

# Sclerodermia e sistema di attivazione del plasminogeno: determinazione dei componenti urochinasi/recettore urochinasi in fibroblasti di pazienti affetti da sclerosi sistemica

L. Postiglione<sup>a</sup>, N. Montuori<sup>a</sup>, G. Di Spigna<sup>a</sup>, A. Riccio<sup>b</sup>,  
D. Carnevale<sup>a</sup>, G. Rossi<sup>a</sup>, P. Ragno<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "L. Califano", Università degli Studi "Federico II" di Napoli

<sup>b</sup>Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi "Federico II" di Napoli

<sup>c</sup>Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Salerno

## Riassunto

**Premesse.** La sclerosi sistemica (SSc) è una patologia autoimmune caratterizzata da un'eccessiva fibrosi a carico della matrice extracellulare (ECM) nel derma. Vi sono due importanti forme di SSc, la sclerosi sistemica diffusa (dSSc) e la sclerosi sistemica limitata (lSSc). I fibroblasti svolgono un ruolo chiave nella SSc. L'espressione e la funzione del sistema di attivazione del plasminogeno urochinasi-dipendente (uPA), un sistema ben caratterizzato di serin-proteasi coinvolto in diversi processi patologici, è stata studiata in fibroblasti di pazienti affetti da SSc.

**Metodi.** L'espressione dei componenti del sistema di attivazione del plasminogeno uPA-dipendente, quali l'uPA, il relativo recettore (uPAR) e gli inibitori PAI-1 e PAI-2 sono stati esaminati mediante Western blotting in fibroblasti di pazienti affetti dalle forme diffuse e limitate di SSc. L'adesione degli stessi fibroblasti alla vitronectina è stata valutata mediante saggi di adesione cellulare.

**Risultati.** La secrezione di uPA e PAI-1 è aumentata solo nei fibroblasti della forma lSSc, se paragonati ai fibroblasti normali. I livelli di PAI-2 mostrano un decremento nei fibroblasti di entrambe le forme di SSc. Interessante notare come i fibroblasti delle zone non adiacenti alle lesioni (non-affette) della forma diffusa hanno mostrato livelli ridotti di PAI-1 e un'aumentata espressione dell'uPAR. Gli esperimenti di adesione hanno mostrato che i fibroblasti nella forma lSSc e quelli dSSc nelle zone non adiacenti alle lesioni aderiscono alla vitronectina meno efficientemente rispetto ai fibroblasti di controllo.

**Conclusioni.** Questi risultati indicano un ruolo dell'uPA e PAI-1 nella forma lSSc, probabilmente attraverso l'attivazione di citochine e pro-enzimi quali le metalloproteasi, con il conseguente accumulo delle componenti dell'ECM, mentre un ruolo dell'uPAR potrebbe essere ipotizzato nell'evoluzione della forma diffusa in relazione all'aumentata espressione nelle zone non-affette.

## Summary

**Scleroderma and plasminogen activation system: expression and function of the urokinase-mediated plasminogen activation system in fibroblasts from systemic sclerosis**

**Background.** Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune disease characterized by excessive fibrosis in derma fibroblasts. There are two major subsets of SSc, the

diffuse cutaneous systemic sclerosis (dSSc) and the limited cutaneous systemic sclerosis (lSSc). Fibroblasts play a key role in SSc. The expression and function of the urokinase (uPA)-mediated plasminogen activation (PA) system, a well characterized system of serine-proteases involved in several pathologic processes, has been investigated in SSc fibroblasts.

**Methods.** The expression of the components of the PA

system, including uPA, its receptor (uPAR) and its type-1 and type-2 inhibitors (PAI-1 and PAI-2) was examined by Western blot in fibroblasts from patients affected by limited and diffuse forms of SSc.

SSc fibroblasts adhesion to vitronectin (VN) was examined by cell adhesion assays.

*Results.* uPA and PAI-1 secretion increased only in fibroblasts from ISSc lesions, as compared to normal fibroblasts. PAI-2 levels were decreased in fibroblasts from both SSc forms. Interestingly, fibroblasts from areas not adjacent to the lesions (not-affected) of the diffuse form showed reduced levels of PAI-1 and increased uPAR expression.

Adhesion experiments showed reduced adherence to

VN of fibroblasts from ISSc and dSSc lesions in from not affected areas, as compared to normal controls.

*Conclusions.* These results suggest a role for uPA and PAI-1 in the ISSc form, likely related to the activation of cytokines and metalloproteases with the accumulation of extra-cellular matrix components, whereas a role for uPAR can be hypothesized in the evolvement of the diffuse form, based on its up-regulation in the not-affected areas.

*Key-words:* Fibroblasts, Systemic sclerosis, urokinase Plasminogen Activator (uPA), urokinase Plasminogen Activator Receptor (uPAR), Adhesion assay, Vitronectin (VN).

## Introduzione

La sclerosi sistemica (SSc) o sclerodermia è una malattia autoimmune sistemica, caratterizzata da un progressivo fenomeno di sclerosi cutanea con ispessimento fibrotico del tessuto connettivo a livello del derma e di vari organi interni e apparati (tratto gastroenterico, apparato cardiovascolare, apparato respiratorio, rene) con conseguente perdita di elasticità e turbe trofiche del distretto interessato.

Da 3 a 5 volte è più frequente nel sesso femminile; è a maggior rischio d'insorgenza tra i 30 e i 55 anni di età e può manifestarsi in varie forme cliniche, principalmente in sclerosi sistemica diffusa (dSSc) e sclerosi sistemica limitata (ISSc).

L'eziologia della sclerosi sistemica è sconosciuta e la patogenesi, a meccanismo autoimmune, sembra caratterizzata in modo principale da un danno immuno-mediato a carico dell'endotelio, seguito dall'attivazione dei fibroblasti perivascolari e dall'incontrollata produzione e deposito di matrice extracellulare (ECM) a livello di cute e sottomucose<sup>1</sup>.

Quindi, i fibroblasti svolgono un ruolo chiave nella deposizione della matrice extracellulare<sup>2,3</sup> e ciò può servire come modello sperimentale per lo studio dei meccanismi molecolari e cellulari della fibrosi nei pazienti affetti da SSc.

Nel presente lavoro è stato studiato il ruolo del sistema di attivazione del plasminogeno di tipo urochinasi-dipendente (uPA) nei fibroblasti di pazienti affetti da sclerodermia.

Inizialmente si riteneva che il sistema di attivazione del plasminogeno fosse adibito unicamente alla fibrinolisi intra ed extra-vascolare, mentre attualmente lo si considera più generalmente coinvolto nel turnover dei costituenti della matrice extracellulare e nella regolazione delle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice.

Il sistema di attivazione del plasminogeno è costituito da numerosi elementi quali l'urochinasi (uPA), gli inibitori PAI1 e PAI2 e specifici recettori di membrana (uPAR).

L'urochinasi (uPA) è uno dei due attivatori del plasminogeno<sup>4</sup>. L'uPA infatti converte il plasminogeno in plasmina, una serin-proteasi a largo spettro, in grado di idrolizzare legami lisina-arginina; oltre ad agire da agente fibrinolitico, la plasmina può degradare vari componenti della matrice extracellulare, quali collagene, fibronectina e laminina. L'attività dell'uPA è regolata da inibitori specifici di tipo 1 e tipo 2 (PAI1 e PAI2)<sup>5,6</sup>. Il PAI1 è inoltre in grado di legare con alta affinità la vitronectina (VN), una proteina presente in forma solubile nel plasma o associata all'ECM. L'interazione con la VN stabilizza il PAI1, sottraendolo al legame con l'uPA; viceversa i complessi uPA/PAI1 hanno scarsa affinità per la VN. L'uPA lega uno specifico recettore sulla membrana cellulare (uPAR)<sup>7</sup>. Esso è in grado di trasdurre segnali indotti dal legame con uPA, stimolando l'adesione, la migrazione e la proliferazione cellulare. L'uPAR agisce anche come recettore per altre molecole extracellulari, come la VN stessa<sup>8</sup>.

Sulla base di queste osservazioni il lavoro è stato articolato in tre fasi successive:

- valutare l'espressione in vitro dell'uPA, PAI1 e PAI2 nei fibroblasti di 5 pazienti affetti da dSSc e 7 affetti da ISSc, prelevati sia dall'area affetta che non affetta della patologia (A e NA), e di 10 donatori sani, mediante Western blotting;
- valutare l'espressione in vitro dell'uPAR nelle stesse colture di fibroblasti dei pazienti affetti da SSc e dei donatori sani, sempre mediante Western blotting;
- valutare l'adesione in vitro alla vitronectina dei fibroblasti di tutti i pazienti affetti da SSc e di tutti i donatori sani, al fine di evidenziare possibili effetti delle variazioni dell'uPA e dell'uPAR, mediante saggi di adesione.

## Materiali e Metodi

Abbiamo studiato l'espressione dell'uPA, PAI1, PAI2 e uPAR su campioni biotici cutanei provenienti da 12 pazienti (due maschi e dieci donne) affetti da sclerodermia, di età compresa tra i 35 e i 55 anni. La diagno-

si di sclerodermia è stata effettuata in accordo con i criteri ARA (American Rheumatism Association). Sulla base dell'estensione del danno cutaneo, 5 pazienti sono stati classificati come affetti da dSSc (con positività anti-Scl70) e 7 pazienti affetti da lSSc (tutti positivi agli anticorpi anti-centromero). La durata media della malattia era di circa 8 anni (range 4 - 27). Nessun paziente presentava segni di altre patologie almeno da un mese prima dello studio.

Per i campioni biotici, ciascun paziente è stato sottoposto a due biopsie cutanee mediante punzone: una sull'area affetta dalla sclerodermia (A); l'altra su un'area apparentemente non affetta (NA) dalla malattia. I criteri utilizzati per definire i campioni appartenenti all'area affetta (A) sono stati i seguenti: la zona si presentava lucida, anelastica e con marcata riduzione di annessi cutanei e le biopsie sono state prelevate a livello dell'avambraccio per la forma dSSc e sulla prima falange del II dito della mano per la forma lSSc.

Invece, i criteri per definire i campioni appartenenti all'area apparentemente non affetta (NA) sono stati i seguenti: la zona si presentava con apparente e normale elasticità, presenza degli annessi cutanei e le biopsie sono state eseguite a livello del dorso.

Come controllo (N), sono stati utilizzati 10 campioni biotici provenienti da derma di soggetti chirurgici post-traumatici sottoposti, prima dell'intervento chirurgico, ad attenta anamnesi clinica e strumentale per escludere qualsiasi patologia autoimmune sistemica.

I campioni biotici cutanei sono stati dissociati meccanicamente allo stereomicroscopio e in seguito, sottoposti a tripsinizzazione per 30 minuti a 37 °C. Dopo ripetuti lavaggi in PBS, i microframmenti sono stati piastrati e coltivati in terreno di coltura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma, St. Louis, MO, USA) contenente: 50% di siero di vitello fetale (FCS) (Gibco, Grand Island, NY, USA), 2 mM di glutammina (Sigma), penicillina (100 unità/ml) (Sigma) e streptomycin (100 unità/ml) (Sigma). Le piastre sono state incubate a +37 °C con il 5% di CO<sub>2</sub>. Dopo circa 10 giorni è stato effettuato il primo cambio di mezzo con concentrazioni scalari di FCS. A circa un mese di distanza, le cellule primarie di fibroblasti così ottenute sono state coltivate in DMEM 10% FCS.

I frammenti chirurgici dei 10 soggetti sani sono stati sottoposti allo stesso trattamento e coltivati nelle stesse condizioni.

L'espressione dell'uPA, PAI1 e PAI2, in mezzi condizionati, e dell'uPAR, in lisati cellulari, è stata studiata mediante Western blotting nei fibroblasti cutanei di pazienti sclerodermici e di soggetti sani.

Per ottenere i mezzi condizionati, i fibroblasti (1x10<sup>6</sup> cellule/piastra da 60 mm) sono stati coltivati in 2 ml di terreno di coltura senza siero contenente 1 mg/ml BSA; dopo 3 giorni il mezzo condizionato è stato raccolto, centrifugato ed analizzato.

Per i lisati cellulari, i fibroblasti (1x10<sup>6</sup> cellule/piastra

da 60 mm) sono stati coltivati in terreno di coltura DMEM (Sigma) contenente 10% di FCS (Gibco), 2 mM di glutammina (Sigma), e 100 unità/ml di penicillina e streptomycin (Sigma). Dopo 4 giorni in coltura, le cellule sono state lavate e, successivamente, lisate in PBS contenente Triton X-100 all'1% e inibitori delle proteasi (Sigma). Il lisato cellulare è stato raccolto e centrifugato. Dopo che il sovrantante è stato raccolto, il passaggio successivo è stato quello di determinare la concentrazione proteica mediante un saggio colorimetrico (BioRad, Richmond, CO, USA).

Per ciascun campione, 100 µg di proteine sono state separate mediante elettroforesi su gel di SDS poliacrilammide al 10%. Terminata la corsa elettroforetica, il gel è stato poi trasferito in campo elettrico su dei filtri di PVDF (Millipore, Windsor, MA, USA). I filtri sono stati bloccati e dopo tre lavaggi in agitazione sono stati incubati overnight a +4 °C con un anticorpo policlonale di coniglio anti-uPA e anti-uPAR (American Diagnostica, Greenwich, CT, USA), anticorpo monoclonale di topo anti-PAI1 e anti-PAI2 (Biopool, Umea, Svezia).

Dopo i lavaggi, i filtri sono stati incubati rispettivamente con gli anticorpi secondari anti-immunoglobulina di coniglio e di topo coniugati con perossidasi di rafano (BioRad) per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo ulteriori lavaggi, i filtri sono stati bagnati con il substrato chemiluminescente (ECL) (Amersham International, Harwell, Inghilterra) e poi esposti ad una lastra fotografica.

I filtri con l'uPAR sono stati successivamente incubati overnight a 4 °C anche con un anticorpo anti-Actina (Dako, Glostrup, Danimarca) per normalizzare i dati ottenuti per ogni campione. L'analisi quantitativa è stata eseguita mediante uno Scanner Densitometry (Snapscan 1212, AGFA).

I fibroblasti dei pazienti sclerodermici e dei soggetti sani sono stati studiati anche attraverso un saggio di adesione cellulare.

La piastra microwells da 96 pozzetti è stata rivestita con vitronectina (Beckton e Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) e successivamente incubata overnight a +4 °C. Le cellule sono state staccate con EDTA, lavate e poi fatte aderire ai pozzetti (1x10<sup>5</sup> cellule/pozzetto); la piastra è stata incubata per 1 ora a +37 °C, con il 5% di CO<sub>2</sub>.

Dopo i lavaggi, le cellule rimaste attaccate ai pozzetti della piastra sono state fissate con la paraformaldeide e successivamente fatte incubare con metanolo. Le cellule sono state poi colorate con cristalvioletto e decolorate con sodio citrato, a pH 4,2.

Infine è avvenuta la lettura con un lettore per piastre microwells ad una lunghezza d'onda di 540 nm (BioRad 550), misurando l'assorbanza relativa.

L'analisi statistica per i dati parametrici normalmente distribuiti è stata eseguita con il "t" Test di Student, e le differenze sono state considerate statisticamente significative per valori di p<0,05.

## Risultati

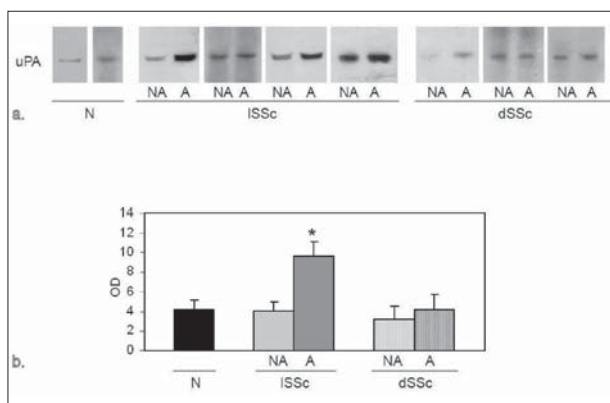
L'espressione dell'uPA appare incrementata solo nei fibroblasti ottenuti da lesioni ISSc (ISSc-A) con una differenza statisticamente significativa, sia rispetto alla sua controparte non affetta (ISSc-NA) ( $p = 0,007$ ) sia rispetto ai fibroblasti normali (N) ( $p = 0,016$ ) (\* $p < 0,05$ ) (Fig. 1).

L'espressione di PAI1 risulta incrementata solo nei fibroblasti provenienti dalle aree affette (ISSc-A) ( $p = 0,046$ ) con una differenza statisticamente significativa rispetto ai fibroblasti normali (N) (\* $p < 0,05$ ). Al contrario, livelli di PAI1 sono apparsi ridotti nei fibroblasti di pazienti dSSc, dove la differenza di riduzione è peraltro statisticamente significativa solo nei fibroblasti provenienti da zone non affette (dSSc-NA) rispetto ai fibroblasti normali (N) ( $p = 0,0002$ ). Le differenze dei livelli di PAI1 tra le aree A e NA della forma diffusa (dSSc) non sono risultate statisticamente significative ( $p = 0,125$ ) (Fig. 2).

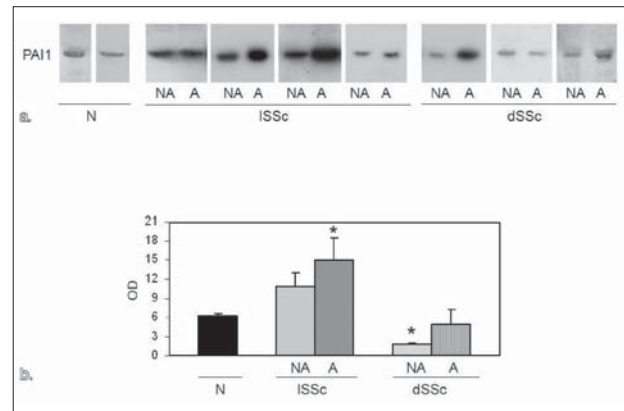
L'espressione di PAI2 risulta diminuita nei fibroblasti provenienti da tutti i pazienti SSc arruolati con una differenza statisticamente significativa rispetto ai controlli normali ( $p$  di ISSc-NA, ISSc-A, dSSc-NA, dSSc-A rispetto a N: 0,0096, 0,0061, 0,0045, 0,033, rispettivamente) (\* $p < 0,05$ ); non sono state osservate differenze statisticamente significative di PAI2 tra le aree affette e non affette di entrambe le forme di SSc (Fig. 3).

I dati relativi all'uPAR sono stati schematizzati in grafico dopo analisi densitometrica e normalizzati rispetto ai livelli di actina (Fig. 4).

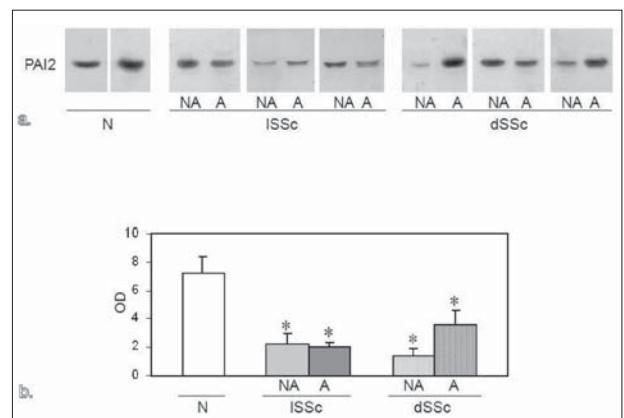
L'espressione dell'uPAR non è variata, sia nei fibroblasti provenienti da ISSc delle aree affette e non affette e sia nei fibroblasti provenienti da dSSc delle aree



**Figura 1.** Espressione mediante Western blotting dell'uPA in fibroblasti cutanei di donatori sani (N) e di pazienti colpiti da ISSc e dSSc, provenienti da aree affette (A) e non affette (NA). L'analisi mostra in tutti i campioni la presenza di una banda di circa 55 kDa corrispondente all'uPA (a, parte superiore). La densità ottica media delle bande dell'uPA dopo Western blotting è stata riportata in grafico (b, parte inferiore). La differenza tra i campioni patologici e normali è considerata statisticamente significativa quando \* $p < 0,05$ .



**Figura 2.** Espressione mediante Western blotting di PAI1 in fibroblasti cutanei di donatori sani (N) e di pazienti colpiti da ISSc e dSSc, provenienti da aree affette (A) e non affette (NA). L'analisi mostra in tutti i campioni la presenza di una banda di circa 52 kDa corrispondente a PAI1 (a, parte superiore). La densità ottica media delle bande di PAI1 dopo Western blotting è stata riportata in grafico (b, parte inferiore). La differenza tra i campioni patologici e normali è considerata statisticamente significativa quando \* $p < 0,05$ .

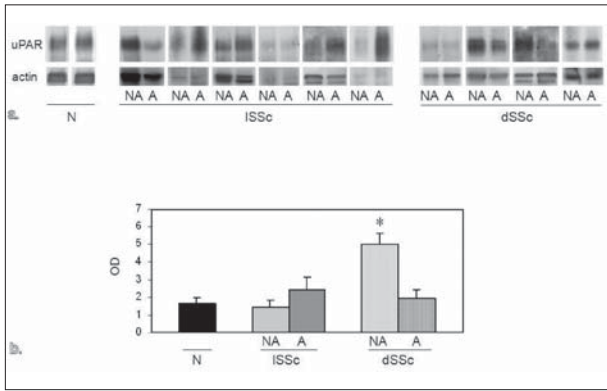


**Figura 3.** Espressione mediante Western blotting di PAI2 in fibroblasti cutanei di donatori sani (N) e di pazienti colpiti da ISSc e dSSc, provenienti da aree affette (A) e non affette (NA). L'analisi mostra in tutti i campioni la presenza di una banda di circa 47 kDa corrispondente a PAI2 (a, parte superiore). La densità ottica media delle bande di PAI2 dopo Western blotting è stata riportata in grafico (b, parte inferiore). La differenza tra i campioni patologici e normali è considerata statisticamente significativa quando \* $p < 0,05$ .

affette ( $p = 1,05$ ) rispetto ai fibroblasti normali ( $p = 0,16$  e  $0,362$ ).

Un aumento, invece, dell'espressione dell'uPAR è stato osservato solo nei fibroblasti provenienti da aree non affette della forma diffusa (dSSc-NA) con una differenza statisticamente significativa rispetto alla controparte affetta ( $p = 0,004$ ) e al controllo normale ( $p = 0,0002$ ) (\* $p < 0,05$ ).

L'adesione cellulare alla VN dei fibroblasti provenienti da ISSc, sia da aree affette che non affette, risulta essere diminuita con una differenza statisticamente si-



**Figura 4.** Espressione mediante Western blotting dell'uPAR in lisati di fibroblasti cutanei di donatori sani (N) e di pazienti colpiti da ISSc e dSSc, provenienti da aree affette (A) e non affette (NA). L'analisi mostra in tutti i campioni la presenza di una banda di circa 50 kDa corrispondente all'uPAR e una banda corrispondente all'actina (a, parte superiore). La densità ottica media, normalizzata rispetto all'actina, delle bande dell'uPAR dopo Western blotting è stata riportata in grafico (b, parte inferiore). La differenza tra i campioni patologici e normali è considerata statisticamente significativa quando  $*p < 0.05$ .

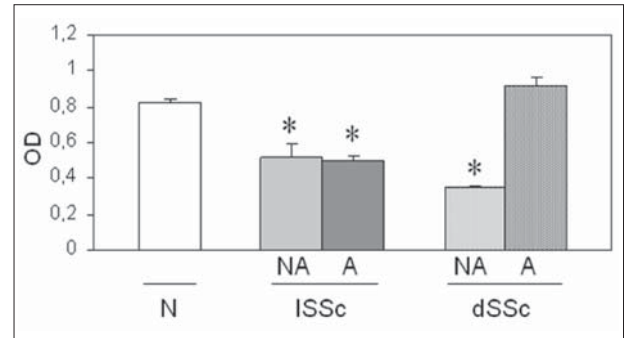
gnificativa rispetto ai controlli normali ( $p = 0,006$  e  $0,001$ ) ( $*p < 0.05$ ). Una significativa riduzione dell'adesione alla VN è stata osservata anche nei fibroblasti provenienti da zone non affette della dSSc rispetto ai controlli normali e alla controparte affetta della dSSc ( $p = 0,0002$  e  $0,075$ ) ( $*p < 0.05$ ) (Fig. 5).

## Discussione

Recenti dati della letteratura hanno suggerito il possibile coinvolgimento dei componenti del sistema di attivazione del plasminogeno uPA-mediato nella sclerosi sistemica (SSc). Infatti, i livelli di uPA, PAI1 e uPAR nel plasma dei pazienti affetti da SSc sono aumentati rispetto al plasma dei controlli sani<sup>9</sup>.

I fibroblasti svolgono un ruolo chiave nella deposizione della matrice extracellulare, determinando in tal modo la fibrosi caratteristica della SSc. Nel loro complesso, nella forma ISSc i risultati del presente studio mostrano un'aumentata secrezione di PAI1 e uPA da parte dei fibroblasti. Infatti, i complessi uPA-PAI-1 promuovono la proliferazione cellulare mediante interazione con il recettore per le lipoproteine VLDLr<sup>10</sup>. Inoltre, il PAI-1 gioca un ruolo importante nell'accumulo di collagene<sup>11</sup>; tale effetto sembra però compensato, in tale forma di SSc, dal contemporaneo aumento di espressione di uPA, che svolge per contro un effetto protettivo sulla fibrosi per la sua capacità di attivare metalloproteasi<sup>12</sup>.

L'uPAR è invece prevalentemente aumentato sulla superficie dei fibroblasti nella forma dSSc. In tale grave forma di SSc, l'uPAR potrebbe trasdurre segnali di proliferazione e resistenza all'apoptosi<sup>13</sup>, meccanismi responsabili della selezione di fibroblasti attivati in risposta al danno endoteliale.



**Figura 5.** Adesione cellulare alla VN dei fibroblasti provenienti da donatori sani (N) e dai pazienti con ISSc e dSSc, sia da aree affette (A) che non affette (NA). La differenza è considerata statisticamente significativa quando  $*p < 0,05$ .

Inoltre, in entrambe le forme di SSc, la secrezione di PAI2 sembra notevolmente diminuita, suggerendo così un ruolo anche per questo inibitore. Il PAI-2, infatti, inibisce l'attività proteolitica dell'uPA senza però attivare segnali mitogenici; pertanto nei fibroblasti sclerodermici attivati, la sua produzione è inibita.

Infine, una bassa adesione dei fibroblasti SSc alla vitronectina potrebbe essere associata ad un'azione inibitoria dell'uPAR sull'attività integrinica ad essa strettamente correlata (alfav-beta5).

Questi risultati suggeriscono un importante coinvolgimento del sistema di attivazione del plasminogeno uPA-dipendente nei fibroblasti di derma SSc; infatti le funzioni di alcuni componenti possono ad es. indurre l'attivazione del TGF-beta dipendente dai fibroblasti principalmente nella forma diffusa e l'inibizione della degradazione fisiologica del collagene nella forma ISSc.

Inoltre, questi risultati supportano ulteriormente l'ipotesi che le forme dSSc e ISSc hanno diversi meccanismi immunopatogenici e che anche la presenza di aree non affette nel derma di pazienti sclerodermici è solo apparente, accompagnata viceversa da profonde disregolazioni biomolecolari di diverse pathway metaboliche.

Un potenziamento dello studio, mediante un incremento del numero dei pazienti, è peraltro in corso per confermare i risultati ottenuti. A tale riguardo, l'esiguità del gruppo di pazienti è peraltro solo apparente data la bassa frequenza di questa patologia. Studi epidemiologici mostrano che l'incidenza della sclerosi sistemica è tra 18-20 individui/milione di popolazione all'anno ed è stabile nell'ultima decade<sup>14,15</sup>.

## Bibliografia

1. Pannu J, Trojanowska M. Recent advances in fibroblast signaling and biology in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16:739-45.
2. Postiglione L, Ladogana P, Montagnani S, Di Spigna G, Castaldo C, Turano M, et al. Enhanced expression of the receptor for Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor on dermal fibroblasts from scleroderma patients. *J Rheumatol* 2002; 29:94-101.

3. Postiglione L, Ladogana P, Montagnani S, Di Spigna G, Castaldo C, Turano M, et al. Effect of Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor on extra-cellular matrix deposition by dermal fibroblasts from patients with Scleroderma. *J Rheumatol* 2005; 32:656-64.
4. Irigoyen JP, Muñoz-Cánoves P, Montero L, Koziczak M, Nagamine Y. The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell Mol Life Sci* 1999; 56:104-32.
5. Matsushita M, Yamamoto T, Nishioka K. Plasminogen activator inhibitor-1 is elevated, but not essential, in the development of bleomycin-induced murine scleroderma. *Clin Exp Immunol* 2005; 139:429-38.
6. Kessler-Becker D, Smola S, Krieg T, Eckes B. High plasminogen activator inhibitor type 2 expression is a hallmark of scleroderma fibroblasts in vitro. *Exp Dermatol* 2004; 13:708-14.
7. Montuori N, Mattiello A, Mancini A, Tagliatela P, Caputi M, Rossi G, et al. Urokinase-mediated post-transcriptional regulation of urokinase-receptor expression in non small cell lung carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 105: 353-60.
8. Ei Y, Waltz DA, Rao N, Drummond RJ, Rosenberg S, Chapman HA. Identification of the urokinase receptor as an adhesion receptor for vitronectin. *J Biol Chem* 1994; 269:380-8.
9. Bandinelli F, Bartoli F, Perfetto E, Del Rosso A, Moggi-Pignone A, Guiducci S, et al. The fibrinolytic system components are increased in systemic sclerosis and modulated by Alprostadil (alpha1 ciclodestryn). *Clin Exp Rheumatol* 2005; 23:671-7. Erratum in: *Clin Exp Rheumatol* 2005; 23: 917.
10. Croucher DR, Saunders DN, Stillfried GE, Ranson M. A structural basis for differential cell signalling by PAI-1 and PAI-2 in breast cancer cells. *Biochem J* 2007; 408:203-10.
11. Chuang-Tsai S, Sisson TH, Hattori N, Tsai CG, Subbotina NM, Hanson KE, et al. Reduction in fibrotic tissue formation in mice genetically deficient in plasminogen activator inhibitor-1. *Am J Pathol* 2003; 163:445-52.
12. Hart DA, Whidden P, Green F, Henkin J, Woods DE. Partial reversal of established bleomycin-induced pulmonary fibrosis by rh-urokinase in a rat model. *Clin Invest Med* 1994; 17:69-76.
13. Ragno P. The urokinase receptor: a ligand or a receptor? Story of a sociable molecule. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 1028-37.
14. Mayes MD, Laing TJ, Gillespie BW, et al. Prevalence, incidence and survival rates of systemic sclerosis in the Detroit metropolitan area. *Arthritis Rheum* 1996; 39 (Suppl):S150.
15. Steen VD, Oddis CV, Conte CG, Janoski J, Casterline GZ, Medsger TA Jr. Incidence of systemic sclerosis in Allegheny County, Pennsylvania. A twenty-year study of hospital-diagnosed cases, 1963-1982. *Arthritis Rheum* 1997; 40:441-5.