FL10-Krome Orange |
|----------|----------|--------|---------|--------------|------------|-----------|------------|------------|--------|-------------------|
| 1 | CD4 | CD56 | CD8 | CD158i | CD158b | CD314 | CD158a | CD3 | CD159a | CD45 |
| 2 | CD28 | NKG2C | CD8 | CD4 | CD56 | CD158e1e2 | CD244 | CD3 | CD159a | CD45 |
| 3 | CD16 | CD336 | CD3 | CD337 | CD335 | CD314 | CD8 | CD56 | CD94 | CD45 |

Lista degli anticorpi in uso nei pannelli:

- CD4 FITC, clone 13B8.2, IgG1, Beckman Coulter
- CD28 FITC, clone CD28.2, BD, IgG1
- CD16 FITC, clone 3G8, IgG1, BD
- CD56 PE, MY31, IgG1, BD (N.B. in this experiment an expired vial of antibody was used)
- NKG2C PE, mouse IgG1, cat. No. FAB138P, R&D systems, clone 134591
- CD336 PE (NKp44), clone z231, IgG1 mouse, Beckman Coulter
- CD8 ECD, clone SFC121Thy2D3, Beckman Coulter, ref. 737659, lot. 7974005, IgG1
- CD3 ECD, clone UCHT1, mouse IgG1, Beckman Coulter
- CD158i PC5.5, Beckman Coulter, IM99512, lot 09eur222, clone FES172, IgG2a

- CD4 PECy5.5, clone 13B8.2, IgG1, Beckman Coulter
- CD337 PE Cy5 (NKp30), clone z25, IgG1 kappa mouse, Beckman Coulter
- CD158b1b2j PE Cy7, cloneGL183, mouse IgG1, Beckman Coulter
- CD56 Cy7, clone N901, ref A21692, IgG1, Beckman Coulter
- CD335 Cy7 (NKp46), clone BAB281, IgG1 mouse, Beckman Coulter
- CD314 NKG2D APC, clone ON72, mouse IgG1, A22329, Beckman Coulter
- CD158e1e2 APC, clone z27.3.7, IgG1 mouse, Beckman Coulter
- CD158ah APC Alexa 700, clone EB6.B.3.1.1, isotype IgG1 mouse, Beckman Coulter, IM99531, lot. 09eur116
- CD244 APC-Alexa fluor 700, clone C1.7.1, IgG1 mouse, Beckman Coulter
- CD8 APC-Alexa fluor700, clone B9.11, IgG1 kappa mouse, Beckman Coulter
- CD3-APC-Alexa fluor 750, clone UCHT1, IgG1 kappa mouse, Beckman Coulter
- CD56-APC-Alexa fluor 750, clone N901, IgG1, Beckman Coulter
- CD159a Pacific Blue, P239-1, 188 µg/ml, 19-06-09
- CD94 Pacific Blue, clone HP3B1, IgG2a mouse, Beckman Coulter
- CD45 Krome Orange

Figure:

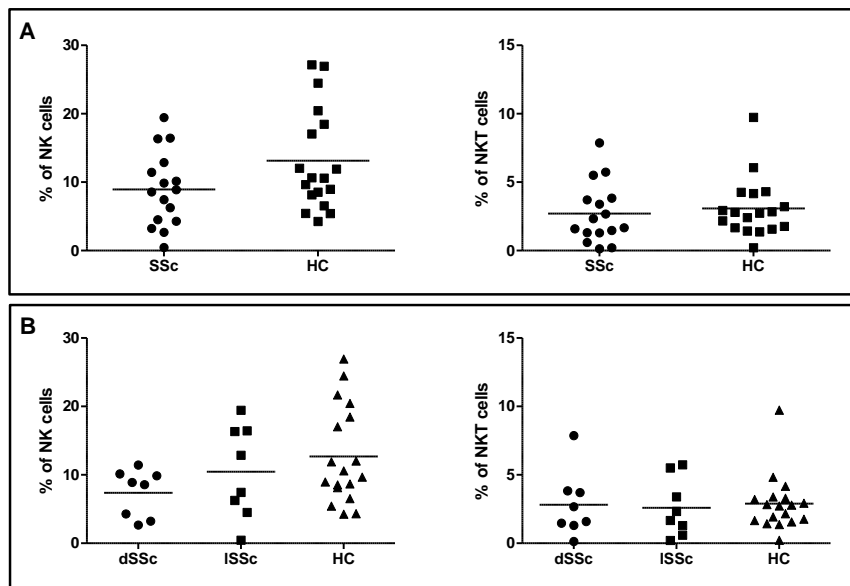


Figura 1: Frequenza di cellule NK ed NKT nel contesto dei PBMC **A)** nei pazienti con SSc raffrontati ai controlli sani; **B)** nei pazienti comparati per subset di malattia (dSSc, ISSc) e rispetto ai controlli sani. La barra nera indica la media delle diverse osservazioni.

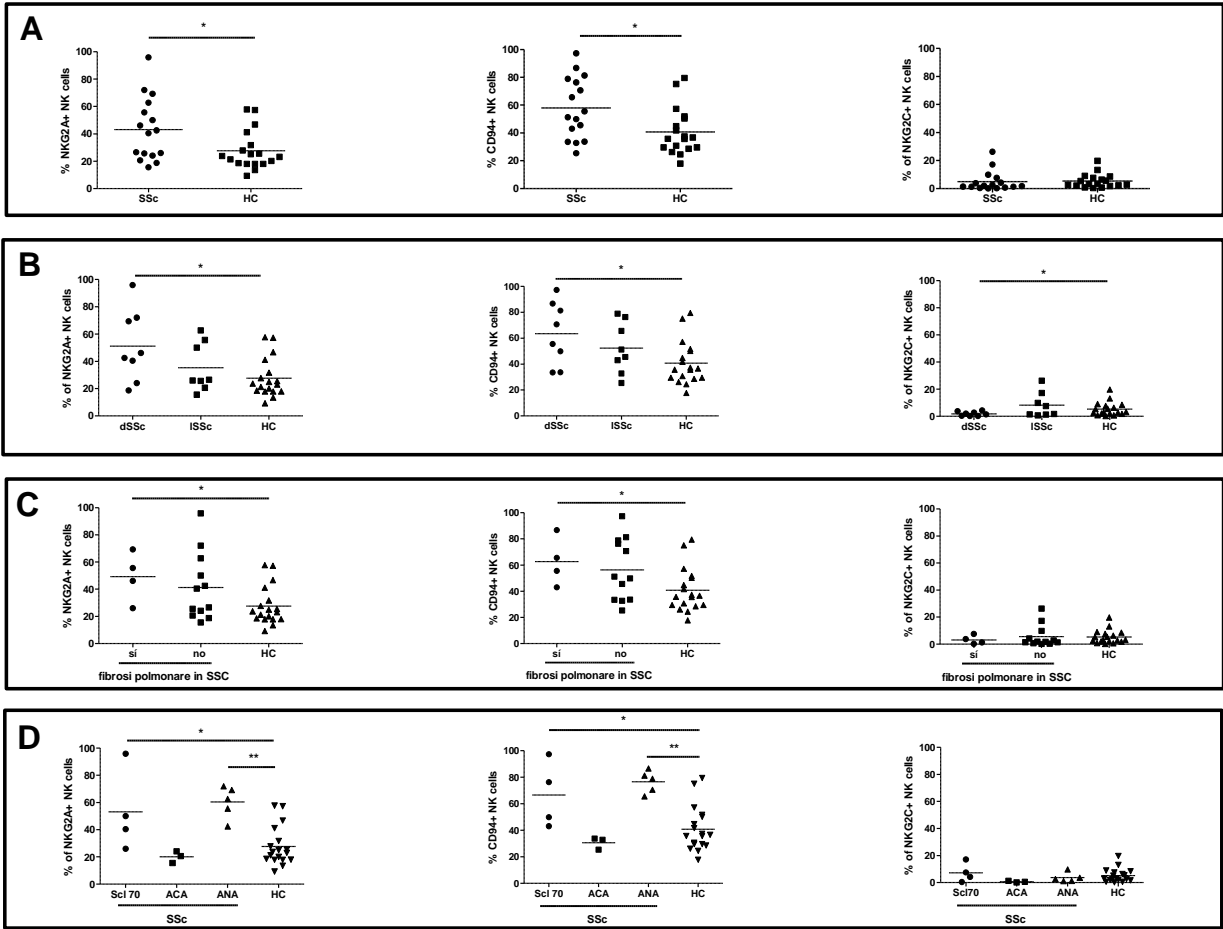


Figura 2: Frequenza di cellule NK che esprimono NKG2A, CD94, NKG2C **A)** nei pazienti con SSc raffrontati ai controlli sani; **B)** nei pazienti comparati per subset di malattia (dSSc, ISSc) e rispetto ai controlli sani; **C)** nei pazienti comparati secondo la presenza o assenza di fibrosi polmonare e rispetto ai controlli sani; **D)** nei pazienti comparati per diversa specificità anticorpale (ANA, SCI70, ACA) e rispetto ai controlli sani. La barra nera indica la media delle diverse osservazioni. * $p < 0.05$.

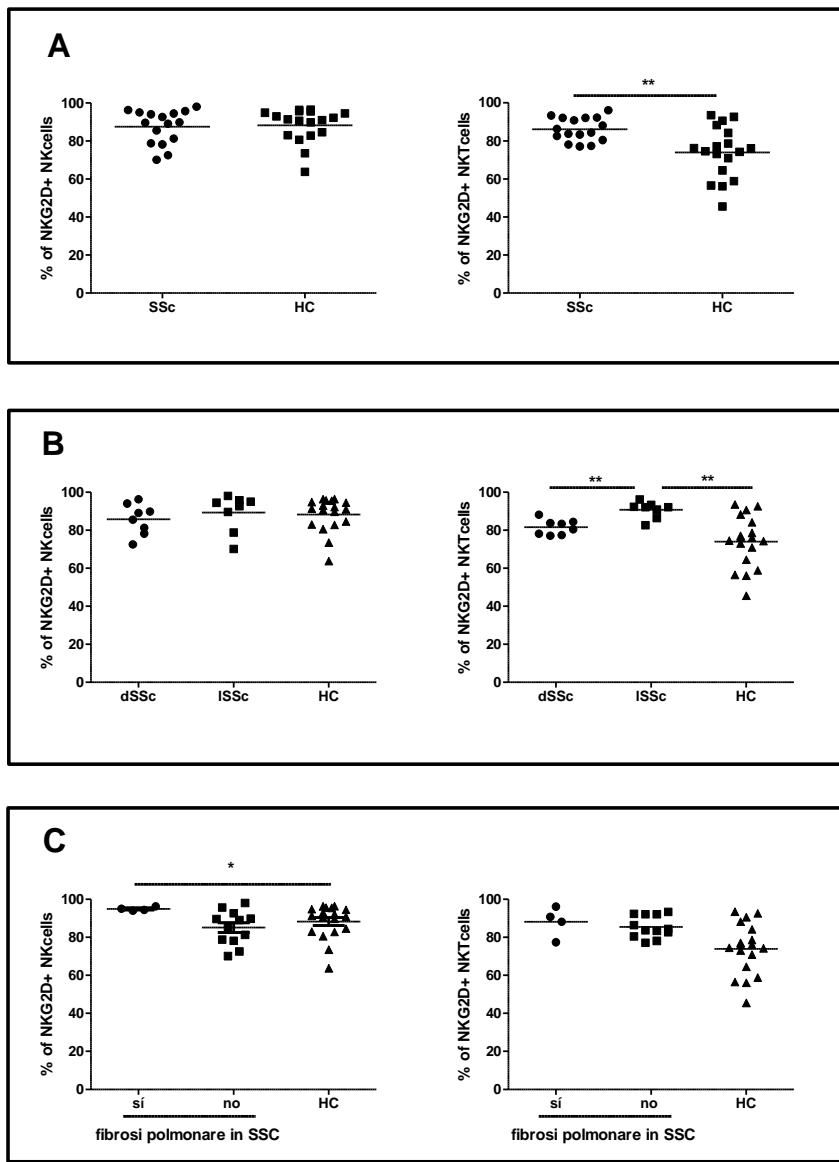


Figura 3: Frequenza di cellule NK ed NKT che esprimono NKG2D **A)** nei pazienti con SSc raffrontati ai controlli sani; **B)** nei pazienti comparati per subset di malattia (dSSc, ISSc) e rispetto ai controlli sani; **C)** nei pazienti comparati secondo la presenza o assenza di fibrosi polmonare e rispetto ai controlli sani. La barra nera indica la media delle diverse osservazioni. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

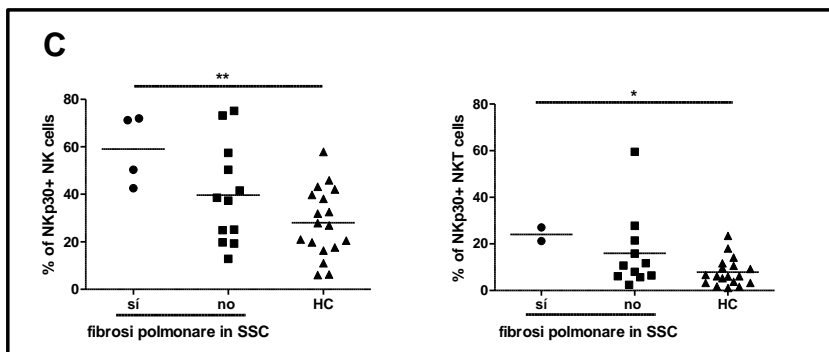
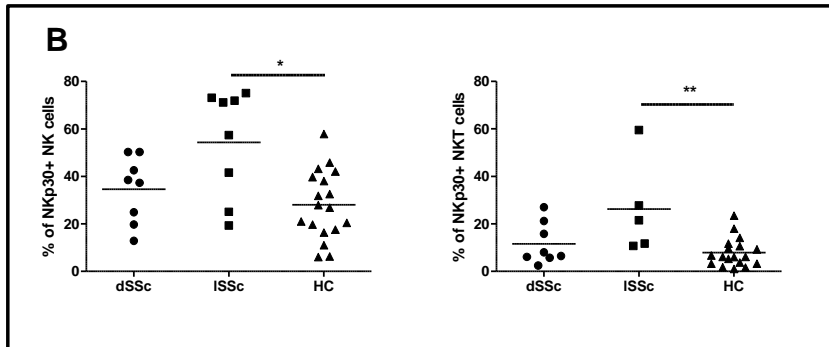
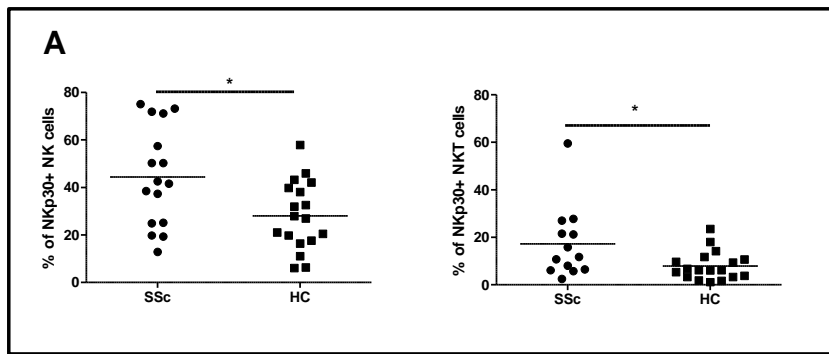


Figura 4: Frequenza di cellule NK che esprimono NKp30 **A)** nei pazienti con SSc raffrontati ai controlli sani; **B)** nei pazienti comparati per subset di malattia (dSSc, ISSc) e rispetto ai controlli sani; **C)** nei pazienti comparati secondo la presenza o assenza di fibrosi polmonare e rispetto ai controlli sani. La barra nera indica la media delle diverse osservazioni. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

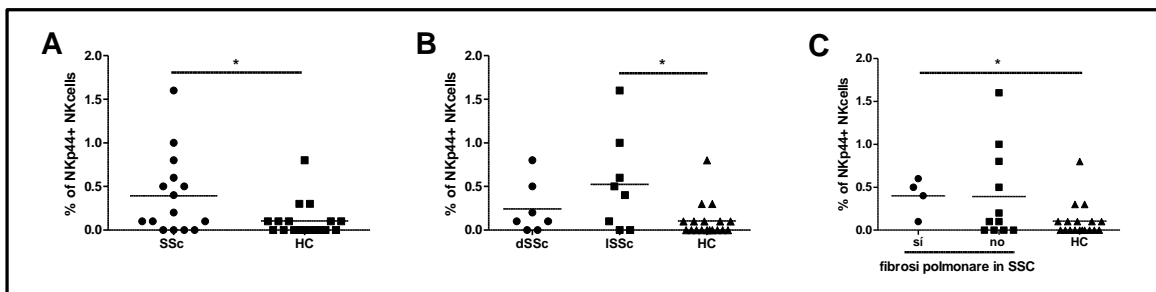


Figura 5: Frequenza di cellule NK che esprimono NKp44 **A)** nei pazienti con SSc raffrontati ai controlli sani; **B)** nei pazienti comparati per subset di malattia (dSSc, ISSc) e rispetto ai controlli sani; **C)** nei pazienti comparati secondo la presenza o assenza di fibrosi polmonare e rispetto ai controlli sani. La barra nera indica la media delle diverse osservazioni. * $p < 0.05$.

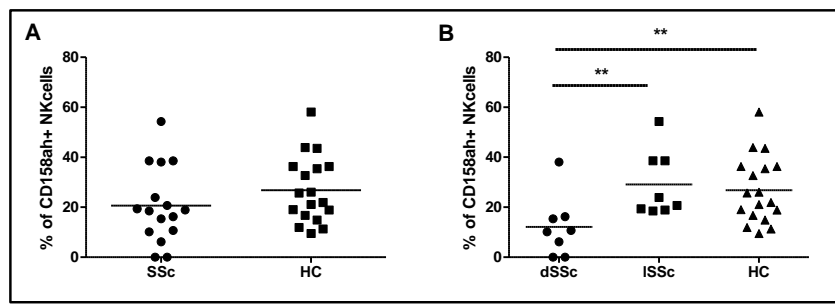


Figura 6: Frequenza di cellule NK che esprimono CD158ah **A)** nei pazienti con SSc raffrontati ai controlli sani; **B)** nei pazienti comparati per subset di malattia (dSSc, ISSc) e rispetto ai controlli sani. La barra nera indica la media delle diverse osservazioni. ** $p < 0.01$.

Bibliografia:

1. Roelofs, M.F. et al. "The expression of toll-like receptors 3 and 7 in rheumatoid arthritis synovium is increased and costimulation of toll-like receptors 3, 4 and 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells." *Arthritis Rheum* 2005; 52:2313-22.
2. van Bon, L. et al "Distinct evolution of TLR-mediated dendritic cell cytokine secretion in patients with limited and diffuse cutaneous systemic sclerosis." *Ann Rheum Dis* 2010; 69:1539-47.
3. van Lieshout, A.W. et al. "Enhanced interleukin-10 production by dendritic cells upon stimulation with Toll-like receptor 4 agonists in systemic sclerosis that is possibly implicated in CCL18 secretion." *Scand J Rheumatol* 2009; 38:282-90.
4. Farina, G.A. et al. "Poly(I:C) drives type I IFN- and TGFbeta-mediated inflammation and dermal fibrosis simulating altered gene expression in systemic sclerosis." *J Invest Dermatol* 2010;130:2583-93.
5. Radstake, T.R.D.J. et al. "The pronounced Th17 profile in systemic sclerosis (SSc) together with intracellular expression of TGFβ and IFNγ distinguishes SSc phenotypes." *PLoS ONE* 2009;4(6):e5903.
6. Zoppi, S. et al. "Anatomy of a murder – signal transduction pathways leading to activation of natural killer cells." *Immunol Lett* 2005; 91:31-39.
7. Ercole, L.P. et al. "Analysis of lymphocyte subpopulations in systemic sclerosis." *J Investig Allergol Clin* 2003; 13(2):87-93.
8. Horikawa, M. et al. "Abnormal natural killer cell function in systemic sclerosis: altered cytokine production and defective killing activity." *J Invest Dermatol* 2005; 125:731-37.
9. Papp, G. et al. "Altered T-cell and regulatory cell repertoire in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis." *Scand J Rheumatol* 2011; 40:205-10.
10. Momot, T. et al. "Association of Killer cell Immunoglobulin-like Receptors with scleroderma." *Arthritis Rheum* 2004; 50(5):1561-65.
11. Pellett, F. et al. "KIRs and autoimmune diseases: studies in systemic lupus erythematosus and scleroderma." *Tissue Antigens* 2007; 69(Suppl. 1):106-08.
12. Masi, A. et al. "Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma)." *Arthritis Rheum* 1980; 23:581–90.
13. LeRoy, E.C. et al. "Scleroderma (Systemic Sclerosis): classification, subsets and pathogenesis." *J Rheumatol* 1988; 15:202-5.
14. Béziat, V. et al. "NK cell terminal differentiation: correlated stepwise decrease of NKG2A and acquisition of KIRs." *PLoS One* 2010; Aug 6;5(8):e11966.
15. Ferlazzo, G. et al. "Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the Nkp30 receptor by activated NK cells." *J Exp Med* 2002; 195:343-51.