

Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro"
Dipartimento di Scienze Mediche
Corso di dottorato in medicina molecolare
a.a. 2003-04 – ciclo XVII –

Relazione III anno

HGF E IL SUO RECETTORE MET NEL SISTEMA CARDIOVASCOLARE

Responsabile scientifico:
Prof.ssa Maria Prat

Candidato:
Marilena Sala

Introduzione

Le malattie cardiovascolari sono oggi una tra le principali cause di morte nel mondo. Il fattore scatenante di queste patologie è l'arteriosclerosi, processo di ispessimento ed indurimento delle pareti arteriose che determina una riduzione del calibro vasale. Le principali sindromi cliniche di origine arteriosclerotica interessano il miocardio, l'encefalo, l'apparato gastroenterico, i reni e i vasi degli arti inferiori. In tutti gli eventi arteriosclerotici si osserva la comparsa di fenomeni di morte cellulare. In particolare nel miocardio la sede principale di questa patologia sono le arterie coronarie. Nel cuore la riduzione dell'afflusso di sangue, inadeguata ossigenazione e apporto di glucosio al tessuto, determina un processo progressivo di perdita di cardiomiociti che costituiscono il reale danno al miocardio. Negli stadi iniziali la perdita di cardiomiociti viene compensata da ipertrofia, che può evolversi in cardiomiopatia dilatativa ed eventualmente in tempi successivi in insufficienza cardiaca (Seidman et al., 2001; Knoll et al., 1996; Weisman et al., 1988). Diversi studi hanno indicato che la morte cellulare nel miocardio è generata sia da eventi di apoptosi che di necrosi (Gill et al., 2002; Freunde et al., 2000; James et al., 1998; Kajstura et al., 1996; Gottlieb et al., 1994).

Il Fattore di Crescita Epatocitario, HGF, è noto per le sue proprietà proliferative, motogeniche, morfogeniche e anti-apoptotiche in cellule epiteliali ed endoteliali, nonché per il fondamentale ruolo fisiologico svolto in processi di rigenerazione tissutale e angiogenesi. Una sempre più crescente attenzione viene riservata a questo fattore di crescita nelle patologie cardiovascolari (Morishita et al., 1998). HGF ed il suo recettore, la tirosina chinasi Met, svolgono un ruolo importante nel miocardio, sono coinvolti nel suo sviluppo durante l'embriogenesi (Rappolee et al., 1996), e vengono riespressi ad alti livelli in seguito a danno indotto da ischemia e riperfusione (Ueda et al., 2001, 1999; Aoki et al., 2000; Nakamura et al., 2000; Zhang et al., 2000; Ono et al., 1997; Matsumori et al., 1996). In particolare sono fortemente positive all'analisi immunoistochimica per HGF le cellule dell'endotelio, le cellule interstiziali e i macrofagi circolanti, mentre i cardiomiociti e l'endotelio capillare è fortemente positivo per l'espressione di Met (Ueda et al., 2001; Ono et al., 1997). HGF si è inoltre dimostrato un fattore cardioprotettivo in vivo e anti-apoptotico in vitro (Nakamura et al., 2000) indicando un suo possibile utilizzo terapeutico nei casi di danno al cuore (Duan et al., 2003). Studi clinici e sperimentali hanno messo in evidenza la correlazione tra le concentrazioni plasmatiche di HGF ed eventi arteriosclerotici, suggerendone un potenziale utilizzo come marker diagnostico (Kawamoto et al., 2003; Yamamoto et al., 2002; Matsumori et al., 1998-2000-2002).

Attualmente sono allo studio strategie terapeutiche da applicarsi in caso di danno cardiaco e, in particolare, sono stati riportati modelli sperimentali di terapia genica con l'utilizzo di HGF ricombinante (Shimamura et al., 2004; Aoki et al., 2000; Sakakura et al., 2000, Duan et al., 2004). Di notevole importanza scientifica è stata la documentazione della presenza di cellule staminali cardiache nel miocardio adulto, seppure in numero estremamente esiguo. Queste aumentano nel caso di danno cardiaco (Beltrami et al., 2003). In sistemi sperimentali queste cellule sono in grado di autorinnovarsi, sono clonogeniche, multipotenti e sono in grado di dare origine a cellule di muscolo cardiaco, cellule della muscolatura liscia, e cellule endoteliali ((Beltrami et al., 2003). Queste scoperte hanno aperto alla possibilità di terapia cellulare. Poiché le cellule staminali cardiache sono molto poche, si sta studiando la possibilità di utilizzare cellule mesenchimali staminali, quali quelle presenti nel midollo osseo, che possono eventualmente essere indotte alla transdifferenziazione in senso cardiomiogenico in seguito a particolari trattamenti (Makino et al., 1999; Forte et al., submitted). In modelli sperimentali di ischemia miocardica, cellule staminali derivate dal midollo osseo, quando inoculate nel miocardio, hanno contribuito alla rigenerazione della porzione infartuata (Orlic et al., 2001).

Anche le piastrine giocano un ruolo importante nelle malattie cardiovascolari. Esse possono aderire alla parete vasale in seguito a danno oppure in condizioni di elevata pressione sanguigna, sono in grado di formare aggregati, sono repute responsabili della formazione di trombi e placche

ateromatose. È stato riportato che fattori di crescita quali PDGF (Platelet Derived Growth Factor), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) e SCF (Stem Cell factor) influenzano la funzionalità delle piastrine, modulandola rispettivamente in senso negativo o positivo (Vassbotn et al., 1994; Selheim F et al., 2002; Grabarek et al., 1994).

Scopo del lavoro

In questo periodo il mio lavoro si è focalizzato su tre linee di ricerca, tutte connesse con il sistema cardiovascolare. In particolare:

1. espressione di Met nelle piastrine e azione di HGF sulla loro funzionalità. Analisi delle vie della trasduzione del segnale attivate in questi elementi.
2. espressione e ruolo di HGF e Met in cellule mesenchimali staminali adulte murine
3. possibilità di utilizzare anticorpi monoclonali, precedentemente dimostrati essere agonisti del recettore Met, come fattori anti-apoptotici per i cardiomiociti, considerato che tutte le risposte biologiche indotte da HGF sono mediate dal suo recettore. Analisi delle vie trasduzionali attivate in queste cellule.

Materiali e Metodi

Colture cellulari e reagenti

Le piastrine utilizzate provengono da prelievi venosi e sono state isolate da sangue intero mediante tecnica di gel filtrazione su colonna di Sepharose 2B. Cellule mesenchimali staminali sono state preparate nel laboratorio di Cardiologia Molecolare e Cellulare, all'Università Tor Vergata di Roma e sono state utilizzate per studi di biochimica. H9c2 è una linea cellulare stabile di cardiomioblasti isolati da embrioni di ratto; queste cellule sono coltivate in terreno DMEM con 10% FBS. HL-4 è una linea stabile di cardiomioblasti isolati dal miocardio di topo e immortalizzati con SV-40; queste cellule sono coltivate in terreno Clycomb con 10% FBS in piastre rivestite di una miscela di Fibronectina (0,001%) e Gelatina (0,02%).

Si sono utilizzati gli anticorpi monoclonali DO-24 e NO-23, precedentemente prodotti nel laboratorio, specifici per due epitopi diversi del dominio extracellulare del recettore Met, che cross-reagiscono attraverso le specie. L'anticorpo di controllo AR-3 è specifico per una mucina espressa prevalentemente da cellule trasformate. Questi anticorpi monoclonali sono stati usati sia per identificare il recettore sulle cellule (cellule mesenchimali staminali di midollo osseo di topo) o sulle piastrine, sia come agonisti del recettore Met. Inoltre si sono utilizzati i seguenti anticorpi commerciali per l'analisi in Western blot: anti-Met, anti-Gab1, anti-PI3 kinase (Santa Cruz), anti-PY (UBI), anti-Syk e anti-GP1b (Santa Cruz). Negli studi di cardioprotezione è stato utilizzato come fattore apoptotico doxorubicina, gentilmente donataci dalla Farmacia dell'Azienda Ospedaliera "Maggiore della Carità" di Novara. In tutti gli esperimenti effettuati è stato utilizzato HGF ricombinante (Peprotech).

Analisi citofluorimetrica dell'espressione di Met in piastrine

Per verificare l'espressione di Met sulla membrana di piastrine, queste sono state fissate con paraformaldeide 3% e incubate con l'anticorpo monoclonale DO-24 e anticorpo secondario anti-mouse FITC coniugato. Nel controllo è stato omissa l'anticorpo monoclonale.

Cinetica di attivazione di Met

Per valutare la funzionalità del recettore Met espresso sulla membrana piastrinica, 10^7 piastrine, sono state stimulate con HGF (100 ng/ml) per tempi diversi a 37°C. La reazione è stata bloccata lisando le

piastrine con tampone RIPA, in presenza di inibitori di proteasi citosoliche e ortovanadato. Gli estratti chiarificati sono stati processati direttamente o dopo immunoprecipitazione con anticorpi specifici per Met per la separazione in corsa elettroforetica e analisi in Western blot.

Esperimenti di co-stimolazione

Per analizzare dal punto di vista biochimico l'interazione di HGF con Trombina, forte e specifico agonista piastrinico, le piastrine sono state stimulate con HGF (100 ng/ml) per 30 secondi e successivamente con Thr (0,1 U/ml) per 10 secondi. Le piastrine sono state quindi lisate e processate come precedentemente descritto e analizzate in Western blot.

Immunoprecipitazione e analisi in Western blot

Per verificare la capacità di HGF esogeno di attivare il recettore Met su MSC, abbiamo stimolato cellule mesenchimali staminali con HGF (50 ng/ml) per 15 minuti, quindi abbiamo lisato in tampone DIM-0,1% TX-100 in presenza di una miscela di inibitori di proteasi e ortovanadato. Gli estratti sono stati immunoprecipitati con anticorpi Met specifici e quindi separati in SDS-PAGE. L'immunodecorazione è stata eseguita con gli anticorpi anti-fosfotirosina e anti-Met. L'analisi delle vie di trasduzione attivate è stata condotta su estratti in 2% SDS bollente e analizzati in Western diretto con gli anticorpi anti MAPK ERK1/2-P e anti MAPK p38-P e anti AKT-P e anti proteina specifici.

Per valutare la capacità degli anticorpi DO-24 ed NO-23 di attivare il recettore Met in cardiomiociti di ratto, abbiamo stimolato con HGF (50 ng/ml), DO-24, NO-23 o AR-3 (20nM) per 15 minuti cellule H9c2 in condizioni di sub-confluenza e quindi lisate in tampone DIM-0,1%TX-100, in presenza di un cocktail di inibitori di proteasi e di ortovanadato o in 2% SDS. Sono state quindi processate come descritto precedentemente e analizzate in Western blot.

Esperimenti di protezione da apoptosi indotta da doxorubicina

Per valutare la proprietà cardioprotettiva degli anticorpi agonisti di Met, DO-24 e NO-23, sono state utilizzate le linee cellulari stabili di cardiomiociti H9c2 di ratto e HL-4 di topo, trattate con doxorubicina, antraciclina utilizzata nella chemioterapia tumorale, e in grado di indurre apoptosi nelle cellule cardiache. Le cellule (5×10^3) sono state piastrate nei micropozzetti di piastra da 96 e lasciate crescere per 48 ore. Il terreno di coltura è stato sostituito con terreno privo di siero e, dove richiesto, le cellule sono state trattate con HGF (50 ng/ml), anticorpi monoclonali (DO-24 o NO-23) o di controllo (AR-3) (20 nM) per 1 ora in presenza di 5% CO₂ a 37°C. Successivamente le cellule sono state trattate con doxorubicina (10 µM) per un'altra ora. Dopo due ore il terreno è stato sostituito con terreno fresco DMEM 10% FBS e incubate per altre 16 ore. Per valutare l'azione protettiva dei fattori di interesse si è usato un test di vitalità cellulare trattando le cellule con una soluzione di MTT (sali di tetrazolio) per 3 ore. Le cellule presenti nella piastra sono state solubilizzate in DMSO e l'assorbanza letta a 570 nm. Il valore di assorbanza letto è proporzionale alla quantità di cellule vitali presenti nella coltura.

Risultati

Met è espresso sulla superficie piastrinica

L'analisi in citofluorimetria a flusso di piastrine incubate con l'anticorpo monoclonale DO-24 ha rilevato la presenza di Met sulla membrana di piastrine umane.

Le piastrine esprimono il recettore di HGF funzionalmente attivo

L'analisi in Western blot di immunoprecipitati di lisati piastrinici, ottenuti in seguito a stimolazione tempo dipendente da HGF (100 ng/ml), ha rilevato che il recettore di HGF, c-Met, viene fosforilato dal suo ligando e che il picco di attivazione è rilevabile dopo 10 secondi di stimolazione, permane ancora a 30 secondi e progressivamente si spegne a tre minuti.

L'analisi di proteine co-precipitate con Met ha evidenziato il reclutamento della proteina adattatrice Gab 1 e della proteina chinasi PI3-K, trasduttori noti del recettore. Inoltre è stata rilevata l'associazione con la proteina GP1b, recettore del fattore di von Willebrand, che è espresso unicamente dalle piastrine. La co-associazione delle due molecole recettoriali fa pensare ad un "cross-talk" che influenza l'attività aggregatoria delle piastrine.

In esperimenti di attivazione di Met mediata da HGF è stata rilevata anche l'associazione di Syk al recettore Met attivato, importante proteina coinvolta nell'attivazione piastrinica, appartenente alla famiglia della tirosina chinasi citoplasmatica Src.

Trombina potenzia l'attivazione di Met mediata da HGF

Stimolando le piastrine con solo HGF (100 ng/ml) per 30 secondi, oppure con sola Trombina (0,1 U/ml) 10 secondi o con entrambe i fattori, si è osservato che il recettore veniva fosforilato solo in presenza di HGF, ma non di trombina. Stimolando per 30 secondi con HGF e successivamente con trombina, si osserva un effetto di potenziamento dell'azione di HGF sul recettore.

Attivazione di Met e delle ERK1/2, AKT e p38 MAPK mediata da HGF in MSC (mesenchymal stem cells)

Estratti cellulari di cellule MSC stimulate o meno con HGF (50 ng/ml) sono stati analizzati in Western blot in seguito a immunoprecipitazione con anticorpi anti-Met specifici. L'immunodecorazione con anticorpi anti fosfotirosina ha rilevato la fosforilazione di Met indotta da HGF esogeno.

L'analisi delle vie di trasduzione attivate da HGF ha messo in luce l'attivazione delle proteine MAPK ERK1/2 e p38 in modo e tempo dipendenti. L'attivazione di Met induce anche la fosforilazione di AKT. L'attivazione di queste vie trasduzionali indica come HGF agisca da un lato come fattore motogenico, attivando la via di PI3 K e di ERK1/2, e dall'altro come fattore differenziativo, bloccando la proliferazione mediante attivazione di p38MAPK.

Esperimenti paralleli condotti dal laboratorio di Cardiologia Cellulare e Molecolare, dell'Università di Tor Vergata hanno poi dimostrato che HGF ha effetto motogenico su MSC, come risulta da esperimenti di Wound Healing, mentre è in grado di bloccare la proliferazione FCS (Fetal Calf Serum) dipendente e ha effetto differenziativo in senso cardiomiogenico su queste cellule.

Doxorubicina induce apoptosi in cardiomiociti

Il trattamento con Doxorubicina di cardiomiociti induce apoptosi in maniera dose dipendente e tempo dipendente. In cellule H9c2 e HL-4 l'azione della doxorubicina è stata osservata a sedici ore di trattamento con dosi di 10 μ M di doxorubicina. Gli esperimenti di cinetica d'azione del farmaco hanno messo in evidenza che già a sei ore di trattamento era rilevabile l'effetto apoptotico dell'antraciclina. (dati non mostrati).

Gli anticorpi agonisti di Met contrastano l'azione apoptotica della doxorubicina in cardiomiociti

Entrambe le linee cellulari utilizzate come modelli di studio, H9c2 e HL-4, sono state pre-trattate con HGF, anticorpi agonisti di Met DO-24 e NO-23 o di controllo AR-3 per circa un'ora prima di essere incubate in presenza di doxorubicina. L'analisi ottenuta mediante saggio di vitalità cellulare con MTT ha dimostrato che gli anticorpi agonisti di Met agiscono riducendo l'effetto pro-apoptotico della doxorubicina su cardiomiociti. In particolare il trattamento con l'agonista totale di Met, DO-24, ha ridotto l'effetto del farmaco di circa il 60% rispetto al controllo in cellule HL-4, mentre in cellule H9c2 l'effetto di riduzione dell'azione citotossica di doxorubicina è del 25%. Su entrambe le linee testate

l'azione dell'anticorpo DO-24 sembra lievemente più potente rispetto all'HGF stesso. L'anticorpo NO-23, invece, sembra avere un minor effetto protettivo dall'azione della doxorubicina, dando un valore di protezione di circa un 36 % sia su HL-4 e di circa un 18% su H9c2.

Gli anticorpi agonisti di Met, DO-24 e NO-23, attivano Met e la cascata delle MAPK e di AKT

Dopo stimolazione delle cellule H9c2 con HGF, con gli anticorpi agonisti di Met (DO-24 e NO-23) o con l'anticorpo di controllo negativo (AR-3) per 15 minuti, sono stati preparati dei lisati cellulari con detergente. Il recettore Met precipitato da questi lisati con anticorpi specifici è risultato attivato, ossia fosforilato in tirosina, in cellule stimulate con HGF o con gli anticorpi DO-24 allo stesso livello, e, a un livello inferiore, ma comunque significativo, in cellule stimulate con l'anticorpo NO-23. L'analisi in Western blot dei trasduttori di Met coinvolti nella risposta anti-apoptotica ha rilevato che entrambi gli anticorpi attivano la cascata delle MAPK ERK1/2 e AKT. Anche in questo caso l'attivazione indotta da DO-24 è risultata più forte rispetto a quella indotta dal monoclonale NO-23. I dati biochimici concordano con quelli ottenuti nei saggi in vitro e indicano che l'anticorpo monoclonale DO-24 attiva il recettore e le vie di trasduzione del segnale, nonché la risposta anti-apoptotica in modo più efficace dell'anticorpo monoclonale NO-23. L'anticorpo DO-24 è quindi quello che verrà studiato per le sue capacità cardioprotettrici in vivo in topi.

Conclusioni

Gli studi condotti su piastrine, MSC (mesenchymal stem cells) e cardiomiociti mettono in luce il ruolo che HGF ed il suo recettore Met hanno nel panorama della fisiologia e della patologia cardiovascolare. Non solo HGF è importante nella protezione da apoptosi di cardiomiociti e nel ripristino del tessuto danneggiato da ischemia (Nakamura et al., 2000; Duan et al., 2003), ma esso ha un ruolo anche nella modulazione dell'attività piastrinica durante l'aggregazione.

Lo studio condotto sulle piastrine, in collaborazione con il laboratorio di Biochimica, del Dipartimento di Scienze Mediche, ha dimostrato che Met è espresso sulla membrana piastrinica, ed è funzionalmente attivo. L'interazione HGF/Met agisce modulando la funzionalità delle piastrine diminuendo gli effetti indotti dallo stimolo con importanti agonisti piastrinici quali trombina e trombassano A2. In seguito a stimolazione con HGF Met viene rapidamente fosforilato reversibilmente, ed è in grado di reclutare molecole adattatrici e trasduttori noti di Met, quali Gab 1 e PI3K. Non solo, Met attivato associa alla glicoproteina GPIb, recettore del fattore di von Willebrand, e alla tirosina chinasi citosolica Syk, due importanti molecole nel processo di attivazione piastrinica. L'azione di HGF sulla attività piastrinica è simile a quanto già documentato per il PDGF (Vassbotn et al., 1994).

Gli studi condotti in collaborazione con il laboratorio di Cardiologia Cellulare e Molecolare, Università di Tor Vergata di Roma, su cellule staminali mesenchimali di topo, hanno documentato che sia Met che HGF sono espressi in queste cellule seppur a bassi livelli, e che la loro espressione è aumentata dalla stimolazione con HGF esogeno. HGF inoltre è in grado di fosforilare il recettore e ciò attiva un serie di vie trasduzionali che coinvolgono le proteine MAPK ERK1/2 e p38 e la proteina AKT. Saggi in vitro di Wound Healing hanno rilevato l'azione motogenica di HGF su cellule MSC, questo suggerisce come le aumentate concentrazioni sistemiche di HGF in seguito a danno cardiaco, possano agire da fattori chemotattici per queste cellule verso il cuore. Inoltre gli studi in microscopia confocale hanno messo in evidenza l'azione differenziativa in senso cardiomiogenico di HGF su MSC, bloccando la proliferazione e inducendo l'espressione di specifici marcatori cardiaci quali MHC α .

Infine gli studi condotti su linee stabili di cardiomiociti, dimostrano che gli anticorpi monoclonali agonisti di Met, DO-24 e NO-23, sono in grado di inibire l'azione apoptotica della doxorubicina, in modo simile ad HGF. Questo ci permette di suggerire il possibile impiego di queste molecole come sostituti di HGF nella cardioprotezione da apoptosi. Le molecole anticorpali presentano notevoli vantaggi di impiego rispetto ad HGF. Sono reagenti facili da ottenere in grandi quantità,

relativamente poco costosi e sono molecole molto più stabili del ligando naturale HGF. Inoltre oggi con le sempre più avanzate tecniche di biologia molecolare possono essere facilmente riformattati per migliori e maggiori applicazioni.

In conclusione i dati ottenuti dai nostri studi ci permettono di considerare HGF e Met due possibili elementi chiave nello sviluppo futuro di eventuali studi per il disegno e l'applicazione di nuove terapie nel campo cardiovascolare.

Bibliografia

Siedman JG and Seidman C. The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell*, 2001; 104: 557-567 – Review

Knoll R, Hoshijima M, Chien K. Cardiac mechanotransduction and implications for heart disease. *J Mol Med*. 2003 81:750-6. Review.

Weisman HF, Bush DE, Mannisi JA, Weisfeldt ML, Healy B. Cellular mechanisms of myocardial infarct expansion. *Circulation* 1988 78: 186-201.

Gill C., Mestral R., Samali A. Losing heart: role of apoptosis in heart disease a novel therapeutic target? *FASEB J* 2002; 16: 135-146 Review

Freunde et al., 2000;

James TN. The variable morphological coexistence of apoptosis and necrosis in human myocardial infarction: significance for understanding its pathogenesis, clinical course, diagnosis and prognosis. *Coron Artery Dis*. 1998; 9: 291-307. Review.

Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest*. 1996 Jan; 74:86-107.

Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest*. 1994; 94:1621-8.

Morishita R, Nakamura S, Hayashi S, Aoki M, Matsushita H, Tomita N, Yamamoto K, Moriguchi A, Higaki J, Ogihara T. Contribution of a vascular modulator, hepatocyte growth factor (HGF), to the pathogenesis of cardiovascular disease. *J Atheroscler Thromb*. 1998; 4:128-34. Review.

Rappolee DA, Iyer A, Patel Y. Hepatocyte growth factor and its receptor are expressed in cardiac myocytes during early cardiogenesis. *Circ Res*. 1996; 78:1028-36.

Ueda H, Nakamura T, Matsumoto K, Sawa Y, Matsuda H, Nakamura T. A potential cardioprotective role of hepatocyte growth factor in myocardial infarction in rats. *Cardiovasc Res*. 2001; 51: 41-50.

Ueda H, Sawa Y, Matsumoto K, Kitagawa-Sakakida S, Kawahira Y, Nakamura T, Kaneda Y, Matsuda H. Gene transfection of hepatocyte growth factor attenuates reperfusion injury in the heart. *Ann Thorac Surg*. 1999; 67: 1726-31.

- Nakamura T**, S Mizuno, K Matsumoto, Y Sawa, H Matsuda, and T Nakamura¹. Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. *J. Clin. Invest* 2000; **106**: 1511–1519.
- Zhang L**, Himi T, Murota S. Induction of hepatocyte growth factor (HGF) in rat microglial cells by prostaglandin E(2). *J Neurosci Res*. 2000; 62: 389-95.
- Ono K**, Matsumori A., Shioi T., Furukawa Y., Sasayama S. Enhanced expression of hepatocyte growth factor/c-met by myocardial ischemia and reperfusion in a rat model. *Circulation* 1997; 95: 2552-2558
- Matsumori A.**, Furukawa Y, Hashimoto T., Ono K., Shioi T., Okada M., et al. Increased circulating hepatocyte growth factor in the early stage of acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 221: 391-395
- Kawamoto R**, Oka Y, Yoshida O, Takagi Y. Significance of serum circulating hepatocyte growth factor in the development of carotid atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2003; 10: 154-9.
- Yamamoto Y**, Kohara K, Tabara Y, Igase M, Nakura J, Miki T. Plasma hepatocyte growth factor and the relationship between risk factors and carotid atherosclerosis. *Hypertens Res*. 2002; 25: 661-7.
- Matsumori A.**, Ono K., Furukawa Y., Okada M., Sasayama S. Circulating hepatocyte growth factor as an early marker of arterial thrombus formation. *Jpn Circ J* 1998; 62: 311-313
- Matsumori A**, Miyazaki S., Takano H., Ono K., Okada M., Miyamoto T., Nonogi H., Daikoku S., Mitsudo K., Matsunaga Y., Ohnishi T., Daikuhara Y., Sasayama S. Circulating hepatocyte growth factor as a marker of thrombus formation in unstable angina pectoris. *Jpn Circ J* 2000; 64: 805-807
- Matsumori A**, Takano H., Obata J., Takeda S., Tsuyuguchi N., Ono K., Okada M., Miyamoto T., Ohnishi T., Daikuhara Y., Sasayama S. Circulating hepatocyte growth factor as a diagnostic marker of thrombus formation in patients with cerebral infarction. *Circ J* 2002; 66: 216-218
- Duan HF**, Wu CT, Wu DL, Lu Y, Liu HJ, Ha XQ, Zhang QW, Wang H, Jia XX, Wang LS. Treatment of myocardial ischemia with bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing hepatocyte growth factor. *Mol Ther*. 2003, 8: 467-74.
- Shimamura M**, Sato N, Oshima K, Aoki M, Kurinami H, Waguri S, Uchiyama Y, Ogihara T, Kaneda Y, Morishita R. Novel therapeutic strategy to treat brain ischemia: overexpression of hepatocyte growth factor gene reduced ischemic injury without cerebral edema in rat model. *Circulation*. 2004, 109: 424-31.
- Aoki M**, Morishita R, Taniyama Y, Kaneda Y, Ogihara T. Therapeutic angiogenesis induced by hepatocyte growth factor: potential gene therapy for ischemic diseases. *J Atheroscler Thromb*. 2000; 7: 71-6.
- Sakakura Y**, Kaibori M, Oda M, Okumura T, Kwon AH, Kamiyama Y. Recombinant human hepatocyte growth factor protects the liver against hepatic ischemia and reperfusion injury in rats. *J Surg Res*. 2000; 92: 261-6.

Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003; 114: 763-76.

S Makino, K Fukuda, S Miyoshi, F Konishi, H Kodama, J Pan, M Sano, T Takahashi, S Hori, H Abe, J Hata, A Umezawa, and S Ogawa. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J. Clin. Invest.* 1999, 103: 697–705

G. Forte, M. Minieri, P. Cossa, D. Antenucci, M. Sala, R. Fiaccavento, F. Carotenuto, P. De Vito, P.M. Baldini, A. Modesti, M. Prat and P. Di Nardo. HGF induces cardiomyocyte phenotype in bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, sottomesso per pubblicazione, 2004.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 10344-9

FS Vassbotn, OK Havnen, CH Heldin and H Holmsen. Negative Feedback Regulation of Human Platelets via Autocrine Activation of the Platelet-derived Growth Factor α -Receptor. *JBC* 1994, 269: 13874-13879.

Selheim F, Holmsen H, Vassbotn FS. Identification of functional VEGF receptors on human platelets. *FEBS Lett.* 2002, 512: 107-10.

J Grabarek, E Groopman, YR Lyles, S Jiang, L Bennett, K Zsebog and H Avraham. Human Kit Ligand (Stem Cell Factor) Modulates Platelet Activation *in Vitro*. *JBC* 1994, 269: 21718-21724.

Seminari specialistici frequentati:

- 07/07/2004 Prof. Martin Ronis del (Dept of Pharmacology and Toxicology, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, USA)
Ethanol metabolism and Toxicity in Pregnancy
- 05/07/2004 Prof. Armando Bartolazzi (Dipartimento di Patologia, Facoltà di Medicina, Ospedale St.Andrea, Università La Sapienza – Roma)
From the bench to the bedside: Galectin-3 immunodetection for improving the preoperative diagnosis of the follicular thyroid lesions
- 30/06/2004 Manlio FERRARINI (IST e Università di Genova)
Meccanismi patogenetici della Leucemia Linfatica Cronica
- 05/05/2004 Prof. Bice Fubini (Dipartimento di Chimica IFM, Chimica Inorganica, Fisica e dei Materiali, Università di Torino, Facoltà di Farmacia, Direttore del Centro Interdipartimentale "G. Scansetti" per lo Studio degli Amianti e di altri Particolati Nocivi), presso la sede del Discaff dell'Università di Novara
Come comprendere i meccanismi di patogenicità delle fibre di amianto? Necessità di un approccio multidisciplinare
- 03/05/2004 Dott. Frédéric Rieux-Laucat (INSERM 429, Hôpital Necker, Paris)
Genetic bases of the Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS) subtypes
- 28/04/2004 Dott. Marco Brambilla (Università del Piemonte Orientale, Novara)
Norme operative di protezione e sicurezza per i laboratori di ricerca
- 24 /04/2004 Clinica San Gaudenzio, Novara (Presidente Prof. Ilario Viano)
Incontro di Studio *Impresa, valori sociali e nuova Sanità*
- 23/04/2004 Network per la valorizzazione della ricerca universitaria (Università del Piemonte Orientale, DISCAFF, Novara)
Seminario di cultura brevettale
- 31/03/2004 Dott.ssa Antonia Follenzi (Albert Einstein College of Medicine, Liver Research Center 1300 Morris Park Avenue, Bronx, NY 10461 – USA)

Espressione epato-specifica del fattore IX antiemofilico mediante l'uso di vettori lentivirali

- 10 /03/2004 Prof. Guido Valesini (Cattedra di Reumatologia, Università la Sapienza di Roma)
TNF, anti-TNF ed autoimmunità
- 18/02/2004 Dott.ssa Bice Chini (CNR Istituto di Neuroscienze, Sezione di Farmacologia cellulare e molecolare, Milano)
Lipid rafts e recettore per l' ossitocina: modulazione del signalling e del controllo della proliferazione cellulare
- 17/02/2004 Dott.ssa Maria Gabriella Scordo (Department of Medical Sciences Clinical Pharmacology University of Uppsala, Svezia),
Citocromo P450: polimorfismi genetici e risposta clinica ai farmaci
- 06/02/2004 Società Chimica Italiana – Divisione dei sistemi biologici “*Proteomica – Una tecnica per molte applicazioni*”. Busto Arsizio (Va). Coordinatore scientifico Prof. M. Fasano
- 03/02/2004 Dr.ssa Rita Clementi (Università di Pavia)
Alterazioni del gene della perforina nelle patologie linfoproliferative
- 30/01/2004 Prof. Magnus Ingelman-Sundberg (Division of Molecular Toxicology, Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden)
Pharmacogenetics: a tool for a more efficient and safe drug therapy
- 27/01/2004 Dott. Alan Kozikowski (University of Illinois, Chicago), seminario presso il
DISCAFF Chemistry and biology of natural products-derived molecules targeted to the brain

Partecipazione a congressi

ABCD, Roma 19-20 marzo 2004

6° Convegno FISV, Riva del Garda 30 settembre-3 ottobre 2004

Abstract e articoli

G. Forte, M. Minieri, P. Cossa, D. Antenucci, M. Sala, R. Fiaccavento, F. Carotenuto, P. De Vito, P.M. Baldini, A. Modesti, M. Prat and P. Di Nardo. HGF induces cardiomyocyte phenotype in bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, sottomesso per pubblicazione, 2004.

1. Sala M, Franzolin AL, Bardelli C, Baldanzi G, Cutrupi S, Graziani A, Prat M, α -DIACYLGLYCEROL KINASE IS INVOLVED IN HGF-DEPENDENT BIOLOGICAL EFFECTS OF KAPOSI'S SARCOMA
ABCD "Meccanismi di trasduzione del segnale in adesione e differenziamento cellulare", Roma 2004
2. Pietrapiana D., Sala M., Prat M. and Sinigaglia F.
PLATELETS EXPRESS AN ACTIVABLE HGF RECEPTOR, WHICH MODULATES THEIR FUNCTION
ABCD "Meccanismi di trasduzione del segnale in adesione e differenziamento cellulare", Roma 2004
3. Forte G, Minieri M, Antenucci D, Fantini C, Carotenuto F, Fiaccavento R, Sala M, Di Nardo P and Prat M
HGF INDUCES CARDIOMYOCYTE PHENOTYPE IN BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS
ABCD "Meccanismi di trasduzione del segnale in adesione e differenziamento cellulare", Roma 2004
4. Pietrapiana D., Sala M., Prat M. and Sinigaglia F.
HGF RECEPTOR IS EXPRESSED ON HUMAN PLATELET SURFACE AND MODULATES THEIR FUNCTION
7° Convegno della Società Italiana delle Biotecnologie, Catania, 2004.
5. M. Sala, S. Morena, A. Franzolin and M. Prat
AGONIST ANTI-HGF-RECEPTOR MONOCLONAL ANTIBODIES ARE ANTI-APOPTOTIC FACTORS FOR CARDIOMYOCYTES.
XI Congresso Nazionale della Società Italiana di Ricerche Cardiovascolari, Latina, 2004.
6. Sala M, Morena S, Franzolin A and Prat
ANTI-APOPTOTIC ACTIVITY OF AGONIST ANTI-HGF-RECEPTOR MONOCLONAL ANTIBODIES ON CARDIOMYOCYTE CELL LINES.6°
6° Convegno FISV, Riva del Garda, 2004.
7. Sala M., Pietrapiana D., Prat M. and Sinigaglia F.
HGF MODULATES BIOCHEMICAL AND BIOLOGICAL RESPONSES OF PLATELETS
6° Convegno FISV, Riva del Garda, 2004.
8. Morena S, Sala M, Costa B, Prat M
PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODY DIRECTED AGAINST THE HUMAN RECEPTOR TYROSINE KINASE RON.
6° Convegno FISV, Riva del Garda, 2004.

